



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Glycoproteomics-based signatures of cancer cell lines

Pirro, M.

### Citation

Pirro, M. (2021, September 21). *Glycoproteomics-based signatures of cancer cell lines*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3212951>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3212951>

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

# Nederlandse samenvatting

Veranderingen in de glycosylering van eiwitten is één van de kenmerken van tumorcellen. Tumor specifieke glycaan-structuren, die in mindere mate voorkomen op normale humane cellen (of daar zelfs volledig afwezig zijn), staan bekend als tumor-geassocieerde koolhydraatantigenen (TACA). Lectines die voorkomen op immuuncellen kunnen de TACA herkennen en dit kan leiden tot een verscheidenheid aan effecten of tumorprogressie en metastase. Om de glycaan-structuren op eiwitten van tumorcellen meer specifiek in kaart te brengen zijn massaspectrometrische (MS) analysetechnieken steeds belangrijker geworden. In **Hoofdstuk 1** worden verandering in glycosylering in tumorcellen weergegeven, de rol van lectines geïntroduceerd en een overzicht gegeven van glycomics en glycoproteomics-technieken om glycosylering in kaart te brengen.

Sommige TACA hebben een eindstandige *N*-acetylgalactosamine (GalNAc). Omdat deze structuur kan worden herkend door het Macrofaag Galactose-type Lectine (MGL), wordt MGL vaak gebruikt voor glycoprofilering van verschillende adenocarcinomen. De hogere expressie van MGL-liganden op tumorweefsel is gecorreleerd met een betere prognose bij borstkankerpatiënten, terwijl het geassocieerd was met een agressiever tumorfenotype en een slechtere prognose bij patiënten met (adeno-)plaveiselcelcarcinoom en colorectaal carcinoom (CRC). MGL is aanwezig op het oppervlak van onrijpe dendritische cellen (DC's) en macrofagen. Het eerste MGL-bindende eiwit dat werd geïdentificeerd, is de tyrosine fosfatase CD45, die ten minste twee GalNAc-epitopen draagt. De MGL-CD45-interactie resulteerde in een afname van proliferatie en toename van celdood in effector T-cellen en in een model voor acute T-cel leukemie (Jurkat T-cellen). Echter, TACA-expressie beïnvloedt ook de immuunrespons door effecten op de DC's die MGL tot expressie brengen. Of deze interactie de immuun respons versterkt of verzwakt, hangt echter af van het tumortype en de ligandbinding. Het is dus belangrijk om de MGL-liganden goed in kaart te brengen. Dit kan helpen bij het ontrafelen van de intracellulaire mechanismen die door lectinebinding worden geactiveerd. In dit proefschrift is gebruik gemaakt van goed gekarakteriseerde cellijnen (Jurkat en CRC-cellijnen (HT29, HCT116 en LS174T)), om tot een breder begrip te komen van MGL-bindende glycoproteïnen. Hiervoor is een scala aan (glyco)proteomics-technieken toegepast. Daarnaast wordt in dit proefschrift een methode beschreven die kan worden

gebruikt om specifieke groepen van glycopeptiden te onderscheiden in complexe kwantitatieve proteomics-datasets.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de optimalisatie van lectine affiniteitszuivering in combinatie met proteomics-analyses voor de identificatie van tot nu toe onbekende MGL-liganden in Jurkat cellen, en geeft tevens inzicht in (de dichtheid van) *O*-glycosylering van bekende liganden, zoals CD43 en CD45. De karakterisering van MGL-bindende eiwitten van CRC-cellijnen wordt beschreven in **Hoofdstuk 3**. De studies toonden aan dat cellijnen verschillen in de mate van MGL-binding en ligandspecificiteit; MGL bindt sterk aan HCT116 en HT29 cellen, door een diverse reeks aan liganden, terwijl LS174T lage MGL-binding vertoont. Uit de gevonden glycopeptiden bleek dat sommige een LacdiNAc epitoom hadden wat aangeeft dat naast *O*-glycosylering (Tn), ook *N*-glycosylering een mogelijke rol speelt in de binding aan MGL.

De rol van *N*-glycanen bij het binden aan MGL wordt verder beschreven in **Hoofdstuk 4**, waarin de affiniteitszuivering met MGL werd uitgevoerd na behandeling van het eiwitextract met een enzym (PNGase F) dat *N*-glycanen van eiwitten afknijpt. Hieruit bleek dat *N*-glycosylering in het algemeen een belangrijkere rol speelt in de binding aan MGL dan tot nu toe werd aangenomen. Eén van de belangrijkste MGL-bindende eiwitten (Hepatocyte growth factor receptor (c-Met)) in HT29 en HCT116, bijvoorbeeld, verloor binding aan MGL na verwijdering van de *N*-glycanen. Bovendien hebben we door middel van kwantitatieve proteomics van CRC-cellijnen geprobeerd de verschillen in MGL-binding aan de cellijnen te verklaren. Hoewel er niet één centraal mechanisme aan ten grondslag lijkt te liggen, geven de resultaten in Hoofdstuk 4 aan dat GALNT3 in HT29 cellen mogelijk betrokken is bij de hogere MGL-binding. Bovendien kon een rol voor mucines, die bekend staan om hun hoge mate van *O*-glycosylering, worden uitgesloten omdat deze juist hogere niveaus bleken te hebben in de lage MGL-bindende cellijn (LS174T). Hetzelfde geldt voor verschillen in de algehele niveaus van MGL-bindende eiwitten in de verschillende cellijnen.

**Hoofdstuk 5** beschrijft een geoptimaliseerde workflow voor de isolatie en zuivering van uitgescheiden eiwitten van CRC-cellijnen. Bij gebruik van dit materiaal voor onze affiniteitszuivering met MGL bleek dat zelfs LS174T cellen, die lage MGL-binding op het celoppervlak vertoonden, glycoproteïnen uitscheiden die MGL-bindende epitopen dragen. Dit benadrukt het belang van het bestuderen van verschillende bronnen van glycoproteïnen voor dit type onderzoek.

In **Hoofdstuk 6** beschrijven we de toepassing van een methode om in een complex mengsel van (glyco)peptiden, *O*-GalNAcylering te onderscheiden van *O*-GlcNAcylering, vooral als het glycopeptide slechts één van deze HexNAc's bevat. Zonder tijdrovende verrijkmingsmethoden en specifieke deskundigheid m.b.t tot het handmatig interpreteren van MS spectra, kan deze methode worden toegepast door glyco-wetenschappers voor identificatie van deze isobare structuren. In data van onze kwantitatieve proteomics studies van CRC cellijnen, konden we duidelijk onderscheid maken tussen twee groepen geglycosyleerde peptiden met een enkele HexNAc. Eén van de peptiden met een GalNAc was afkomstig van anterior gradient protein 2 (AGR2), een eiwit waarvan de *O*-glycosylering tot nu toe slechts sporadisch was bestudeerd. Door een combinatie van verschillende experimenten konden wij onder andere aantonen op welk aminozuur de glycosylering precies zit en dat de *O*-glycosylering verschilt tussen intracellulair en uitgescheiden AGR2.

Ten slotte biedt **Hoofdstuk 7** een discussie van de methodologische uitdagingen die we tijdens het onderzoek zijn tegengekomen en de complementaire benaderingen die zijn gebruikt of beschikbaar zijn voor toekomstige experimenten. Bovendien worden de verkregen resultaten besproken in de context van de literatuur met betrekking tot de mogelijke mechanismen die betrokken zijn bij de expressie van MGL-liganden bij kanker, en de relevantie van de resultaten met betrekking tot mogelijke klinische toepassingen.

