



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unravelling the sugar-coating of prostate-specific antigen : method development and its application to prostate cancer research

Kammeijer, G.S.M.

Citation

Kammeijer, G. S. M. (2019, March 7). *Unravelling the sugar-coating of prostate-specific antigen : method development and its application to prostate cancer research*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/69482>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/69482>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/69482> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kammeijer, G.S.M.

Title: Unravelling the sugar-coating of prostate-specific antigen : method development and its application to prostate cancer research

Issue Date: 2019-03-07

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Met jaarlijks 10,000 nieuwe diagnoses in Nederland is prostaat­kanker de meest voorkomende kankersoort bij mannen. Wanneer er een verdenking van prostaat­kanker is wordt er een PSA-test uitgevoerd. Deze test is gebaseerd op het eiwit **prostaat specifiek antigeen (PSA)**, dat geproduceerd wordt in de prostaat met als functie het sperma vloeibaar te maken zodat spermacellen kunnen zwemmen. In een normale situatie (geen prostaat­kanker) kan er een klein beetje van dit eiwit “leken” vanuit de prostaat­klier naar de bloedsomloop. Bij prostaat­kanker zijn de cellen minder mooi gerangschikt en kan de PSA vanuit de prostaat­klier beter toegang krijgen tot de bloedsomloop. Hierdoor kunnen verhoogde PSA concentraties geobserveerd worden in het bloed. Bij verhoogde PSA concentraties (boven de 3,0 ng/mL) zal vervolgonderzoek worden aangeraden. Hoewel deze test wereldwijd klinisch wordt toegepast, is de PSA-test niet zo gevoelig dat de aan- of afwezigheid van prostaat­kanker met zekerheid kan worden bepaald. Dit komt mede door het feit dat prostaat­kanker niet de enige veroorzaker is van verhoogde PSA concentraties in het bloed. Andere prostaataandoeningen zoals een goedaardige vergroting of ontsteking van de prostaat kunnen ook resulteren in een verhoogde PSA concentratie. Daarnaast is prostaat­kanker onder te verdelen in twee groepen namelijk, histologische prostaat­kanker en klinische prostaat­kanker. In het geval van histologische prostaat­kanker gaat het om een langzaam groeiende kankersoort. De patiënt heeft geen klachten en de kans is groot dat de patiënt eerder zal overlijden aan ouderdom of andere aandoeningen dan aan prostaat­kanker. In zo’n geval wordt dan ook vaak een actief afwachtend beleid aangeraden, wat betekent dat de patiënt regelmatig terug zal moeten komen voor controles. Deze prostaat­kanker zou men dan ook liever niet willen diagnosticeren. Men spreekt van klinische prostaat­kanker als de kanker agressieve kenmerken heeft, waarvan de patiënt symptomen kan krijgen of heeft. In dit stadium zal er een behandeling worden gestart welke (afhankelijk van het stadium van de ziekte) kan bestaan uit uitwendige of inwendige bestraling of het verwijderen van de prostaat middels operatie, hormoontherapie of chemotherapie. Helaas, is het soms lastig om een onderscheid te maken tussen histologische en klinische prostaat­kanker waardoor de kans bestaat dat de patiënt wordt onder- of over behandeld. Dit illustreert dan ook de noodzaak voor een betere diagnostische methode dan de huidige PSA-test om prostaat­kanker van andere prostaat­klachten te onderscheiden zodat de patiënt zo goed mogelijk kan worden geholpen.

Om een beter onderscheid te kunnen maken tussen prostaat­kanker, de soort prostaat­kanker (histologisch of klinisch) en andere prostaat gerelateerde ziekten zouden mogelijke modificaties die aanwezig kunnen zijn op PSA een uitkomst bieden. Een van deze modificaties is glycosylering, bij deze modificatie zijn er suikergroepen aan het eiwit vast gemaakt. Veranderingen in deze suikergroepen blijken een rol te spelen bij verschillende kankersoorten en aan auto-immuunziekten zoals reuma. Het doel van dit proefschrift was het onderzoeken van de mogelijke link tussen prostaat­kanker en de aanwezige (veranderingen van) suikergroepen op PSA. Mogelijkerwijs kunnen deze observaties (veranderingen



van bepaalde suikergroepen op PSA) ook dienen om een onderscheid te maken tussen histologische de klinische prostaatkanker. Dit in tegenstelling tot de huidige PSA-test welke geen onderscheid kan maken tussen deze verschillende agressiviteitskenmerken van prostaatkanker. Tijdens dit onderzoek is er gebruik gemaakt van een analytische platform bestaande uit capillaire elektroforese gekoppeld aan een massaspectrometer door middel van elektro spray ionisatie (CE-ESI-MS(/MS)). Met dit platform kan er een speciale focus worden gelegd op de analyse van deze suikerstructuren op glycaan en glycopeptide niveau.

In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt er een beschrijving gegeven over prostaatkanker, de huidige klinische route maar ook wat de onbeantwoorde behoeften zijn vanuit de kliniek omtrent prostaatkanker. Er is namelijk een grote vraag naar een meer betrouwbare test die prostaatkanker van andere prostaatklasten kan onderscheiden maar ook een test die overbehandeling en invasieve onderzoeken van histologische prostaatkanker kan voorkomen. Daarnaast beschrijft dit hoofdstuk ook in detail de biosynthese en biologische rol van de suikergroepen (glycosylering) en of de onbeantwoorde behoeften vanuit de kliniek mogelijk beantwoord kunnen worden met glycaan biomarkers. Tevens geeft dit hoofdstuk een basale uitleg van CE-ESI-MS als analytisch platform en waarom juist dit platform geschikt is voor dit onderzoek.

Het tweede deel van dit proefschrift bespreekt de ontwikkelingen en implementaties omtrent de analyse van glycosylering met CE-ESI-MS (**hoofdstukken 2, 3 en 4**). Een specifiek glycosylerings kenmerk van PSA, namelijk sialylering, wordt in literatuur beschreven als een potentiële biomarker voor prostaatkanker, waarbij een verhoging van de sialzuur die $\alpha 2,3$ -gebonden is aan een galactose erg veelbelovend lijkt. Aangezien het gebruik van alleen een massaspectrometer geen onderscheid kan maken tussen de verschillende bindingen ($\alpha 2,3$ versus $\alpha 2,6$), is er onderzocht of capillaire elektroforese de benodigde scheiding kon verwezenlijken (**hoofdstuk 2**). Terwijl $\alpha 2,3$ - en $\alpha 2,6$ -siallyllactose beschikken over dezelfde fysisch-chemische eigenschappen, blijken ze een andere elektroforetische mobiliteit te hebben dat zeer waarschijnlijk veroorzaakt wordt door een relatief klein verschil in pK_a ($3.4 \cdot 10^{-2}$). Opvallend was het feit dat er geen verdere monster voorbereiding nodig was naast de algemene procedures voor een bottom-up benadering (reductie, alkylatie en digestie van het suikereiwit). Tevens liet deze studie de hoge heterogeniteit in suikergroepen zien op de enige glycosyleringsplek van PSA. In **hoofdstuk 3** wordt de gevoeligheid van het CE-ESI-MS platform geëvalueerd en verbeterd. Voorgaande studies hebben namelijk aangetoond dat een verhoogde gevoeligheid kon worden bereikt voor de analyse van glycopeptiden met een nanoLC-ESI-MS platform, wanneer er gebruik werd gemaakt van acetonitril als doteringsgas rond de ESI emitter. Voor de allereerste keer hebben wij (**hoofdstuk 3**) een soortgelijk principe toegepast voor een CE-ESI-MS platform. In vergelijking met de conventionele CE-ESI-MS platform kon de gevoeligheid met het gebruik van deze doteringsgas 25-voudig

worden verbeterd. Dit resulteerde in een detectie grens dat ongeëvenaard is voor nano-LC-ESI-MS platforms. Een interessante observatie was het feit dat de toevoeging van het doteringsgas een positief effect had op de herhaalbaarheid en de intermediaire precisie in vergelijking met het conventionele CE-ESI-MS platform. Het laatste hoofdstuk van de methode ontwikkeling (**hoofdstuk 4**) beschrijft de analyse van de suikergroepen die enzymatisch geknipt zijn van alle glyco-eiwitten afkomstig uit de bloedcirculatie. Door de implementatie van de ontwikkelingen uit **hoofdstuk 3** (de toepassing van het gedoteerde gas) kunnen suikergroepen die aanwezig zijn in lage hoeveelheden (relatieve hoeveelheid <0.01 %) in complexe monsters (zoals plasma) worden bestudeerd. Daarnaast biedt deze toepassing ook mogelijkheden voor het bestuderen van de suikergroepen op suikereiwitten die alleen beschikbaar zijn in lage concentraties. De scheiding van de CE kan worden belemmerd doordat de suikergroepen negatief geladen kunnen zijn (door de aanwezigheid van één of meerderde siaalzuren) of neutraal (geen siaalzuren aanwezig), tevens kan dit een afwijking in de detectie van de MS veroorzaken. Met dit probleem voor ogen is er een simpele procedure ontwikkeld voor de neutralisatie van de siaalzuren, waarbij gelijktijdig ook een onderscheid gemaakt kan worden tussen de α 2,3- en α 2,6-gebonden siaalzuren met massaspectrometrie (gebaseerd op een verschil in massa door de derivatisatie). De introductie van een permanent positief label aan het uiteinde van de suikergroep (hydrazide binding) zorgt er voor dat alle suikergroepen een identieke lading krijgen. Deze ontwikkeling heeft ervoor gezorgd dat 167 unieke suikergroepen geïdentificeerd konden worden in plasma, inclusief het onderscheid tussen de verschillende siaalzuur bindingen. Tot nu toe is dit het hoogste aantal geïdentificeerde suikergroepen in plasma, wat tegelijkertijd aangeeft dat CE-ESI-MS een krachtig platform is op het gebied van glycaan analyse.

Het derde deel van dit proefschrift combineert de bevindingen en verbeteringen van **methode ontwikkeling** om de correlatie tussen de PSA suikergroepen en prostaatkanker te bestuderen. **Hoofdstuk 5** beschrijft de ontwikkeling van een hoogwaardige PSA Glycomics Assay. Voor deze studie, hebben patiënten met een verhoogde PSA concentratie (> 3,0 ng/mL) urine gedoneerd. De PSA is ingevangen en opgeschoond vanuit deze urinemonsters en doordat het PSA enzymatisch in stukken werd geknipt, konden de glycopeptiden geanalyseerd worden met CE-ESI-MS dat gebruik maakte van het gedoteerde gas. In totaal, konden er 67 unieke suikergroepen geïdentificeerd worden in een samengevoegd urinemonster van alle patiënten. Ondanks dat dit een zeer uitvoerig onderzoek is voor de identificatie van de aanwezige suikergroepen op PSA kon er helaas, met dit onderzoek, geen onderscheid worden gemaakt tussen het PSA urine suikerprofiel van patiënten die wel of geen prostaatkanker hebben bij biopten. Dit komt zeer waarschijnlijk doordat de PSA uit urine voor het grootste gedeelte afkomstig is van de gezonde prostaatkernen.



Het laatste deel van het proefschrift (**hoofdstuk 6**) bevat een algemene discussie over toekomstige ontwikkelingen en de potentie van de beschreven PSA Glycomics Assay in **hoofdstuk 5** in een klinische omgeving. Veelbelovend lijkt de uitbreiding van de assay om de PSA suikerprofielen te bestuderen in bloed. Dit doordat de kankercellen ook PSA produceren en juist deze PSA zal in hogere mate terecht kunnen komen in het bloed. Het is namelijk de verwachting dat de PSA afkomstig van de kankercellen makkelijker naar de bloedsomloop kunnen lekken doordat de kankercellen (in vergelijking tot gezonde cellen) door de membraan kunnen breken. De verwachting is dat de suikergroepen van het PSA dat afkomstig is van de kankercellen afwijkende profielen zullen laten zien ten opzichte van PSA dat geproduceerd is door gezonde prostaatcellen. Uit verder onderzoek zal moeten blijken of dit ook daadwerkelijk het geval is en hoe deze resultaten wellicht kunnen bijdragen voor de klinische toepassing richting gepersonaliseerde geneeskunde (**personalized medicine**).