



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Glycosidases as an analytical tool in glycomics assays

Rebello, O.D.

Citation

Rebello, O. D. (2022, October 13). *Glycosidases as an analytical tool in glycomics assays*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3480319>

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/1887/3480319>

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

Nederlandse samenvatting

Het belang van glycosylering met betrekking tot gezondheid is uitvoerig aangetoond in medisch en klinisch onderzoek met als gevolg een nieuwe behoefte aan nauwkeurige *glycomics assays*. De ontwikkeling van deze testen is niet alleen waardevol voor het uitvoeren van academisch onderzoek, maar is ook gewenst voor industriële toepassingen met hoge doorvoer van kwaliteitscontrole, kwaliteitsborging en glycaanprofilering bij contractonderzoek. Precisie *glycomics assays* zijn vaak gebaseerd op chromatografische en massaspectrometrische technieken die een infrastructuur en technische vaardigheden vereisen die niet eenvoudig voorhanden zijn. Dit creëert een vraag in de industrie naar de ontwikkeling van *glycomics assays* die lage infrastructuurkosten hebben en die gebruiksvriendelijk zijn met minimale trainingsvereisten.

Hoofdstuk 1 van dit proefschrift geeft een introductie van ziekte-geassocieerde *N*-glycosyleringsveranderingen die zijn waargenomen in humaan plasma en de verschillende analytische technieken die voor hun analyse worden gebruikt. Er wordt een beschrijving gegeven van de voordelen en uitdagingen van chromatografie- en massaspectrometrietechnieken die veel worden gebruikt bij industriële glycaanprofilering. Deze toepassingen maken vaak gebruik van glyco-enzymen en de rol van deze enzymen als analytisch hulpmiddel bij *glycomics assays* wordt beschreven. Hoofdstuk 1 wordt afgesloten met het kaderen van dit proefschrift, in het kort is dit de ontwikkeling van nieuwe *glycomics assays* met hoge doorvoer via een vernieuwde benadering van op exoglycosidase gebaseerde glycaanprofilering.

De testen die in dit proefschrift zijn ontwikkeld, zijn in hoge mate afhankelijk van de exoglycosidasen voor hun nauwkeurigheid en precisie. Het was daarom van groot belang exoglycosidasen te verkrijgen met bepaalde gewenste eigenschappen. Hoofdstuk 2 schetst de strategie voor het evalueren van exoglycosidasen uit natuurlijke bronnen. Een metagenomische studie van een darmbacterioom bracht bepaalde genen aan het licht die codeerden voor antennefucosidasen. Deze hypothetisch verwachte enzymen werden op recombinante wijze tot expressie gebracht en er werd aangetoond dat ze inderdaad een antennefucosidase-activiteit hebben door een algemeen gebruikte industriële vloeistofchromatografie-massaspectrometrietechniek. Opmerkelijk was dat één van de enzymen in staat was om van *N*-glycaan antennes een fucoseresidu dat $\alpha(1-3/4)$ gebonden is aan gesialyleerde armen te verwijderen, wat het een interessant hulpmiddel maakt bij glycanprofilering. Dit is een nieuwe en voorheen niet-gerapporteerde activiteit voor een antennefucosidase. Een diepgaande structurele studie van het enzym onthulde het mechanisme voor zijn nieuwe activiteit.

Het vinden van nieuwe enzymen voor gewenste eigenschappen en het begrijpen van hun specificiteit is niet altijd zo eenvoudig als wordt geïllustreerd in hoofdstuk 2. Hoofdstuk 3 schetst een dergelijk scenario bij het verkrijgen van een *N*-acetylglucosaminidase dat potentieel heeft voor industriële toepassingen. Van dit enzym werd gemeld dat het specifiek de zogenaamde *bisecting N*-acetylglucosamine uit *N*-glycanen kan verwijderen, waarmee het nieuw zou zijn in zijn activiteit. Een dergelijke activiteit is van belang bij glycaanprofilering. Een structurele studie van de *N*-acetylglucosaminidase werd uitgevoerd om het mechanisme

en de specificiteit ervan te begrijpen. De resultaten waren echter niet eenduidig en daarom is verder onderzoek naar het mechanisme vereist.

Het belangrijkste doel van dit proefschrift is de ontwikkeling van op exoglycosidase gebaseerde *glycomics assays* die potentieel hebben voor industriële toepassingen en commercialisering. Deze assays moeten voldoen aan een hoge doorvoer, dienen gebruiksvriendelijk en kosteneffectief te zijn en verder een commercialiseringspotentieel te hebben als analytische kits. Bovendien moeten deze testen een unieke benadering bieden voor een belangrijke analytische uitdaging.

De eerste analytische uitdaging die werd geïdentificeerd, was de kwantificering van antenne-fucosylering in *N*-glycosylering van humaan plasma. Deze glycosyleringseigenschap wordt vaak geassocieerd met ontstekingsziekten zoals auto-immuunziekten, diabetes en kanker, en is dus relevant in de medische wetenschappen. De industriële technieken die gebruikt worden voor de kwantificering van antennefucosylering zijn gebaseerd op HILIC(LC)-FLD/MSⁿ. Vaak nemen deze chromatografietechnieken enkele minuten tot een uur in beslag voor de analyse van een enkel monster. In dit opzicht is MALDI-TOF-MS de superieure techniek als het gaat om *high-throughput analyse*. Hoofdstuk 4 introduceert een nieuwe op MALDI-TOF-MS gebaseerde test voor de kwantificering van antenne-fucosylering op *N*-glycosylering in humaan plasma. De zogenaamde core-fucosylering van *N*-glycanen werd verwijderd door exoglycosidasen en de resterende antennefucosylering werd gekwantificeerd. Door deze workflow te combineren met derivatisering van siaalzuur, konden sialyl Lewis X/A-epitopen worden gekwantificeerd. Deze op MALDI gebaseerde test presteerde niet alleen beter dan een industriële LC-FLD-MSⁿ-techniek, maar verminderde ook aanzienlijk de benodigde tijd voor analyse, wat een belangrijke wenselijke eigenschap is in industriële analytische laboratoria.

De tweede analytische uitdaging was de ontwikkeling van spectrofotometrische testen die geen chromatografie en massaspectrometrie toepassen. Dit type assays heeft commercieel belang omdat ze gemakkelijk als kits kunnen worden geproduceerd en geschikt zijn voor een grote klantenkring van laboratoria die niet zijn uitgerust voor routinematige *high-end glycomics-analyse*. Hoofdstuk 5 introduceert een nieuwe op platen gebaseerde spectrofotometrische test voor de kwantificering van galactosylering en sialylering op humane antilichamen. Exoglycosidasen worden gebruikt voor het verwijderen van siaalzuren en galactoseresiduen uit de glycoproteïnen. Deze vrijgekomen residuen worden onderworpen aan een redoxreactie die een fluorescentiesignaal produceert dat wordt gekwantificeerd. Deze test bleek even goed te presteren als een industriële LC-FLD-MSⁿ-techniek voor glycanprofilering van antilichamen, terwijl de infrastructuur of vaardigheden van een *glycomics* laboratorium met massaspectrometrie niet nodig waren.

Tenslotte worden de analytische uitdagingen voor het kwantificeren van *N*-glycosylering besproken in hoofdstuk 6 met betrekking tot de ontwikkeling van assays. Ten eerste worden de huidige veelgebruikte technieken van chromatografie, elektroforese en massaspectrometrie besproken, samen met de minder populaire technieken van glycan/lectine *microarrays*. De algemene voor- en nadelen van deze technieken worden geschetst en geëvalueerd. Vervolgens worden de belangrijkste en meest kritische kenmerken

van *glycomics assays* voor industriële toepassingen in detail besproken. Veel van deze testen zijn gebaseerd op LC-FLD/-MSⁿ-technieken en hun moleculaire identificatie-opties worden uitgebreid besproken. Dit omvat door botsingen geïnduceerde dissociatie, derivatisering en op exoglycosidase gebaseerde profilering. Tenslotte wordt het belang van glycosidasen in de industrie besproken, met name de noodzaak om exoglycosidase te sourcen en/of te engineeren als analytische hulpmiddelen in industriële glycanprofileringstoepassingen.