

Analiza sjalilacji *N*-glikomu plazmy męskiego nasienia ze szczególnym uwzględnieniem swoistego antygeny sterczowego

Anna Kałuża

Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wstęp: Plazma nasienia (SP) odgrywa istotną rolę w modulowaniu funkcji plemników, jest środowiskiem, w którym przenoszone są, odżywiane oraz chronione plemniki od momentu ejakulacji. Jedną z glikoprotein plazmy nasienia, odgrywającą istotną rolę w zapłodnieniu jest swoisty antygen sterczowy (PSA). Po wytrysku aktywowany PSA bierze udział w procesie upłynniania skoagulowanego nasienia poprzez proteolizę dwóch głównych substratów dla tego enzymu: semenogeliny-1 oraz semenogeliny-2. Reakcja prowadzi do stopniowego uwalniania ruchliwych plemników, umożliwiając tym samym plemnikom przemieszczanie się przez żeńskie drogi rozrodcze. Około 8% masy cząsteczkowej PSA stanowi łańcuch oligosacharydowy, który położony jest przy Asn-69. Swoisty antygen sterczowy wyizolowany z plazmy nasienia zdrowych mężczyzn został przeanalizowany spektrometrycznie, stwierdzono obecność dwuantenowych, sjalowanych glikanów, występowanie reszt fukozy w części rdzeniowej glikanów oraz potwierdzono obecność reszty *N*-acetylogalaktozaminy w części dystalnej struktury. Ponadto zaobserwowano niewielki udział glikanów wysokomannozyowych oraz hybrydowych.

Cel: Głównym celem naukowym badań było scharakteryzowanie profilu glikozytacji swoistego antygeny sterczowego, ze szczególnym uwzględnieniem profilu sjalilacji tej glikoproteiny w grupach mężczyzn o obniżonej płodności.

Materiały i Metody: Próbkę plazmy nasienia zebrano od mężczyzn w wieku 24-49 lat, w II Klinice Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Dla wszystkich pacjentów oraz wolontariuszy z grupy kontrolnej przeprowadzono standardowe badanie nasienia zgodnie z dyrektywami Światowej Organizacji Zdrowia. Na podstawie otrzymanych wyników, próbki podzielono na grupy: astenozoospermiczna (A; całkowita ruchliwość plemników <40%), oligozoospermiczna (O; liczba plemników <15 x 10⁶ /mL), oligoastenozoospermiczna (OA; liczba plemników <15 x 10⁶ /mL i całkowita ruchliwość plemników <40%) i normozoospermiczna (N; parametry nasienia zgodne z normami WHO). Grupę kontrolną stanowiły próbki plazmy nasienia pochodzące od wolontariuszy, którzy w ostatnich latach zostali ojcami, a nasienie spełniało kryteria dla grupy normozoospermicznej. *N*-glikom plazmy nasienia scharakteryzowano z wykorzystaniem spektrometru mas typu MALDI-TOF-MS. Próbkę do analizy przygotowano poprzez zdenaturowanie białek plazmy nasienia, odcięto *N*-glikany z użyciem *N*-glikozydazy F i przeprowadzono ich ekstrakcję do fazy stałej z zastosowaniem kolumn grafitowych. *N*-glikany permetylowano, następnie oczyszczono z wykorzystaniem kolumn C18. Analizę struktur oligosacharydów przeprowadzono z wykorzystaniem tandemowego spektrometru mas z zastosowaniem dysocjacji indukowanej kolizyjnie (CID).

Analizę obecności α 2,3- oraz α 2,6-sjalowanych glikoepitopów przeprowadzono techniką lektynoblottingu z użyciem sjalospetyficznych lektyn *Maackia amurensis* (MAA) i *Sambucus nigra* (SNA).

Opracowano nową, wysokoprzepustową metodę analizy glikopeptydów PSA wyizolowanych z plazmy nasienia z wykorzystaniem techniki MALDI-MS. Procedura obejmowała: chromatografię immunopowinowactwa, redukcję, alkilowanie i trawienie białka trypsyną oraz reakcję derywatyzacji glikopeptydów PSA, umożliwiającą stabilizację i rozróżnienie α 2,3- oraz α 2,6-sjalowanych glikoform. Izomery α 2,3- i α 2,6-kwasu sjalowego modyfikowano w dwuetapowej reakcji derywatyzacji: amidacji z dimetyloaminą oraz amidacji z wodorotlenkiem amonu, po której glikopeptydy oczyszczono i zagęszczono w chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych (HILIC) z ekstrakcją do fazy stałej. Wszystkie etapy procedury przeprowadzono w 96 dołkowej płytce.

Wyniki: Zidentyfikowano 86 struktur oligosacharydowych w plazmie nasienia pochodzącej od płodnych i niepłodnych mężczyzn. Dominowały glikany dwuantenowe, które stanowiły 65%-75% wszystkich zidentyfikowanych reszt węglowodanowych. Glikany wysokomannozowe oraz hybrydowe stanowiły 15%-28% *N*-glikomu, ich zawartość była najniższa w grupie oligozoospermicznej (15%), natomiast wyższa w grupie kontrolnej (25%) i grupie normozoospermicznej (28%). Poziom oligosacharydów wysokofukozylowanych był podwyższony u pacjentów astenozoospermicznych (50%), olizoospermicznych (40%) i oligoastenozoospermicznych (43%) w odniesieniu do grupy kontrolnej (32%). Intensywność sjalilacji w grupie oligozoospermicznej była obniżona i stanowiła 24%, w grupie oligoastenozoospermicznej (21%), a najniższa była w grupie astenozoospermicznej osiągając 10%, natomiast podwyższony stopień sjalilacji stwierdzono w grupie normozoospermicznej (32%) w porównaniu do grupy kontrolnej (25%). Silnie rozgałęzione trój- i czteroantenowe glikany stanowiące około 3% całkowitej puli *N*-glikanów w grupie kontrolnej, w grupie normozoospermicznej osiągnęły poziom 9%. Podwyższoną zawartość silnie rozgałęzionych glikanów obserwowano również w grupach A, O, OA.

Przeprowadzona metodą lektynoblottingu analiza profilu sjalilacji plazmy nasienia, ujawniła zróżnicowaną intensywność występowania α 2,3-przyłączonego kwasu sjalowego dla wybranych glikoprotein. Znaczące różnice w reaktywności z lektyną MAA zaobserwowano dla sjaloglikoprotein o masach cząsteczkowych: 83 kDa, 70 kDa, 53 kDa, 41 kDa, 32 kDa, 15 kDa w grupie astenozoospermicznej oraz pozostałych grupach mężczyzn z obniżoną płodnością w odniesieniu do grupy kontrolnej. Obniżoną reaktywność lektyny SNA z glikoproteiną o masie cząsteczkowej 70 kDa stwierdzono we wszystkich grupach mężczyzn z nieprawidłowym obrazem spermogramu. Wśród glikoprotein wykazujących zróżnicowaną zawartość kwasu sjalowego zidentyfikowano m.in. PSA.

Zoptymalizowaną procedurę z detekcją MALDI-FTICR-MS pozwalającą na charakterystykę glikozylacji PSA plazmy nasienia zastosowano do oznaczeń w próbach klinicznych pochodzących od mężczyzn z obniżoną płodnością i wykorzystano do ilościowej analizy glikoform PSA. W profilu glikozylacji PSA plazmy nasienia stwierdzono wysoki poziom fukozytacji (od 49,1% do 77,8% w grupie kontrolnej) i sjalilacji wynoszący 95,3%-98,8% dla

jedno- i dwuantenowych struktur glikanów. Ponadto zaobserwowano glikany typu hybrydowego i wysokomannozowe o zawartości odpowiednio: 1,9%-3,8% oraz 0,2%-1,9%. Dodatkowo oznaczono względną zawartość α 2,3- i α 2,6-sjaloglikoform. Wykazano, że α 2,6-glikoforma była najintensywniejszym wariantem kwasu sjałowego glikopeptydów PSA stanowiącym od 76,1% do 93,7%. Większość glikoform zidentyfikowanych techniką MALDI-FTICR-MS potwierdzono w pomiarze z użyciem CE-ESI-MS, wykonanym na standardzie PSA pochodzącym z plazmy nasienia. W analizie ilościowej zmierzono względną zawartość 44 glikowariantów PSA w 102 próbkach badanych. Przeanalizowano zawartość glikanów jednoantenowych, hybrydowych i wysokomannozowych, jak również poziom fukozytacji, α 2,3-sjalilacji oraz α 2,6-sjalilacji. Podsumowując, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami mężczyzn z obniżoną płodnością a grupą kontrolną, w relacji do badanych cechy glikozylacji PSA. Nie stwierdzono zależności pomiędzy glikozylacją PSA a wiekiem, liczbą plemników czy ruchliwością plemników w żadnej z analizowanych grup.

Wnioski:

1. Przy użyciu spektrometrii mas MALDI-TOF-MS zidentyfikowano 86 struktur oligosacharydów w *N*-glikomie plazmy nasienia mężczyzn z obniżoną płodnością oraz w grupie kontrolnej.
2. W grupie astenozoospermicznej zaobserwowano obniżoną reaktywność lektyny *Maackia amurensis* z glikoproteinami plazmy nasienia w odniesieniu do pozostałych grup pacjentów.
3. Opracowano i zoptymalizowano wysokoprzepustową procedurę pozwalającą na charakterystykę profilu glikozylacji PSA płamy nasienia z użyciem techniki MALDI-MS.
4. Opracowano metodę derywatyzacji umożliwiającą rozróżnienie α 2,3- oraz α 2,6-przylączonego kwasu sjałowego, protokół charakteryzował się minimalnym tworzeniem produktów pośrednich oraz wysoką specyficznością.
5. Zidentyfikowano 44 glikoformy PSA plazmy nasienia przy wykorzystaniu MALDI-FTICR-MS, podczas gdy techniką MALDI-TOF-MS oznaczono 22 glikoformy w analizowanych próbkach.
6. Prezentowane badania wykazały, że wcześniej ujawnione zmiany w obrazie glikozylacji plazmy nasienia, stwierdzone w grupach mężczyzn z obniżoną płodnością, nie są skorelowane z glikozylacją swoistego antygeny sterczowego.
7. Proponowana metoda może znaleźć zastosowanie do izolacji PSA z innego materiału biologicznego, jak mocz czy surowica. Opracowany protokół można dostosować i użyć do oceny profilu glikozylacji PSA w badaniach dotyczących nowotworów prostaty.

Analysis of *N*-glycome sialylation of seminal plasma emphasized on prostate specific antigen

Anna Kałuża

Department of Chemistry and Immunochemistry; Wrocław Medical University

Background: Seminal plasma (SP) serves as a milieu to nourish, carry, and protect sperm after the ejaculation. In addition, it plays an important physiological role in the modulation of sperm cell function. One of the high-abundant glycoproteins crucial in the seminal plasma is prostate specific antigen (PSA). After the ejaculation, the activated PSA is involved in the liquefaction process of coagulated seminal fluid by cleavage of the two main substrates for the enzyme: semenogelin-1 and semenogelin-2. This reaction leads to liquefaction of the seminal clot and the progressive release of motile sperm, thus enabling the spermatozoa to travel through the female reproductive tract. Approximately 8% of the PSA molecular weight is composed of *N*-linked oligosaccharide side chain that occupies a single glycosylation site at asparagine-69. The PSA purified from the seminal fluid of healthy subjects has been previously analyzed and characterized by mass spectrometry based analytical approaches, as having sialylated complex biantennary glycans, frequent core fucose residues, and structures differ in content of terminal *N*-acetylgalactosamines. Furthermore, the presence of high mannose and hybrid *N*-glycans has also been reported.

Aim: The aim of the study was to characterize the glycosylation profile of prostate specific antigen, with a particular emphasis on glycoprotein sialylation in a group of infertile men.

Materials and methods: Seminal plasma samples were obtained from 24-49 years old men attending with their partners to the 2nd Clinic of Gynaecology and Obstetrics, Wrocław Medical University. Standard semen examination was performed for all the patients and control subjects according to the World Health Organization (WHO) directives, based on these testing samples obtained from infertile men were divided 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). The control group consisted of seminal plasma samples from healthy volunteers, who had fathered a child within recent years, all the control subjects were normozoospermic.

Seminal plasma *N*-glycome was characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *N*-linked glycans were released from denatured proteins by the addition of peptide-*N*-glycosidase F, further solid phase extraction of *N*-glycans was performed with graphitized carbon cartridges. Then, the permethylated glycans were purified on a Sep-Pak C18 column. High-energy collision-induced dissociation (CID) tandem mass spectrometry was used for the structural analysis of oligosaccharides.

The expression of α 2,3- and α 2,6-sialylated glycoepitopes was examined by the lectin-probed western-blot analysis with the use of sialic acid specific *Maackia amurensis* (MAA) and *Sambucus nigra* (SNA) agglutinins, respectively.

A novel high-throughput approach was developed for the characterization of SP PSA derived glycopeptides by MALDI-MS. The workflow included the bead-based immunoaffinity capturing of PSA from seminal plasma, afterward reduction, alkylation, and proteolytic digestion with trypsin. Next, the PSA glycopeptides were subjected to a derivatization reaction, which allowed for stabilization and differentiation between α 2,3- and α 2,6-sialylated isomers. The α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids were modified in a two-step reaction *via* dimethylamine amidation and ammonia amidation respectively, followed by cotton hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-solid phase extraction (SPE) clean-up and enrichment. All sample preparation steps were performed in a 96 well plate format.

Results: Eighty-six oligosaccharides were identified in pooled samples derived from fertile and infertile men. Biantennary glycans were predominant, reaching 65-75% of the total carbohydrate residues. High mannose and hybrid type glycans represented 15-28% of the *N*-glycome, their content was the lowest in the oligozoospermic group (15%), and increased in the control group (25%) and normozoospermic men (28%). Highly fucosylated oligosaccharides were increased in asthenozoospermic (50%), oligozoospermic (40%) and oligoasthenozoospermic (43%) subjects in relation to the control group (32%). The most evident differences were observed for sialylated glycans, the expression of sialylation was decreased in oligozoospermic (24%), oligoasthenozoospermic (21%), and especially asthenozoospermic (10%) samples, but increased in infertile normozoospermic subjects (32%), as compared to control fertile men (25%). Highly branched, tri- and tetraantennary glycans, containing about 3% of the total carbohydrate moiety in the control, reached over 9% in the normozoospermic infertile sample. An increased content of highly branched glycans was also observed in O, A, and OA groups.

The performed lectin-probed western-blot analysis of seminal plasma revealed a differential expression of α 2,3-linked sialic acid. Significant differences in MAA reactivity were observed for 83 kDa, 70 kDa, 53 kDa, 41 kDa, 32 kDa, 15 kDa sialoglycoprotein in asthenozoospermic group as compared to the control group and other infertile subjects. Decrease in α 2,6-linked sialic acid content, measured as SNA reactivity, was found in the 70 kDa glycoprotein in all groups of infertile men.

The optimized workflow with MALDI-FTICR-MS detection allowing for characterization of seminal PSA glycosylation was applied to the clinical samples coming from infertile men and used for the quantitative analysis of the glycoforms. SP PSA glycosylation revealed a high level of fucosylation (from 49.1% to 77.8% in fertile controls) and sialylation (95.3% to 98.8%) on mono- and diantennary complex-type glycans. Moreover hybrid-type and high mannose glycans were observed in the range 1.9%-3.8% and 0.2%-1.9%, respectively. In addition, relative levels of α 2,3- and α 2,6-linked sialylation was quantified, indicating that α 2,6-sialylation was the most abundant linkage variant of SP PSA (76,1% to 93,7%). The majority of all glycoforms detected by MALDI-FTICR-MS were confirmed by complementary CE-ESI-MS of the SP PSA standard. Derived glycosylation traits were characterized for the 44

glycoforms, which were relatively quantified in the 102 individual subjects. The abundance of monoantennary, hybrid, and high mannose type glycans as well as levels of fucosylation, α 2,3-sialylation, α 2,6-sialylation were examined. In summary, no differences were observed between fertile and infertile men, when comparing the derived traits between all study groups. Finally, no correlations were found between PSA glycosylation and age, sperm count or sperm motility in any of the groups.

Conclusions:

1. Eighty-six oligosaccharide structures were identified in the seminal plasma *N*-glycome derived from fertile and infertile men by MALDI-TOF mass spectrometry.
2. Reduced reactivity with *Maackia amurensis* lectin, recognizing α 2,3-attached sialic acid, was observed in the asthenozoospermic patients. A decrease in SNA reactivity of 70 kDa glycoprotein was observed in all infertile groups.
3. A derivatization protocol enabled the discrimination between α 2,3- and α 2,6-sialylated isomers to develop, the α 2,6- and α 2,3-linked sialic acids were modified *via* dimethylamine amidation and ammonia amidation, respectively, and the final procedure showed minimal formation of byproducts and high selectivity.
4. A high-throughput workflow for profiling of seminal plasma PSA glycosylation using MALDI-MS technique was developed and optimized.
5. In total, 44 glycoforms of PSA from SP, including SA linkage isomers, were detected by MALDI-FTICR-MS, as opposed to MALDI-TOF-MS, where 22 glycoforms were reliably quantified in all samples.
6. The current study showed that the SP glycosylation changes previously associated with male infertility are not correlated with SP PSA glycosylation.
7. The proposed method can be applied to capture PSA from different body fluids, such as urine or serum as well, as the protocol can be adapted to profile the glycosylation of PSA in prostate cancer.