



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Glycoproteomics assays for prostate cancer biomarker discovery

Wang, W.

### Citation

Wang, W. (2024, February 20). *Glycoproteomics assays for prostate cancer biomarker discovery*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3719818>

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/1887/3719818>

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


## Nederlandse samenvatting

Wereldwijd is prostaatcancer (PCa) is de op één na meest voorkomende kanker wanneer incidentie wordt gecorrigeerd naar leeftijd. De belangrijkste methode voor vroegdiagnostiek van PCa is gebaseerd op de concentratiebepaling van prostaat-specifiek antigeen (PSA) in serum, waarbij verhoogde niveaus (> 3 ng/mL in Nederland; > 4 ng/mL in de Verenigde Staten) worden beschouwd als *mogelijke* aanwezigheid van PCa. Echter, deze conventionele PSA test gaat gepaard met een lage specificiteit, waardoor het een klinische uitdaging blijft PCa te onderscheiden van benigne prostaat hyperplasie (BPH) of de relatief langzaam groeiende (indolente) vorm te onderscheiden van agressieve vormen. Er is daarom sterk behoefte aan een meer specifieke *biomarker* voor zowel vroegdetectie van PCa als stratificatie. In voorgaande onderzoeken zijn er veranderingen in glycosylering gevonden in twee door de prostaat gesecreteerde glycoproteïnen, namelijk PSA en *prostatic acid phosphatase* (PAP) in patiënten met prostaatcancer. Voorbeelden van glycosyleringsvariëaties hierbij waren  $\alpha$ -2,3 sialylering, fucosylering en de hoeveelheid LacdiNAc<sup>2</sup>. Het doel van het onderzoek dat is beschreven in dit proefschrift was het identificeren van PCa *biomarkers* ten behoeve van vroegdetectie en verbetering van patiëntstratificatie aan de hand van glycosyleringsprofielen van PSA en PAP. Daarnaast werd glycosylering van PSA bestudeerd in de context van onvruchtbaarheid bij mannen. Hiervoor zijn *glycoproteomic* methoden ontwikkeld die gebaseerd zijn op massaspectrometrie (MS), welke vervolgens zijn toegepast voor het verkrijgen van zogenaamde glycoprofielen van PSA en PAP na isolatie uit verschillende lichaamsvloeistoffen.

In Hoofdstuk 1 wordt een overzicht gegeven van de achtergrond van en klinische behoeften bij prostaatcancer en onvruchtbaarheid bij mannen. Tevens wordt PAP- en PSA glycosylering bij PCa beschreven en worden analytische strategieën voor opheldering van eiwitglycosylering geïllustreerd. In Hoofdstuk 2 wordt de ontwikkeling van een gedetailleerde *glycoproteomic* assay beschreven ten behoeve van opheldering van PAP glycosylering met behulp van capillaire elektroforese (CE) MS. Deze assay werd met succes ingezet bij het meten van patiënturines verkregen na rectaal toucher. Op PAP werden drie *N*-linked glycosyleringsposities geïdentificeerd en gekarakteriseerd, met op elke positie verschillende glycosyleringsprofielen, onder andere met isomere structuren die verschillen in bindingstype van sialzuren. In Hoofdstuk 3 is een mogelijk verband tussen PSA glycosylering en onvruchtbaarheid bij mannen onderzocht. Hiervoor werd een analytische methode ontwikkeld gebaseerd op matrixgeassisteerde laser desorptie/ionisatie (MALDI) MS inclusief een tweestaps sialzuurderivatisering die specifiek is voor het bindingstype. Deze methode werd vervolgens ingezet voor het meten van PSA glycosylering (afkomstig uit

2 Antennaire structuur waarbij *N*-acetylgalactosamine  $\beta$ 1,4-verbonden is aan een *N*-acetylglucosamine.





semen) en er werd geen verband gevonden met vruchtbaarheid. Andere in semen aanwezige eiwitten dienen verder onderzocht te worden met betrekking tot veranderingen in eiwitglycosylering. Heel interessant was de ontdekking van de (in zoogdieren zeldzame) glycosyleringsbouwsteen ketodeoxynonaanzuur (Kdn) in PSA uit semen (Hoofdstuk 4). Vervolgens werd deze bouwsteen ook aangetroffen in glycaanstructuren op PSA uit urine en in glycaanstructuren op PAP uit semen en urine. De aanwezigheid van Kdn-bouwstenen in *N*-glycanen op PSA met een unieke  $\alpha$ -2,3 binding werd bevestigd door vier complementaire MS-benaderingen. Deze ontdekking stimuleerde ons de aanwezigheid van Kdn in alle humane glycoproteïnen te evalueren aan de hand van publiek beschikbare datasets (Hoofdstuk 6). Opmerkelijk is dat Kdn ook werd gevonden in *N*-glycanen van  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in humaan plasma. Additioneel onderzoek is noodzakelijk voor de opheldering van de biologische rol van Kdn in humane glycoproteïnen en of deze bouwsteen wel-of-geen rol speelt bij ziekten zoals PCa. Een hypothese bij het onderzoek dat is beschreven in dit proefschrift is dat plasma PSA voornamelijk wordt gevormd in kankercellen en daarbij kankerspecifiek geglycosyleerd wordt, terwijl urine PSA met name gevormd wordt in normale prostaatcellen met individu-specifieke glycosylering. De combinatie van deze twee kan dan dienen als basis voor persoonlijke diagnose en prognose van PCa (“zorg op maat”). Teneinde deze hypothese te testen werd de *glycoproteomic* assay uit Hoofdstuk 3 verder uitgebreid voor de analyse van plasma PSA (Hoofdstuk 5). Voor plasma PSA analyses is een verbeterde gevoeligheid vereist en hiervoor werd *reversed-phase* vloeistofchromatografie ingezet. Daarnaast werd TMT multiplex labeling uitgevoerd voorafgaand aan de eerder ontwikkelde siaalzuurderivatisering, waarmee de monsterdoorvoer en ionisatiegevoeligheid van glycopeptiden werd verbeterd. Tevens maakt TMT simultane analyse van gepaarde monsters mogelijk. Met deze assay konden 20 verschillende PSA glycovormen uit 24 nanogram materiaal worden geïdentificeerd (uit 4 milliliter plasma). Op dit moment wordt een eerste studie uitgevoerd op een klein cohort van gepaard plasma- en urinemonsters (9 individuen PCa versus geen PCa). Dit onderzoek zal inzicht verschaffen in glycosyleringsverschillen tussen PSA geïsoleerd uit plasma en urine en potentiële *biomarkers* voor PCa opleveren. Tenslotte worden de voor- en nadelen van verschillende zogenaamde *bottom-up glycoproteomics* methoden beschreven met betrekking tot detail van de analyse, doorvoertijd en gevoeligheid (Hoofdstuk 6). In een algemene discussie wordt afgesloten met een blik op de toekomst en mogelijke applicaties in het veld van *biomarkers* voor PCa en onvruchtbaarheid. Het werk dat is beschreven in dit proefschrift is een volgende stap in de richting van verbeterde diagnose en stratificatie van prostaatkanker.