

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Ocena O-glikozylacji glikoprotein plazmy nasienia i jej potencjalnego związku z męskim potencjałem rozrodczym

Justyna Szczykutowicz

Wstęp

Plazma nasienia długo była uważana jedynie za medium umożliwiające dostarczenie plemników w dobrej kondycji do żeńskich dróg rodnych. Z czasem, zaczęto przypisywać jej szerszą rolę funkcjonalną, mającą znaczenie w skutecznej reprodukcji. Szczególnie interesującym aspektem jest udział składników plazmy nasienia w regulacji matczynej odpowiedzi immunologicznej względem męskich gamet, a także rozwijającego się zarodka. Według hipotezy obrony fetoembrionalnej w rozwoju tolerancji immunologicznej podczas zapłodnienia i ciąży biorą udział rozpoznawane przez układ odpornościowy matki reszty cukrowe, prezentowane przez glikoproteiny. Hipoteza zakłada, że oddziaływania białko-cukier w żeńskim układzie rozrodczym w okresie postkoitalnym są podobne do mechanizmów wykorzystywanych przez patogeny i komórki nowotworowe do ucieczki spod kontroli układu odpornościowego gospodarza. Zarówno patogeny, jak i przerzutowe komórki nowotworowe prezentują powierzchniowe antygeny cukrowe, które nie występują lub są niezwykle rzadkie w glikoproteinach płynów ustrojowych zdrowych ludzi. Takie glikoepitopy stanowią ligandy dla lektyn endogennych rezydujących na komórkach układu odpornościowego. Okazuje się, że podobne glikany obecne są na powierzchni plemników oraz w glikoproteinach plazmy nasienia zdrowych, płodnych mężczyzn. Dotychczas badania związane z analizą wzorca glikozylacji nasienia koncentrowały się na N-glikanach. Wydaje się jednak możliwe, że również O-glikany, szczególnie antygeny T (Gal β 1-3GalNAc α 1-R), Tn (GalNAc α 1-R) oraz sjalo T/Tn, mogą pełnić istotną funkcję w procesie zapłodnienia, zwłaszcza iż przypisuje się im rolę immunomodulacyjną, między innymi w procesach karcynogenezy.

Cele i założenia

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza O-glikomu glikoprotein plazmy nasienia ze szczególnym uwzględnieniem niekompletnych O-glikanów typu mucynowego, w tym antygenów T/Tn, a także ocena potencjalnych zmian profilu O-glikozylacyjnego u mężczyzn o obniżonym potencjale reprodukcyjnym.

Materiały i metody

Materiałem klinicznym wykorzystanym do badań w niniejszej pracy była plazma nasienia pacjentów w wieku od 22 do 56 lat zgłaszających się do 2 Katedry i Kliniki Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu lub pacjentów, którzy odwiedzili Centrum Zdrowia Rodzinnego AB OVO w Lublinie w celu przeprowadzenia standardowego badania nasienia i dalszej diagnostyki niepłodności. Na podstawie wykonanego badania nasienia zgodnie z dyrektywami Światowej Organizacji Zdrowia pacjentów zaklasyfikowano do grup: astenozoospermicznej (A; całkowita ruchliwość plemników <40%), oligozoospermicznej (O; liczba plemników <15x10⁶/mL), oligoastenozoospermicznej (OA; liczba plemników <15x10⁶/mL i całkowita ruchliwość plemników <40%) i norozoospermicznej (N; parametry nasienia zgodne z normami WHO). Zdiagnozowana

niepłodność kobieca u pary była czynnikiem wykluczającym udział w badaniu. Grupę kontrolną stanowiły próbki plazmy nasienia pochodzące od ochotników, którzy w ostatnich latach zostali ojcami, a nasienie spełniało kryteria dla grupy normozoospermicznej.

W celu wstępnego porównania profilu glikozylacyjnego białek plazmy nasienia mężczyzn płodnych i niepłodnych skonstruowano i dostosowano do analiz mikromacierz zawierającą 18 lektyn o różnej specyficzności, w tym 6 rozpoznających O-glikoepitopy. Do analizy interakcji wykorzystano znakowanie fluorescencyjnie próby plazmy nasienia. Reaktywność lektyn względem glikoprotein pochodzenia nasiennego definiowano jako intensywność sygnału pochodzącego z określonych „spotów”, mierzonego za pomocą skanera konfokalnego.

Do oceny występowania niekompletnych O-glikanów w poszczególnych frakcjach elektroforetycznych plazmy nasienia zastosowano technikę lektynoblottingu. Rozdzielone w SDS-PAGE próby plazmy nasienia transferowano na membranę nitrocelulozową i po całkowitym blokowaniu inkubowano z lektyną *Vicia villosa* (VVL), rozpoznającą antygen Tn lub lektyną *Maclura pomifera* (MPL) zdolną do interakcji z antygenem T i sjało T. Reaktywność poszczególnych frakcji białkowych względem lektyn oceniano mierząc gęstość optyczną (OD) pasm barwionych po inkubacji z VVL lub MPL. Aby ocenić czy zmiany w reaktywności lektyny są związane z ilością samego białka, czy z intensywnością procesu glikozylacji, określono stosunek reaktywności MPL lub VVL do zawartości białka w każdym prążku. Ilość białka określono na podstawie oddzielnie przygotowanych żeli zawierających te same próby plazmy nasienia, barwione SyproRuby.

Glikoproteiny reaktywne względem MPL lub reaktywne wobec VVL izolowano za pomocą chromatografii powinowactwa. W tym celu wykorzystano kolumny wypełnione złożem agarozowym skoniugowanym z lektyną VVL lub MPL. Białka zawarte w pasmach reaktywnych względem lektyn i we frakcjach eluowanych z kolumn chromatograficznych zidentyfikowano za pomocą analizy spektrometrii mas.

Dla zidentyfikowanych białek przeprowadzono analizę bioinformatyczną. Potencjał O-glikozylacyjny w wybranych białkach analizowano przy użyciu platformy NetOGlyc 4.0. Bazę danych STRING 11.0 wykorzystano do identyfikacji przewidywanych funkcjonalnych partnerów i sieci interakcji białko-białko (PPI).

Wyniki

Analiza interakcji glikoprotein plazmy nasienia z lektynami immobilizowanymi na płytkach mikromacierzowych wykazała w przypadku większości analizowanych lektyn obniżenie średniej reaktywności prób pochodzących od mężczyzn niepłodnych w porównaniu z grupą kontrolną. Obniżoną reaktywność lektyn względem prób pochodzących od mężczyzn niepłodnych zaobserwowano szczególnie w przypadku lektyn specyficznych względem O-glikanów, jak również tych wiążących terminalną fukozę lub kwas sjałowy, obecnych zarówno w N-, jak i O-glikanach.

Analiza reaktywności lektyn względem frakcjonowanych prób plazmy nasienia przy wykorzystaniu metody lektynoblottingu wykazała różnice o istotności statystycznej między poszczególnymi grupami diagnostycznymi, w tym między grupami z obniżoną płodnością, a grupą mężczyzn płodnych. W przypadku lektyny VVL zaobserwowano obniżenie zarówno całkowitej reaktywności lektyny, jak i gęstości glikoepitopów, porównując grupę oligoastenozoospermiczną z grupą kontrolną we frakcji <15 kDa. Spadek gęstości antygenów

Tn w glikopeptydach <15 kDa dotyczył również grupy mężczyzn normozoospermicznych z obniżoną płodnością. Identyfikacja białek zawartych w tym prążku wykazała obecność PIP oraz wysoki poziom fragmentów semenogeliny 1 i 2 (SEMG1 i 2). Analiza interakcji MPL, wykazała wyższą reaktywność całkowitą względem prób z grup patologicznych w stosunku do grupy kontrolnej w prążkach 83 kDa i 70 kDa. W obu frakcjach dominowały laktotransferyna (LTF) i fibronektyna (FN). Nie wykazano różnic o istotności statystycznej pomiędzy grupą kontrolną, a grupami mężczyzn nieplodnych pod względem gęstości glikoepitopów rozpoznawanych przez lektynę MPL w białkach zawartych w prążkach poddanych analizie. Oznaczenie stosunku reaktywności VVL do MPL- względem prążka 70 kDa wykazało istotnie statystycznie obniżoną zawartość Tn względem antygeny T w grupach patologicznych, zwłaszcza w N, A i OA w porównaniu z grupą kontrolną.

Analiza LC-MS białek wyizolowanych metodą chromatografii powinowactwa wykazała obecność semenogeliny 1 i 2 (SEMG 1 i 2), laktotransferyny (LTF), białka indukowanego prolaktyną (PIP), fibronektyny (FN1) i kalikreiny 3 (KLK3) w izolatach eluowanych z obu kolumn chromatograficznych oraz w przypadku glikoprotein reagujących z MPL dodatkowo aminopeptydazy N (ANPEP) i fosfatazy kwaśnej sterczowej (ACP3), klasteryny (CLU), cynkowej α 2-glikoproteiny (AZGP1) oraz mucyny 6 (MUC6).

Bioinformatyczna analiza miejsc glikozylacji w białkach będących potencjalnymi nośnikami terminalnych eptitopów Gal/GalNAc wykazała znaczącą zawartość miejsc O-glikozylacji dla SEMG 1 i 2 oraz FN1. Analiza sugeruje niskie prawdopodobieństwo obecności O-glikanów w PIP, natomiast w przypadku LTF wskazała na możliwość występowania tylko kilku potencjalnych miejsc O-glikozylacji co sugeruje, że rozpoznawane przez lektyny epitopy Gal/GalNAc, mogą być także obecne na N-glikanach w postaci antygenów *LacNAc* lub *LacdiNAc*. Analiza STRING białek identyfikowanych jako ligandy VVL i MPL dla większości z nich wykazała udział w procesach związanych z odpowiedzią immunologiczną.

Wnioski

1. Niższa reaktywność pełnych prób plazmy nasienia mężczyzn nieplodnych względem kontrolnych z lektynami rozpoznającymi O-glikany może świadczyć o udziale tych struktur w procesach związanych z zapłodnieniem.
2. Jako potencjalne nośniki glikanów prezentujących odsłoniętą galaktozę i N-acetylogalaktozaminę w plazmie nasienia wytypowano: PIP, SEMG1, SEMG2, LTF, FN1.
3. Odwrotny wzorzec reaktywności lektyn MPL i VVL względem frakcji zawierających LTF i FN1 jako białka dominujące może świadczyć o przewadze antygeny T nad Tn w tych glikoproteinach, w grupie mężczyzn nieplodnych.
4. Wykazane różnice w reaktywności frakcji zawierających głównie fragmenty SEMG1 i 2 między grupą kontrolną, a grupami patologicznymi, zwłaszcza w przypadku lektyny VVL może świadczyć o udziale tych białek w prawidłowym procesie zapłodnienia.
5. Białka plazmy nasienia wytypowane jako nośniki antygenów T i Tn mogą być potencjalnymi ligandami galaktozoswoistych lektyn endogennych, które rezydują na komórkach układu odpornościowego.
6. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki mogą sugerować, że ilość i sposób prezentacji badanych glikoepitopów może być istotny dla zapłodnienia, a białka będące nośnikami tych glikanów mogą stanowić potencjalne immunologiczne markery męskiej niepłodności.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Evaluation of O-glycosylation of seminal plasma glycoproteins and its possible relationship with male reproductive potential

Justyna Szczykutowicz

Introduction

For a long time, seminal plasma was considered only a passive medium delivering sperm to the female reproductive tract. Over time, seminal plasma has been assigned a wider role in the fertilization process. One of the most interesting aspects related to the functions of seminal plasma is the participation of its components in regulation of the maternal immune response to male gametes and the developing embryo. According to the feto-embryonic defense hypothesis, glycoproteins presenting carbohydrates that are recognized by the mother's immune system are factors involved in the development of immune tolerance during fertilization and pregnancy. The concept assumes that the interactions between proteins and carbohydrates in the female reproductive system in the postcoital period are similar to the mechanisms exploited by pathogens and cancer cells to evade the host immune response. Both pathogens and metastatic cancer cells express carbohydrate antigens which are extremely rare in body fluids of healthy people. Such glycoepitopes are ligands for endogenous lectins residing on the immune cells. Interestingly, similar glycans are present on the surface of sperm and in seminal plasma glycoproteins of healthy, fertile men. The research related to the analysis of the seminal plasma glycosylation pattern has been focused on N-glycans, so far. However, it seems possible that O-glycans, especially T (Gal β 1-3GalNAc α 1-R), Tn (GalNAc α 1-R) and sialo- T/Tn antigens, may also play an important role in the fertilization process, since they are assigned an immunomodulatory function, mainly in carcinogenesis.

Aim

The aim of the study was to evaluate the O-glycome of seminal plasma glycoproteins with particular emphasis on incomplete mucin-type O-glycans including T/Tn antigens, as well as to assess potential changes in the O-glycosylation profile in men with reduced reproductive potential.

Materials and methods

The clinical material used in this study consisted of the seminal plasma samples of patients aged 22 to 56 years attending the 2nd Clinic of Gynecology and Obstetrics, Wrocław Medical University, or patients who visited the AB OVO Family Health Center in Lublin for standard semen analysis and further infertility diagnostics. On the basis of the semen examination carried out in accordance with the directives of the World Health Organization, patients were classified into the following groups: asthenozoospermic (A; total sperm motility <40%), oligozoospermic (O; sperm count <15 x 10⁶/mL), oligoasthenozoospermic (OA; sperm count <15 x 10⁶/mL and total sperm motility <40%) and normozoospermic (N; semen parameters within the WHO normal range). Diagnosed female infertility in the couple was an exclusion factor. The control group consisted of the samples of seminal plasma obtained from

volunteers who had become fathers in recent years; all the control subjects were normozoospermic.

To compare the glycosylation profile of fertile and nonfertile men, a microarray platform containing 18 lectins of different specificity, including 6 recognizing O-glycoepitopes, was constructed and optimized for the analysis of the seminal plasma. Fluorescently labelled samples were used to analyze the interactions. The reactivity of the lectins to seminal plasma glycoproteins was defined as the intensity of the signal from particular "spots" measured by a confocal scanner.

The lectin-blotting technique was applied to assess the presence of incomplete O-glycans in individual fractions of the seminal plasma. The electrophoretically separated seminal plasma samples were transferred onto a nitrocellulose membrane and, after overnight blocking, incubated with *Vicia villosa* lectin (VVL), recognizing the Tn antigen, or *Maclura pomifera* lectin (MPL), capable of interacting with T and sialo- T antigen. The reactivity of the individual protein fractions with lectins was assessed by measuring the optical density (OD) of the bands probed with VVL or MPL lectins. To determine whether the changes in lectin reactivity were related to the amount of protein itself or to the intensity of the glycosylation process, the ratio of MPL or VVL reactivity to the protein content of each band was estimated. The amount of protein was assessed on the basis of separately prepared gels containing the same samples of the seminal plasma, stained with SyproRuby, standardized with a lane containing BSA.

MPL-reactive or VVL-reactive glycoproteins were isolated by affinity chromatography. Columns filled with an agarose bed conjugated with VVL or MPL were used for this purpose. The proteins contained in lectin-reactive bands or fractions eluted from the chromatographic columns were identified by mass spectrometric analysis.

For the identified proteins bioinformatics analysis was performed. The O-glycosylation potential of selected proteins was analyzed using the NetOGlyc 4.0 platform. The STRING 11.0 database was used to identify predicted functional partners and protein-protein interaction (PPI) networks.

Results

The analysis of the interaction of seminal plasma glycoproteins with lectins immobilized on microarray plates showed a decrease in the average reactivity of samples from infertile men in the case of most of the analyzed lectins compared to the control group. Reduced lectin reactivity to samples from infertile men was observed especially with O-glycan specific lectins, as well as with the lectins binding terminal fucose or sialic acid present in both N- and O-linked glycans.

The analysis of lectin reactivity to electrophoretically separated seminal plasma glycoproteins by means of lectin blotting showed statistically significant differences between individual diagnostic groups, including groups with reduced fertility, compared to the group of fertile men. In the case of the VVL lectin, both the total lectin reactivity and the glycoepitope density were lowered when comparing the oligoasthenozoospermic group with the control group in the <15 kDa bands. A decrease in the density of Tn antigens in glycopeptides <15 kDa was also noted for normozoospermic nonfertile group compared to the fertile men. Identification of the proteins contained in this band revealed the presence of PIP and a high

level of semenogelin 1 and 2 fragments (SEMG1 and 2). The analysis of MPL interactions showed higher overall reactivity to the samples of pathological groups when compared to the control group in the 83 kDa and 70 kDa bands. Both fractions were dominated by lactotransferrin (LTF) and fibronectin (FN.) There were no statistically significant differences between the control group and the groups of infertile men in terms of the density of glycoepitopes bound by the MPL lectin. The estimation of the ratio of VVL to MPL reactivity in the 70 kDa band showed a statistically significant reduced content of Tn in relation to the T antigen in the pathological groups, especially in N, A and OA, compared to the control group.

LC-MS analysis of proteins isolated by affinity chromatography revealed the presence of semenogelin 1 and 2 (SEMG 1 and 2), lactotransferrin (LTF), prolactin inducible protein (PIP), fibronectin (FN1) and prostate specific antigen (KLK3) in the isolates eluted from both chromatographic columns, and in the case of glycoproteins reacting with MPL additionally aminopeptidase N (ANPEP), prostatic acid phosphatase (ACP3), clusterin (CLU), zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1) and mucin 6 (MUC6).

Bioinformatic analysis of glycosylation sites in proteins that are potential carriers of terminal Gal/GalNAc epitopes revealed a significant content of O-glycosylation sites in SEMG 1 and 2 and FN1. The analysis showed a low probability of the presence of O-glycans in PIP, while in the case of LTF it indicated only a few potential O-glycosylation sites, suggesting that lectin-recognized Gal/GalNAc epitopes may also be present on N-linked glycans as LacNAc or LacdiNAc antigens. STRING analysis of proteins identified as VVL and MPL ligands for most of them showed their participation in processes related to the immune response.

Conclusions

1. The lower reactivity of lectins recognizing O-glycans with unfractionated samples from infertile men compared to controls may indicate the role of these structures in the processes related to fertilization.
2. The study indicated PIP, SEMG1, SEMG2, LTF, and FN1 as potential carriers of glycans presenting terminal galactose and N-acetylgalactosamine in the seminal plasma.
3. The inverse pattern of reactivity of MPL and VVL lectins towards the fractions containing LTF and FN1 as dominant proteins may indicate the advantage of the T antigen over Tn in these glycoproteins in the group of infertile men.
4. The differences in the reactivity of the fractions containing mainly SEMG1 and SEMG2 fragments between the control group and pathological groups, especially in the case of VVL lectin, may indicate the participation of these proteins in the proper fertilization process.
5. The seminal plasma proteins revealed as carriers of the T and Tn antigens may be potential ligands of endogenous galactose-specific lectins that reside on cells of the immune system.
6. The present results may suggest that the amount and way of presentation of the studied glycoepitopes may be important for fertilization, and the proteins carrying these glycans may be potential immunological markers of male infertility.