



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unraveling mucin type o-glycosylation signatures of colorectal cancer

Madunić. K.

Citation

Unraveling mucin type o-glycosylation signatures of colorectal cancer. (2022, March 29). *Unraveling mucin type o-glycosylation signatures of colorectal cancer.* Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3281308>

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/1887/3281308>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het oppervlak van eukaryote cellen bevat een compacte laag van oligosacchariden, ook wel glycanen genoemd. Deze glycanen zitten covalent gebonden aan zowel eiwitten als lipiden en spelen een belangrijke rol bij interactie tussen cellen onderling, maar ook tussen cellen en de extracellulaire matrix. Omdat glycosylering een belangrijke rol speelt bij verschillende cellulaire processen zoals cel proliferatie, -adhesie, -migratie en controle van de immuunrespons, worden veranderingen in glycosylering vaak aangetroffen tijdens het ontstaan en progressie van ziekten. Zo worden afwijkingen in de glycosylering bijvoorbeeld beschouwd als één van de pijlers van verschillende typen kanker, waaronder dikke darmkanker. Studies gericht op de analyse van de veranderingen in glycosylering in dikke darmkanker kunnen daarom nieuwe inzichten geven in het ontstaan en het verloop van deze ziekte.

Het belangrijkste doel van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift was het bepalen van kenmerkende mucine type *O*-glycosylering in relatie tot dikke darmkanker. Ten eerste werd hiervoor een protocol ontwikkeld waarbij, in tegenstelling tot eerder ontwikkelde methoden, 96 monsters van tumorcellijnen tegelijkertijd kunnen worden opgewerkt (**Hoofdstuk 2**). Het protocol werkt zowel voor de analyse van *N*- als *O*-glycanen. Door het te combineren met een zeer gevoelig analytische platform (poreuze grafietkoolstof vloeistofchromatografie gekoppeld met massaspectrometrie (PGC-nano-LC- MS) kan isomeerscheiding van glycanen worden bereikt met behoud van volledige structuuridentificatie. In **Hoofdstuk 3** werden verscheidene condities van de methode verder geoptimaliseerd teneinde de gevoeligheid op MS en MS/MS niveau te verbeteren. Door bijvoorbeeld stikstofgas te verrijken met een polair en protisch oplosmiddel (methanol en isopropanol) konden er meer unieke fragmenten worden waargenomen waardoor de glycaan structuren met grotere zekerheid konden worden vastgesteld (isopropanol). Daarnaast zorgde het gebruik van methanol voor een correctie van de ionisatieverschillen van glycanen die met de gekozen gradiënt snel van de chromatografische kolom elueerden.

In **Hoofdstuk 4** werd de geoptimaliseerde methode zoals beschreven in *hoofdstuk 2* toegepast voor de analyse van 26 dikke darmkanker-cellijnen. Dit resulteerde in de karakterisering van meer dan 150 unieke *O*-glycaanstructuren en gaf inzicht in de (relatieve) hoeveelheid van de verschillende glycanen in deze cellijnen. De verschillen

in glycosyleringsprofielen (glycofenotypes) correleerden voornamelijk met celdifferentiatie. Met name de goed gedifferentieerde cellijnen brachten Lewis-type antigenen tot expressie en daarnaast glycanen met LacNAc-vertakkingen. De ongedifferentieerde cellijnen daarentegen vertoonden voornamelijk bloedgroep H-antigenen en type 1 O-glycanen met sialylering. Aan de hand van informatie uit bestaande databases bleken de glycofenotypes te kunnen worden gecorreleerd met de expressie van bepaalde glycosyltransferases en transcriptiefactoren. Dit impliceert dat de veranderingen in glycosylering de verschillen in de biosynthese van de glycanen weerspiegelen en niet slechts de hoeveelheid van specifieke eiwitten. Teneinde meer inzicht te krijgen in het onderliggende mechanisme dat deze veranderingen veroorzaakt in relatie tot celdifferentiatie, onderzochten we de veranderingen in het glycoom en proteoom van een cellijn na spontane, en door butyraat gestimuleerde differentiatie *in-vitro* (**Hoofdstuk 5**). Onze analyse liet op glycoom niveau een afname zien van gefucosyleerd bloedgroep H-antigeen met cellulaire differentiatie, in combinatie met een toename van sialylering. Op proteoom niveau werd een verhoging van specifieke adhesiemoleculen waargenomen. Door deze bevindingen te combineren hebben we nieuwe hypothesen opgesteld m.b.t. glycosylering van adhesiemoleculen in relatie tot progressie van kanker.

De lokalisatie van mucinen op het celoppervlak en hun rol in biologische processen is belangrijk bij de pathogenese van kanker. Hierdoor zijn het potentiële kandidaten voor glycaan-gerichte immunotherapie. Om dit verder te onderzoeken hebben we de methodologie geoptimaliseerd zodat het mogelijk werd de N- en O-glycanen uit specifieke gebieden van (tumor)weefsel van een dikke darm te bepalen. Hiervoor zijn formaline-gefixeerde en paraffine-ingebedde weefsels gebruikt waarbij met behulp van *laser-capture* microdissectie de gebieden werden geselecteerd voor onze analyses (**Hoofdstuk 6**). Hiermee zijn er specifieke tumor-geassocieerde glycaan-antigenen geïdentificeerd die (bijna) uitsluitend tot expressie komen in de tumor weefsels en niet of nauwelijks in het gezonde weefsel. Deze kenmerken waren geassocieerd met een ontregeling van de biosynthese van glycanen in de tumorweefsels, en konden grotendeels gecorreleerd worden met *transcriptomics* data van relevante glycosyltransferasen. Deze resultaten bieden een aanzet voor de ontwikkeling van tumor specifieke immunotherapie.