



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

PRACA DOKTORSKA

OCENA WYBRANYCH PARAMETRÓW GLIKOZYLACJI: EKSPRESJI
FUKOZY I OLIGOSACHARYDÓW WYSOKOMANNOZOWYCH W
PLAZMIE NASIENIA MĘŻCZYŹN O OBNIŻONEJ PŁODNOŚCI

Autor: mgr Beata Olejnik

Promotor: Dr hab. Mirosława Ferens-Sieczkowska

Wrocław 2015

STRESZCZENIE

Wstęp

Wzrost uprzemysłowienia w wielu krajach świata pociągnął za sobą pojawienie się szeregu chorób, tzw. cywilizacyjnych, do których można zaliczyć zaburzenia płodności. Około 15% par starających się o potomstwo napotyka na problemy koncepcyjne, z czego szacuje się, że za około połowę przypadków odpowiada czynnik męski. Zdolność mężczyzny do spłodzenia potomstwa określa się obecnie na podstawie standardowego badania nasienia, którego normy zostały wyznaczone przez Światową Organizację Zdrowia. Dane statystyczne pokazują jednak, że w wielu przypadkach to badanie okazuje się niewystarczające, ponieważ mimo spełnionych norm dotyczących kondycji plemników, dalej nie dochodzi do zapłodnienia. Taką niepłodność nazywa się niepłodnością idiopatyczną. W takich przypadkach szczególnie istotna wydaje się potrzeba poszukiwania nowych markerów niepłodności, niezwiązanych bezpośrednio z liczbą, ruchliwością i morfologią plemników.

Kaskada zjawisk prowadzących do zapłodnienia jest skomplikowanym procesem angażującym całą masę czynników biochemicznych i komórkowych. Istotnymi oddziaływaniami mogą być w tym przypadku oddziaływania typu białko – cukier. Plazma nasienia, czyli środowisko życia plemników zawiera cały szereg białek, w tym również glikoprotein. Należy sądzić, że poznanie profilu glikozylacji tych makrocząsteczek pomoże poznać dokładniej mechanizm rozpoznawania gamet i zapłodnienia, a to w przyszłości pomoże rozwinąć dokładniejszą diagnostykę męskiej niepłodności.

Cele pracy

Cele niniejszej pracy można sformułować w następujących punktach:

1. Analiza glikanów fukozylowanych w nasieniu pochodzącym od mężczyzn niepłodnych i takich o potwierdzonej płodności.

2. Analiza glikanów wysokomannozowych/hybrydowych w nasieniu pochodzącym od mężczyzn niepłodnych i takich o potwierdzonej płodności.
3. Identyfikacja białek charakteryzujących się największymi różnicami pod względem analizowanych cech glikozylacji.
4. Potwierdzenie obecności glikanów wysokomannozowych/hybrydowych oraz ich szczegółowa charakterystyka strukturalna.

Materiały i metody

Materiałem do badań była plazma nasienia mężczyzn pozostających w bezpotomnych związkach, zgłaszających się do 2 Katedry i Kliniki Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w celu wykonania zabiegu inseminacji. Na podstawie wyników standardowego badania nasienia według procedur WHO pacjenci zostali podzieleni na następujące grupy: normozoospermiczną, oligozoospermiczną, astenozoospermiczną i oligoastenozoospermiczną. Grupę kontrolną stanowili mężczyźni o potwierdzonym ojcostwie.

Badanie obecności wybranych struktur oligosacharydowych przeprowadzono za pomocą lektynoblottingu. Wykorzystano fukozospecyficzną lektynę z *Aleuria aurantia* oraz mannozspecyficzną lektynę z *Galanthus nivalis*. Wybarwione z odpowiednią lektyną bloty poddano analizie densytometrycznej i statystycznej, w celu zidentyfikowania różnic istotnych statystycznie występujących w wybranych frakcjach białkowych w poszczególnych grupach diagnostycznych.

Wstępną identyfikację lektyno-reaktywnych białek przeprowadzono za pomocą immunoblotingu oraz spektrometrii masowej, we frakcjach wyciętych z żelu. Białka zawierające glikany wysokomannozowe zostały wyizolowane na kolumnie agarozowej z immobilizowaną lektyną *Galanthus nivalis*, a następnie poddane identyfikacji techniką spektrometrii masowej typu LC-MS/MS.

Struktury oligosacharydów we frakcji glikoprotein wyizolowanych na kolumnie z GNL-agarozą odcinano za pomocą endoglikozydazy, oczyszczano i identyfikowano za pomocą spektrometrii masowej typu MALDI-TOF.

Wyniki

W wyniku analizy fukozytacji przeprowadzonej z użyciem lektyny AAL wyodrębniono 12 frakcji glikoprotein silnie reagujących z lektyną. Analiza statystyczna pokazała istotne różnice występujące pomiędzy grupą kontrolną, a wszystkimi grupami pacjentów niepełodnych w 9 frakcjach białkowych. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów niepełodnych w 8 z 12 frakcji. W przypadku analizy fukozytacji przypadającej na ilość obecnego w danej frakcji białka, różnice istotne statystycznie występowały pomiędzy całą grupą pacjentów niepełodnych a grupą kontrolną w 11 z 12 analizowanych frakcji, nie było natomiast żadnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów niepełodnych.

Reaktywność glikoprotein plazmy nasienia z GNL okazała się odmienna niż z lektyną fukozospecyficzną. Wyodrębniono jedynie 4 pojedyncze frakcje białkowe, a także frakcję 5, do której włączono wszystkie fragmenty białek o masie poniżej 20 kDa. W wyniku analizy mannozylacji najbardziej widoczną różnicą była obniżona ekspresja glikanów GNL-reaktywnych niepełodnej grupy normozoospermicznej w stosunku do grupy kontrolnej i pozostałych grup pacjentów niepełodnych. Zależność ta obserwowana była we frakcjach GNL1-GNL4 i dotyczyła także gęstości epitopów mannozowych w stosunku do ilości białka w analizowanych frakcjach. Fragmenty peptydowe o masie <20 kDa wykazywały wzrost sumarycznej ilości dostępnej mannozy, ale brak różnic w gęstości epitopów pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów. Frakcje GNL1-GNL4 reagowały także z AAL co wskazuje na obecność w analizowanym materiale różnych glikoform określonych glikoprotein, jako że glikany wysokomannozowe rzadko zawierają fukozę.

Wstępną identyfikację białek posiadających zdolność wiązania użytych w badaniach lektyn przeprowadzono dwutorowo: za pomocą immunoblotingu oraz przy użyciu techniki spektrometrii mas. Analiza reaktywności białek z przeciwciałami potwierdziła obecność glikoprotein, które są uznawane za markery zmienionej chorobowo glikozylacji (transferyna, α_1 -kwaśna glikoproteina, fibronektyna, antytrombina III, α_1 -antytrypsyna), a które są obecne także w plazmie nasienia. Zidentyfikowano również białka charakterystyczne dla tej wydzieliny: swoisty antygen

stercza (PSA), glikodelina S, kwaśna fosfataza stercza (PAP), gonadotropina kosmówkowa. Obecność tych białek w analizowanym materiale została dodatkowo potwierdzona w spektrometrii mas.

Ponownej identyfikacji spektrometrycznej poddano glikoproteiny wyizolowane w chromatografii powinowactwa na GNL-agarozie. Zidentyfikowano 12 białek, będących efektywnymi nośnikami glikanów wysokomannozowych. W MALDI-TOF potwierdzono obecność oligosacharydów wysokomannozowych i hybrydowych we frakcji wyizolowanych glikoprotein, ale także zaobserwowano występowanie licznych glikanów o odmiennej, złożonej strukturze.

Wnioski

- Liczne glikoproteiny plazmy nasienia niepełodnych mężczyzn wykazują zwiększoną fukozylację w stosunku do grupy kontrolnej mężczyzn o potwierdzonym ojcostwie.
- Intensywną reaktywność z lektyną mannosospecyficzną wykazuje znacznie mniejsza liczba glikoprotein plazmy nasienia.
- Istotne statystycznie obniżenie ilości glikanów wysokomannozowych w glikoproteinach plazmy nasienia zaobserwowano jedynie w grupie normozoospermicznych niepełodnych mężczyzn, u których parametry spermogramu nie wskazują bezpośrednio na zaburzenia spermiogenezy.
- Jako główne białka, będące nośnikami oligosacharydów wysokomannozowych lub hybrydowych, wytypowano fibronektynę, PIP, PAP, semenogelinę, klastrynę, glikodelinę, Zn- α_2 -glikoproteinę i PSA.
- Analiza glikomu białek GNL-reaktywnych pokazuje, że cząsteczki glikoprotein zawierają jednocześnie glikany wysokomannozowe i złożone, podobnie jak GdS.
- Dalsza szczegółowa analiza glikozylacji PSA, PAP, PIP czy GdS może pozwolić na wytypowanie biomarkerów diagnostycznych i predykcyjnych wspomagających diagnostykę męskiej niepełodności.

ABSTRACT

Introduction

The decreasing potential of human fertility is a recent serious social and medical issue in many industrial countries. About 15% of couples in the reproductive age group are facing conception problems, the male factor responsible for about a half of all cases. The World Health Organization has estimated standard values for semen quality, which include the number of gametes, sperm mobility and morphology. With every new WHO report the mean semen parameters may be seen to decrease. But even with the semen parameters of a good standard there is no guarantee of conception success. A large group of men despite having sperm of a good enough quality still have problems with fertility. This type of infertility, defined as idiopathic infertility, is making it imperative to develop new markers of male infertility.

The molecular mechanism of fertilisation is a highly complex process, with many biochemical factors involved. In this mechanism protein-sugar interactions appear to be crucial. Seminal plasma is a rich life environment for the male gametes and contains many proteins, especially glycoproteins. In-depth research on glycosylation patterns of seminal glycoproteins is helping improve our understanding of the gamete recognition processes and the mechanism of fertilisation.

Main goals of the dissertation

1. Analysis of fucosylated glycans in the semen of the infertile male patients group and in the semen of the control group (men with a proved fertility).
2. Analysis of highly mannosylated/hybrid glycans in the semen of the infertile male patients group and in the semen of the control group (men with a proved fertility).
3. Identification of proteins with the biggest difference in glycosylation patterns between fertile and infertile men.
4. Identification of highly mannosylated/hybrid glycans and its detailed structural description.

Materials and methods

Seminal plasma was collected from infertile patients of the 2nd Department and Clinic of Gynaecology, Obstetrics and Neonatology, Wrocław Medical University, for intrauterine insemination. The patients were diagnosed and divided into four groups: normozoospermic, oligozoospermic, asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic. The control group were fertile men who had fathered at least one child over the last two years.

The glycans structures were identified by lectin-blotting. Fucosylated glycans were identified with *Aleuria aurantia* lectin, and mannosylated glycans were detected with *Galanthus nivalis* lectin. Densitometric and statistical analyses were performed on blots with stained glycoprotein fractions to find significant differences between protein fractions for each group of patients.

The identification of glycosylated proteins was performed by immunoblotting with specific antibodies and with mass spectrometry. In-gel digestion was performed and spectral analysis made on isolated glycoproteins. Highly mannosylated proteins were isolated from GNL-agarose chromatography and next identified in LC-MS/MS.

The glycans isolated from the affinity chromatography were cut off with endoglycosidase, purified and identified using MALDI-TOF.

Results

The analysis of fucosylation identified 12 fractions of glycoproteins reacting strongly with AAL lectin. Statistical analysis revealed differences in nine protein fractions between the pooled group of the infertile patients and the control group. There were no statistical differences between individual groups of infertile patients in 8 out of 12 glycoprotein fractions. The density of the fucosylated proteins showed differences in 11 out of 12 protein fractions between the pooled group of the infertile patients and the control group, but no difference between individual groups of the infertile patients.

Reactivity with *Galanthus nivalis* lectin was different than with *Aleuria aurantia* lectin. It showed 4 mannosylated fractions with one molecular mass and fraction GNL-5, which included protein fragments with a molecular mass below 20 kDa.

Mannosylation analysis revealed a decreased expression of GNL-reactive oligosaccharides in the normozoospermic group as compared to the control group and other groups of infertile patients. This was observed both with regard to the mannosylated/hybrid glycans and the density of mannosylated/hybrid epitopes in GNL1-4 fractions. Fragments with a molecular mass below 20 kDa showed an increased number of mannosylated epitopes but there were no changes in the density of the mannosylated glycans. The GNL1-4 fractions also reacted with AAL, which suggests that glycoproteins have more than one place of glycosylation, because highly mannosylated glycans rarely include fucose in their structure.

The identification of AAL- and GNL-reactive proteins was performed in two different ways: one using specific antibodies and the other using mass spectrometry. Immunoblotting confirmed the presence of glycoproteins, which are treated as markers of changing glycosylation connected with some diseases (transferrin, α_1 -acid glycoprotein, fibronectin, antitrombin III, α_1 -antitrypsin). These glycoproteins are also found in seminal plasma. Proteins characteristic only for seminal plasma were also identified, e.g., prostate specific antigen (PSA), glycodelin S, prostatic acid phosphatase (PAP) and chorionic gonadotropin. Identification of these proteins was additionally confirmed with mass spectrometry.

Another identification of glycoproteins isolated in GNL-agarose chromatography was performed with spectrometric techniques. 12 proteins with highly mannosylated epitopes were identified with LC-MS/MS. In MALDI-TOF the presence of highly mannosylated and hybrid glycans was confirmed. Many complex types of oligosaccharides were also present.

Conclusions

- The expression of both the fucosylated and the highly mannosylated glycans correlates with the fertility potential in men.
- A higher fucosylation of glycans was observed in all the groups of patients with a decreased fertility, independently of the sperm condition.

- An increased expression of mannosylated glycans was observed only in the normozoospermic patients group.
- The group of seminal plasma glycoproteins includes both highly mannosylated and complex glycans in the same molecule, which resembles glycosylation of glycodelin S.
- Incorrect glycosylation of seminal proteins may disturb their interaction with sperm, disrupting as a result the regulation of the fertilisation mechanism.