



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Biomarker discovery in diabetes mellitus and lipid metabolism: multi-platform glyco(proteo)mic approaches

Demus, D.A.

Citation

Demus, D. A. (2024, October 1). *Biomarker discovery in diabetes mellitus and lipid metabolism: multi-platform glyco(proteo)mic approaches*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4093481>

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/1887/4093481>

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

Nederlandse Samenvatting

In het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift ligt de nadruk op het onderzoek naar biomarkers in diabetes, dat wil zeggen de ziekte-gerelateerde parameters, de mogelijke klinische implicaties hiervan en de ontwikkeling van analytische methodes. Glycan biomarkers zijn veelbelovende hulpmiddelen voor de diagnose, prognose en het monitoren van verschillende ziekten, waaronder kanker, auto-immuunziekten en infectieziekten. In dit proefschrift ligt de focus op de ontwikkeling en optimalisering van analytische methoden voor het onderzoeken van veranderingen in glycosylerings profielen als potentiële biomarkers in grootschalige klinische cohorten van patiënten met diabetes en gerelateerde complicaties van deze ziekte.

Het doel van het onderzoek richt zich op het aanpakken van de uitdagingen die zich uitend tijdens high-throughput monsterbereiding voor de analyse van glycosylering, data verwerking en statistische analyse. De ontwikkelde methoden zijn toepasbaar voor het analyseren van *N*-glycanen, *O*-glycosyleerde eiwitten en voor de bepaling van absolute fucosylatieniveaus van eiwitten in bloedplasma.

Het proefschrift leidt in met een algemene beschrijving over de verschillende soorten glycosylering, glyco(proteo)mics analytische benaderingen en de ontdekking van glycan biomarkers in diabetes (**Hoofdstuk 1**). Het onderzoek begint met een studie naar de *N*-glycan antenne fucosylering als biomarker voor de monogene vorm van diabetes, HNF1A-MODY (**Hoofdstuk 2**). Individuen met HNF1A-MODY zijn dragers van varianten in het *HNF1A* gen, dit gen codeert de transcriptie factor HNF1 α , welk een cruciaal onderdeel is voor de regulatie van plasma eiwit fucosylatie. De aanwezigheid van de varianten in het *HNF1A* gen leidt tot verhoging van core fucosylatie and verlaging van antenne fucosylatie van *N*-glycanen. De ontwikkeling van een nieuwe vloeistofchromatografie in combinatie met tandemmassaspectrometrie (LC-MS/MS) methode voor de bepaling van fucosyleringsniveaus in 320 bloedplasma samples van diabetes patiënten en om de diagnostische potentie van de biomarker te evalueren

tussen twee verschillende onderzoekscentra. De resultaten lieten een sterke correlatie van de gemeten fucosyleringsniveaus zien tussen de twee centra, met correlatiecoëfficiënten tot 0,88 voor de relevante glycosylerings profielen. De verbeterde chromatografische scheiding maakte identificatie van zes glycaan kenmerken en een afgeleide antenne fucosyleringskenmerk mogelijk. De bevindingen waren effectief in het differentiëren van dragers van pathogene mutaties en degenen met goedaardige of geen mutaties, met een 'area under the curve' (AUC) tot 0,94 in een signaaldetectietheorie analyse (*receiver operating characteristic* (ROC) curve-analyse).

De daaropvolgende studie introduceert een enzymatische test op plaat voor het beoordelen van α 1-3,4 fucosyleringsniveaus, met als doel de toepasbaarheid obstakels van LC-methodes in een klinische setting te overwinnen (**Hoofdstuk 3**). Vorig onderzoek heeft de effectiviteit van de *N*-glycan biomarkers aangetoond bij het differentiëren van HNF1A-MODY patiënten met behulp van LC methoden. In de huidige studie werd een high-throughput exoglycosidase op een plaat test ontwikkeld om α 1-3,4 fucosyleringsniveaus in bloedplasma'samples te meten. De methode werd geoptimaliseerd en gevalideerd met een cohort van 1000 klinische monsters van jongvolwassen patiënten met diabetes, inclusief HNF1A-MODY en type 2 diabetes samples. De α 1-3,4 fucosyleringsniveaus differentieerden effectief gevallen met pathogene *HNF1A*-varianten, met een AUC-waarde van 0,87. Deze methode werd geëvalueerd ten opzichte van eerder beschreven LC-methoden.

In het tweede deel van het onderzoek worden veranderde apolipoproteïne CIII (apo-CIII) *O*-glycaan profielen die verband houden met verhoogde triglyceride niveaus in plasma bij diabetische dyslipidemie onderzocht. Een gevorderde geautomatiseerde ultra-hoge resolutie MALDI-FTICR MS-methode voor het analyseren van intact apo-CIII werd geoptimaliseerd voor de analyse van grootschalige cohort geïntegreerd met een chemische oxidatiestap om methionine-oxidatie heterogeniteit en spectrumcomplexiteit te verminderen (**Hoofdstuk 4**). Sinapinic acid matrix

minimaliseerde het verlies van siaalzuur tijdens de MALDI-meting, en de software, MassyTools werd toegepast voor gestandaardiseerde en geautomatiseerde MS-dataverwerking en kwaliteitscontrole. De methode werd toegepast op 771 plasmasamples van individuen zonder diabetes om relatieve niveaus van apo-CIII glycovormen te beoordelen, dit valideerde de methode met betrekking tot de relatie tussen apo-CIII glycovormen en lipidenbiomarkers. De studie ondersteunt de hypothese dat apo-CIII sialylering triglyceride opruiming beïnvloedt, onafhankelijk van de body mass index.

Vervolgens werd de geoptimaliseerde MALDI MS-gebaseerde analytische workflow toegepast op een grootschalige patiënten cohort met 2318 deelnemers uit de DiaGene studie, zowel met als zonder type 2 diabetes (**Hoofdstuk 5**). Deze studie had als doel te ontrafelen hoe apo-CIII glycosylering lipidenkenmerken beïnvloedt en associeert met de prevalentie van type 2 diabetes, en om de genetische basis van deze effecten te verkennen via een genoom associatiestudie (genome wide association study, GWAS). Varianten in het *GALNT2*-gen, die verband worden gebracht met de over expressie van het *O*-glycosylerende enzym *GALNT2*, en het *IFT172*-gen werden geassocieerd met specifieke apo-CIII glycosylerings patronen, high-density-lipoproteïne (HDL) cholesterol en triglycerideniveaus. Hoge niveaus van niet-glycosyleerde apo-CIII (apo-CIII_{0a}) werden geassocieerd met verhoogde HDL-cholesterol en triglyceriden, terwijl disialylering van apo-CIII (apo-CIII₂) zelf werd gekoppeld aan lagere triglycerideniveaus. Replicatie van deze genetische associaties met de lipiden niveaus werd uitgevoerd in een extra cohort van 5409 individuen uit het Diabetes Care System.

In het laatste gedeelte van het proefschrift wordt een studie beschreven met associaties tussen apo-CIII glycosylering, genetische varianten, en micro- en macrovasculaire complicaties van diabetes (retinopathie, nefropathie, neuropathie, cardiovasculaire ziekte) in twee cohorten: de DiaGene studie, n = 1571 en de Hoorn DCS cohort, n = 5409 (**Hoofdstuk 6**). Mono-sialylering apo-CIII (apo-CIII₁) en disialylering apo-CIII (apo-CIII₂) werden geassocieerd met respectievelijk een verminderd en

verhoogd risico op retinopathie. De *GALNT2*-genvariant rs4846913, die geassocieerd is met lagere glycosyleerde apo-CIII (apo-CIII_{0a}) niveaus, werd gekoppeld aan een verminderd prevalentie van retinopathie. Hogere niveaus van apo-CIII₁ werden geassocieerd met een verhoogd risico op neuropathie en lagere niveaus van apo-CIII_{0a} werden geassocieerd met een verminderd risico op macrovasculaire complicaties.

Het proefschrift wordt afgesloten met een kritische evaluatie van de onderzoeksresultaten en hun potentiële klinische implicaties. Uitdagingen bij het vertalen van glycan biomarkers naar de klinische praktijk worden besproken, samen met de evaluatie van analytische methoden en statistische benaderingen voor gebruik in de biofarmaceutische industrie.