



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Glycosylation analysis of immune-related molecules

Borosak, I.

Citation

Borosak, I. (2024, October 1). *Glycosylation analysis of immune-related molecules*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4093406>

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/1887/4093406>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het immuunsysteem bestaat uit een complex netwerk van organen, weefsels en lichaamscellen met verschillende biomoleculen waarvan glycoproteïnen een belangrijk onderdeel zijn. Elk glycoproteïne (gecodeerd door één gen) verschijnt in meerdere glycovormen die verschillen in compositie en/of structuur van de glycanen. Deze glycanen zijn covalent gebonden aan specifieke aminozuren op een specifieke locatie van het glycoproteïne (glycosyleringsplaats). Overigens hoeft niet elke glycosyleringsplaats in een glycoproteïne volledig geglycosyleerd te zijn (bezettingsgraad). Glycanen die zijn verbonden aan immunologisch relevante moleculen moduleren de eiwitstructuur en -functie, eigenschappen die belangrijk zijn bij cel-cel herkenning, signaaltransductie en interactie met andere glycoproteïnen of de extracellulaire matrix. Op deze manier spelen glycanen een rol bij het initiëren en reguleren van zowel de adaptieve als aangeboren immuunrespons. Veranderingen in eiwitglycosylering als gevolg van (epi)genetische of omgevingsfactoren hebben een impact op de immuunfunctie en zijn geassocieerd met immunopathologische processen. Een voorbeeld hiervan is glycosylering van immunoglobuline G (IgG), waarbij veranderingen gevolgen hebben voor complement-activering en antilichaam-gereguleerde cytotoxiciteit van cellen. Het is daarom belangrijk methodes te ontwikkelen die eiwitglycosylering gedetailleerd in kaart kunnen brengen en die bijdragen aan het begrip van immunologisch relevante glycoproteïnen en daarmee translatie naar klinische toepassingen mogelijk maken. Deze kennis zal helpen bij het ontcijferen van immunologische processen bij ziekte en gezondheid, het implementeren van klinische markers voor vroegdetectie, en het optimaliseren van glycosylering van biofarmaceutische producten voor verbeterde therapie.

In dit proefschrift zullen de complexe associaties tussen glycosylering van immunologisch relevante moleculen en klinische verschijnselen met verschillende biologische context worden besproken. Voor het onderzoek dat hier is beschreven wordt gebruikt gemaakt van de nieuwste analytische methoden op gebied van vloeistofchromatografie (LC) en massaspectrometrie (MS). Specifieke glycaansignaturen van antilichamen in verschillende populatiestudies worden gerapporteerd. Daarnaast zijn deze methoden ingezet bij het bestuderen van andere eiwitten (namelijk Fc gamma receptoren FcγRs) en de analyse van glycoproteïnen in een alternatieve matrix (zoals semen). Na uitvoerige analyses werden nieuwe associaties gevonden tussen glycosyleringspatronen, structuurdeterminanten en pathofysiologische veranderingen, die het belang van glycosylering in immuunmodulatie onderstrepen.

In **Hoofdstuk 1** wordt het belang van eiwitglycosylering in het immuunsysteem beschreven, met speciale aandacht voor verschillende proteovormen van IgG en FcγRs op immuunrespons. N-glycosylering is op een complexe manier gereguleerd door een combinatie van de metabole toestand van een cel en omgevingsfactoren. N-glycosylering speelt een belangrijke rol in immunologische processen zoals intrinsieke en extrinsieke herkenningsmechanismen, signaaltransductie en effectorfuncties. Afwijkingen in

glycosyleringspatronen hebben een grote invloed op fundamentele immunologische processen en hun associatie met ontstekings- en autoimmuunziekten. Daarnaast worden in dit hoofdstuk ontwikkelingen in MS-technologie besproken die geschikt zijn voor het bepalen van ziekte-specifieke signatures. Tenslotte wordt een overzicht gegeven van de klinische implicaties van afwijkingen met betrekking tot glycosylering en het toepassen van immunologisch relevante glycoproteïnen als diagnostische of prognostische ziektemarker. Zowel de regulering als de functie van IgG Fc-glycosylering zijn niet volledig opgehelderd, ondanks vele studies die zijn uitgevoerd bij verschillende klinische condities. In **Hoofdstuk 2** is de rol van de milt en splenectomie op IgG Fc-glycosylering bestudeerd door gebruik te maken van een geavanceerde LC-MS *glycoproteomics* strategie. IgG uit plasmamonsters van gezonde individuen met intacte milt (n = 165) werd vergeleken met IgG van personen bij wie de milt verwijderd is na trauma (n = 38), of als gevolg van immuun trombocytopenie (ITP, n = 35) of sferocytose (n = 16). Er werd gevonden dat splenectomie resulteerde in een toegenomen hoeveelheid IgG1 en IgG2/3 fucosylering, met name in het geval van trauma en ITP. Daarnaast liet deze laatste groep lagere IgG1 fucosylering zien vergeleken met gezonde controles, dit impliceert een veranderde immuunrespons bij deze autoimmuunziekte. Samenvattend lieten deze resultaten zien dat de milt een belangrijke rol speelt bij het vormen en onderhouden van niet-gefucosyleerd IgG. Meer onderzoek is noodzakelijk teneinde de mechanismen te achterhalen die aan deze veranderingen ten grondslag liggen.

In het algemeen vormen glycosyleringspatronen van antilichamen een potentiële klinische applicatie voor het onderscheiden van zieke en gezonde individuen. Even belangrijk is echter dat zulke profielen inzicht kunnen geven in een bepaalde ziekte of de kans op terugkeren van een ziekte (recidive). Hiermee wordt het persoonlijk monitoren van het ziekteverloop en de behandeling van een patiënt mogelijk. In **Hoofdstuk 3** wordt bestudeerd welk potentieel IgG Fc-glycosylering heeft als prognostische marker voor recidive bij patiënten met *anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis* (AAV). Hierbij zijn serummonsters van 89 AAV patiënten verzameld op verschillende tijdstippen in de periode tussen diagnose en terugkeer van ziekte. Totaal IgG glycosylering werd bepaald met LC-MS waarbij nauwkeurig de longitudinale verschillen tussen initiële behandeling, therapie, follow-up en recidive werden geëvalueerd. De resultaten lieten een verschil in IgG Fc-sialylering en *bisection* zien tussen patiënten met en zonder recidive. De afname in IgG sialylering werd reeds vastgesteld maanden vóór terugkomst van de ziekte, wat de bruikbaarheid als recidive-marker onderstreept. De hoeveelheid *bisection* verschilde tussen patiënten met en zonder recidive zelfs al op tijdstip van diagnose en correleerde met effectiviteit van de behandeling. Deze verschillen tussen patiënten met en zonder recidive zijn veelbelovend voor het verbeteren van patiëntperspectief door ANCA-detectie te combineren met IgG Fc-glycosylering.

Tot dusver beschreven de meeste glycosyleringsstudies IgG, wellicht omdat dit glycoproteïne in een relatief hoge concentratie in bloed voorkomt en de

glycosyleringsprofielen eenvoudig zijn. Echter, in het licht van initiatie en regulering van immuunrespons is het niet alleen belangrijk naar IgG glycosylering te kijken, maar ook naar de corresponderende receptoren, zoals Fc-receptor FcγRIIIb welke uitsluitend op granulocyten wordt aangetroffen. In **Hoofdstuk 4** wordt een nieuwe *glycoproteomics* methode ingezet om 4 tot 6 mogelijke glycosyleringsplaatsen van FcγRIIIb in kaart te brengen. Hierbij is FcγRIIIb geïsoleerd uit humane neutrofielen, gevolgd door in-gel digestie en LC-MS/MS analyse van (glyco)peptiden. De resultaten lieten een complex beeld van FcγRIIIb glycosylering zien, met variaties in glykaancompositie en -bezetting op elke afzonderlijke glycosyleringsplaats. Zo werd op plaats N45 uitsluitend core-fucosylering aangetroffen, terwijl aminozuren N74 en N169 voornamelijk antenne-fucosylering lieten zien (aminozuur N162 had beide vormen). Aan de hand van aminozuren N74 en N169, die niet eerder zijn bestudeerd, werd gevonden dat FcγRIIIb glycosyleringsprofielen van neutrofielen verschilden van de oplosbare vorm (in de circulatie) en homologe FcγRIIIa. Daarnaast werden er verschillen gevonden in de bezettingsgraad op aminozuur N64. Bij FcγRIIIb op neutrofielen was N64 niet geglycosyleerd, terwijl in de oplosbare vorm sterk vertakte glykaanstructuren werden aangetroffen. Daarnaast verschilden FcγRIIIb en FcγRIIIa voor wat betreft de hoeveelheid antennaire structuren, waarbij de eerste hoge niveaus van antennaire fucosylering liet zien op aminozuren N74, N162 en N169. Deze bevindingen onderstrepen het belang van glycosylering bij het moduleren van de functie van FcγRIIIb. Tenslotte dient opgemerkt dat de gebruikte methodologie geschikt is voor toekomstig onderzoek van de rol van FcγRIIIb glycosylering in verschillende fysiologische en pathologische context, met implicaties voor therapeutische interventie en precisiegeneeskunde in het algemeen.

Verschillende analytische strategieën worden toegepast voor *high-throughput* analyse van N-glycanen. In de voorgaande hoofdstukken werden glycanen geïdentificeerd in glycopeptide-vorm, in het volgende hoofdstuk worden deze gekarakteriseerd als van-eiwit-vrijgemaakte N-glycanen. Een innovatie op het gebied van vrijgemaakte N-glycanen past RapiFluor-MS toe, waarbij een fluorescent molecuul (met een quinoline fluorofoor) gekoppeld wordt aan een glykaan met als voordeel een vereenvoudigde monstervoorbewerking en detectie met behulp van fluorescentie. In **Hoofdstuk 5** wordt de ontwikkeling en optimalisering van een hydrofiele interactie LC-MS methode beschreven voor de analyse van met RapiFluor-MS gekoppelde N-glycanen uit serum- en plasmamonsters. Er konden 44 verschillende pieken worden gescheiden waarbij 72 composities werden vastgesteld. De methode is geschikt voor het evalueren van biologische variaties en biomarker kandidaten in grote cohorten, en kan tevens worden ingezet bij ontwikkeling van biofarmaceutische producten.

De beschreven N-glycoom strategieën zijn eveneens geschikt voor de analyse van alternatieve lichaamsvloeistoffen, zoals semen. In **Hoofdstuk 6** is de correlatie tussen N-glycosylering en het mannelijk reproductiesysteem bestudeerd aan de hand van afwijkend

semen materiaal. Factoren die een rol spelen bij kwaliteitsverlies van zaadcellen en onvruchtbaarheid bij mannen zijn afwijkingen in de hormoonhuishouding, leefstijl (roken, alcohol, omgevingsfactoren) en genetische afwijkingen. Heel specifiek is er gekeken naar de associatie tussen semen N-glycoomprofielen, semen DNA fragmentatie (SDF) en omgevingsparameters in mannen met normale ($n = 82$) en afwijkende ($n = 84$) semen parameters. In de eerste groep werden significante associaties waargenomen tussen gesialyleerde N-glycanen met SDF en blootstelling aan fotokopiëren en roken. In de tweede groep werd een significante associatie waargenomen tussen diantennaire digalactosyleerde N-glycanen met zowel core- als antenne-fucosylering en roken. Geconcludeerd werd dat een afgenomen kwaliteit van semen correleerde met afwijkingen in het N-glycaan profiel en dat deze bevindingen als startpunt kunnen fungeren voor het verder ontwikkelen van N-glycanen als potentiële marker voor blootstelling aan omgevingsfactoren met betrekking tot vruchtbaarheidsrisico's voor mannen.

Dit proefschrift sluit af met een algemene discussie in **Hoofdstuk 7**. Het beschreven onderzoek wordt in het licht van recente literatuur besproken evenals de voordelen van glycosyleringsanalyses met behulp van massaspectrometrie voor klinisch biomarker onderzoek. Vervolgens wordt er een kritische evaluatie gegeven over of en hoe deze analytische strategieën en glycosyleringsprofielen hun weg kunnen vinden in de klinische praktijk. Er wordt een inkijk gegeven in platforms die geen gebruik maken van MS en daarmee potentieel eenvoudiger en goedkoper te implementeren zijn in een klinische setting. Tenslotte worden nieuwe, potentiële glycosyleringsmarkers besproken in de context van precisiegeneeskunde ("zorg op maat") en wordt geconcludeerd dat deze geïntegreerd dienen te worden met bestaande markers teneinde sensitiviteit en specificiteit op een multiparameter manier te verbeteren.