



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Glycosylation profiling with mass spectrometry: method development and application to cancer biomarker studies

Vreeker, G.C.M.

Citation

Vreeker, G. C. M. (2021, October 28). *Glycosylation profiling with mass spectrometry: method development and application to cancer biomarker studies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3229692>

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/1887/3229692>

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

Nederlandse Samenvatting

Profilering van glycosylering met behulp van massaspectrometrie

Een *biomarker* is iets dat gemeten kan worden om de biologische toestand van een persoon te kunnen bepalen. Biomarkers worden routinematig gemeten met behulp van klinische testen voor diagnostische en therapeutische doeleinden. Hoewel deze testen een belangrijk onderdeel vormen van klinische zorgpaden, wordt algemeen erkend dat dergelijke bepalingen van bijvoorbeeld biomolecuulconcentraties kunnen verbeteren ten aanzien van de gevoeligheid en specificiteit. Bovendien is er voor veel ziekten geen detectiemethode op basis van een bloed- of urinemonsters beschikbaar en daarom is er dringend behoefte aan nieuwe biomarkers. Vanwege een wereldwijd toenemende incidentie van kanker wordt screening voor deze ziekte belangrijker. In het geval van kanker verbetert vroege detectie vaak de kans op langere overleving. Voor de opsporing van alvleesklierkanker is kernspintomografie (MRI) momenteel de gouden standaard voor de opsporing van de ziekte in hoog-risicopatiënten, echter dit is een relatief dure techniek. Voor opsporing van borstkanker wordt mammografie toegepast, hoewel deze techniek niet optimaal is voor bijvoorbeeld dicht borstweefsel en er nog veel fout positieve uitslagen gegeven worden.

Moleculaire biomarkers worden gezien als een waardevolle aanvulling op de momenteel gebruikte screeningstechnieken. Daarom richten veel studies zich op de ontwikkeling van methoden voor het verkennen van biomarkers met het oog op vroege detectie. In een gezamenlijke inspanning hebben klinici en onderzoekers nieuwe markers gezocht sinds de begindagen van *omics*. Vooral biomarkers die gemeten kunnen worden in bloed zijn interessant, omdat bloedprikken relatief laag invasief is en daardoor het risico voor de patiënt beperkt is. Voor zowel borstkanker als alvleesklierkanker zijn er meerdere kandidaat biomarkers, in de vorm van eiwitten, beschreven in de literatuur, maar om verschillende redenen worden deze nog niet in de kliniek toegepast. Een alternatieve strategie voor het vinden van nieuwe markers betreft het in kaart brengen van post-translationele modificaties (PTM's) op eiwitten; of meer in het algemeen de profilering van eiwitvormen. Het is bekend dat bij kanker de expressie van glycosyltransferasen verandert. Glycosyltransferasen zijn enzymen die suikergroepen aan elkaar verbinden, welke op hun beurt verbonden kunnen worden aan bijvoorbeeld eiwitten of lipiden. Zulke veranderingen in transferase hoeveelheden heeft onderzoekers gestimuleerd om eiwitglycosylering te bestuderen in de zoektocht naar biomarkers voor kanker.

In het eerste deel van dit proefschrift worden de huidige klinische diagnostische methoden voor de detectie van pancreas- en borstkanker beschreven waardoor het duidelijk wordt dat er behoefte is aan eenvoudige nieuwe methoden om deze ziekten vroeger op te sporen (**Hoofdstuk 1**). Bovendien worden in dit hoofdstuk de basisprincipes van humane glycosylering en de biosynthese van glycanen beschreven. Daarnaast worden de biologische functies van glycanen en de veranderingen bij kanker beschreven. Tenslotte worden de basisprincipes van glycaananalyse en de analytische methoden, zoals derivatisering en massaspectrometrie (MS), uitgelegd.

Het tweede deel van dit proefschrift is gericht op de ontwikkeling van methoden voor glycaananalyse (**Hoofdstuk 2, 3 en 4**). Een eerder ontwikkelde analysemethode voor serum/plasma eiwitglycosylering werd verder geoptimaliseerd (**Hoofdstuk 2**). Nevenreacties die kunnen optreden tijdens de derivatiseringsreactie werden geminimaliseerd, wat resulteerde in een minder complex massaspectrum. Daarnaast werd het zuiveringsprotocol aangepast en werden glycaanprofielen gemeten met behulp van een hoge-resolutie MALDI-FTICR-MS. Deze MS met ultrahoge resolutie is momenteel het meest gevoelige en nauwkeurige platform voor detectie en toekenning van glycanen. Deze geoptimaliseerde methode werd uitgebreid om naast serum- of plasma-analyse de analyse van opgedroogde bloeddruppels mogelijk te maken (**Hoofdstuk 3**). Vanuit een klinisch perspectief zijn gedroogde bloeddruppels gemakkelijker te verzamelen en verzenden. De invloed van opslagtijd en temperatuur werd geëvalueerd en hieruit werd geconcludeerd dat een gedroogde bloeddruppel een veelbelovende manier van monsterverzameling voor glycaananalyse is. In het laatste hoofdstuk van de sectie over methode-ontwikkeling is de analyse van overlappende glycaansignalen met MALDI-FTICR-MS onderzocht (**Hoofdstuk 4**). Mono- en disacharide glycaanstructuren zijn over het algemeen moeilijk te analyseren met MALDI-MS, omdat deze signalen zich vaak in het massagebied bevinden waar veel matrixsignalen aanwezig zijn. Bovendien zijn deze kleine glycanen ook moeilijk te detecteren met andere analytische platforms. MALDI-FTICR-MS met ultrahoge resolutie wordt daarom in de absorptiemodus gebruikt om de overlappende isobare signalen los van elkaar zichtbaar te maken en deze kleine glycanen met succes te identificeren in complexe monsters van cellijnen.

In het derde deel van dit proefschrift is de ontwikkelde glycaanprofileringsmethode (**Hoofdstuk 2**) toegepast om de glycaanprofielen van alvleesklierkanker te bestuderen. Een vergelijkbare methode werd gebruikt voor monsters van borstkankerpatiënten, waarbij de glycaanprofielen geëvalueerd werden als potentiële biomarkers voor de opsporing van deze ziekte (**Hoofdstuk 5 en 6**). Glycaanprofielen van twee onafhankelijke cohorten, die serum van alvleesklierkankerpatiënten

en gezonde individuen bevatten, werden gemeten en de verschillen tussen de patiënten en gezonde personen werden bestudeerd (**Hoofdstuk 5**). Er werd een toename in glycaanvertakking en -fucosylering gevonden en bovendien werd een verschuiving in siaalzuurverbinding waargenomen. Een classificatiemodel dat gemaakt werd op basis van deze glycaaninformatie, laat een goed onderscheidend vermogen zien tussen patiënten en gezonde individuen en laat daarmee de potentie van glycaanveranderingen als biomarkers zien. In de borstkankerstudie werden de glycaanprofielen van borstkankerpatiënten en gezonde vrouwen vergeleken (**Hoofdstuk 6**). Interessant is dat slechts drie glycanen verschillen tussen patiënten en gezonde vrouwen en dat ook bevindingen uit de literatuur niet konden worden gerepliceerd in deze studie. Er wordt echter opgemerkt dat de bevindingen in de literatuur erg divers zijn en ook niet altijd met elkaar overeenstemmen. Er wordt daarom verondersteld dat de afwezigheid van een sterk verschil in glycaanprofielen tussen patiënten en gezonde vrouwen kan worden verklaard door de heterogeniteit van de ziekte.

In het laatste deel van dit proefschrift wordt een algemene discussie over biomarkeronderzoek gegeven (**Hoofdstuk 7**). Hier wordt de standaardisatie van (pre-)analysemethoden en het gebruik van software voor gegevensverwerking en interpretatie besproken. Tenslotte worden de uitdagingen in translationeel onderzoek en biomarkeronderzoek voor kanker bediscussieerd. Ondanks dat de momenteel veel toegepaste enkelvoudige biomarkers een aantrekkelijk uitgangspunt zijn vanwege hun duidelijke grenswaarden, kan de combinatie van meerdere markers het mogelijk maken om beter onderscheid te kunnen maken tussen verschillende ziekten. In de toekomst zou dit kunnen leiden tot de ontwikkeling van een bloedtest voor de vroege opsporing van kanker en andere ziekten.