Thesis Title Glycoproteomic Analysis of Haptoglobin in Lung Cancer Patients

Author Mr. Kongsak Boonyapranai

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Advisor
Prof. Dr. Shui-Tein Chen	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Lalida Shank	Co-advisor

ABSTRACT

Haptoglobin (Hp) is a high abundant glycoprotein in the serum, of which its glycosylation change is increasingly discussed as a potential biomarker for number of diseases, but few data have emphasized this evidence in lung cancer. The aim of this study was to investigate an aberrant glycan structure of Hp from the serum sample of lung cancer patients. However, Hp presents in human with three phenotypes: Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2. Distributions of Hp phenotypes among lung cancer and healthy donors were examined. In addition, association of Hp phenotypes with an aberrant glycan structure of Hp was also analyzed. These purposes were to be addressed by gel-based glycoproteomics approaches with mass spectrometric analysis.

Through application of gel electrophoresis and specific carbohydrate-recognized lectins, significant increases of the serum and fucosylation level of Hp were found in lung cancer patients (n = 44, stage III and VI) compared to those in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

healthy donors (*n* = 26). These changes was even more pronounced in patients with Non-small cell lung cancer (NSCLC) (*n* = 33) than Small cell lung cancer (SCLC) (*n* = 11). Receiver operator characteristic curves (ROC) revealed that the fucosylation change of Hp has a better ability to discriminate the lung cancer and healthy donor than Hp itself. *N*-linked glycans released from a purified Hp were analyzed by MALDI-TOF-MS. Mass spectra showed a higher intense of ions corresponding to fucosylated glycans in lung cancer samples compared to healthy samples. Further characterization of fucose linkage by MALDI-TOF/TOF-MS indicated the glycosidic linkage of α1,3-fucose on HexNAc at antennary part, which was apparently a sialyl Lewis^X structure. These results suggest that increasing of the Hp fucosylation, which forms sialyl Lewis^X epitope, in the serum can be applied as diagnostic biomarker for lung cancer.

Additionally, our finding reveals the novel Hp isoform containing three glycosylation sites in the serum samples. Amino acid sequencing by LC-ESI-MS/MS and protein annotation indicated that this isoform lacks glycan moiety at N241, even the glycosylation sequon is conserved.

Individual samples were classified according to Hp phenotypes using Native-PAGE followed by western blot, showing a significant difference of phenotypic distribution between lung cancer patients and healthy donors. Overrepresentation of the patients with Hp1-1 and Hp2-1 phenotypes correlated to an increased frequency of the Hp1 allele among the patients (0.34 vs. 0.23 for the healthy donors). This result suggests Hp phenotypic dependent risk factor for lung cancer. Even though, serum level of Hp in lung cancer patients was independent by phenotypes. However fucosylation levels slightly vary with phenotypes, being lower

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

for Hp2-2 patients than Hp1-1 and Hp2-1 respectively. Our finding reminds that classification of the Hp phenotypes is necessary to improve accuracy in use of these parameters for clinical diagnosis.

The *N*-linked glycosylation status of individual Hp multimers differing in both size and conformation was determined. The *N*-linked glycan profiling indicated that the degree of glycosylation of Hp depended on the assembled monomer and its conformation. Amounts of terminal sialic acid (SA), fucosylated glycans, and triantennary glycans were lower presented in the larger multimer. These alterations may contribute to properties variants among three phenotypes and cause the low fucosylation level of Hp2-2 phenotypes. Molecular modeling of the Hp multimer demonstrates a critical effect of steric hindrance on multimer formation and the enlargement of the glycan moieties.

In conclusion, the present study illustrates insight into the detailed glycosylation status of the serum Hp and reports the diagnostic potential of Hp fucosylation to be lung cancer biomarker.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ทางไกลโคโปรทีโอมิคส์ของแฮปโทโกลบินในผู้ป่วยมะเร็งปอด

ผู้เขียน นายคงศักดิ์ บุญยะประณัย

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. สุ่ย เทียน เฉิน	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ลลิดา แชงค์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

แฮปโทโกลบิน คือ ไกลโคโปรตีนที่พบได้มากในซีรัม การเปลี่ยนแปลงไกลแคนบนไกลโคโปรตีนชนิดนี้ได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อยๆ ในฐานะที่มีศักยภาพในการบ่งชี้โรคหลายๆ ชนิด แต่มีการศึกษาไม่มากนักที่กล่าวถึงโรคมะเร็งปอด เป้าหมายของการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะค้นหาการเปลี่ยนแปลงของไกลแคนบนแฮปโทโกลบินจากซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอด อย่างไรก็ตาม แฮปโทโกลบินในมนุษย์มีอยู่สามฟีโนไทป์ คือ Hp1-1, Hp2-1 และ Hp2-2 การกระจายของฟีโนไทป์ทั้งสามของแฮปโทโกลบินในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งจึงได้ถูกเปรียบเทียบกับกลุ่มคนสุขภาพดี นอกจากนี้การสัมพันธ์ของฟีโนไทป์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไกลแคนที่ผันแปรไปของแฮปโทโกลบินก็ถูกวิเคราะห์เช่นกัน จุดมุ่งหมายเหล่านี้ได้รับการศึกษาโดยใช้กระบวนการทางไกลโคโปรทีโอมิคส์บนพื้นฐานของเจลอิเล็คโทรโฟเรซิส ร่วมกับการวิเคราะห์ทางแมสสเปก-โทรเมทรี

จากการใช้ของเจลอิเล็คโทรโฟเรซิสและเลคตินที่จำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตจำเพาะ พบว่า ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอด (n = 44, ระยะที่สาม และสี่) มีปริมาณแฮปโทโกลบิน และน้ำตาลฟูโคสบนไกลแคนของไกลโคโปรตีนนี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สองในคนสุขภาพดี (n = 26) การเปลี่ยนแปลงเห็นได้เด่นชัดในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิด NSCLC (n = 33) มากกว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิด SCLC (n = 11) receiver operator characteristic curve (ROC) เปิดเผยให้เห็นว่า ระดับการเพิ่มขึ้นของการเติมน้ำตาลฟูโคสของแฮปโทโกลบินมีความสามารถในการจำแนกคนที่เป็นมะเร็งปอดออกจากคนที่มีสุขภาพดี ได้ดีกว่าการใช้ปริมาณของแฮปโทโกลบินเพียงอย่างเดียว ไกลแคนที่ถูกตัดออกมาจากแฮปโทโกลบินบริสุทธิ์ได้รับการวิเคราะห์โดย MALDI-TOF-MS แมสสเปคทราจากตัวอย่างมะเร็งปอด แสดงให้เห็นถึงไอออนที่เทียบเคียงได้กับไกลแคนที่มีน้ำตาลฟูโคสอยู่ด้วย จะมีปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างจากคนสุขภาพดี การตรวจวิเคราะห์ทางคุณลักษณะในขั้นต่อมาของชนิดการเชื่อมต่อของน้ำตาลฟูโคสโดยใช้ MALDI-TOF/TOF-MS บ่งชี้ว่า เป็นน้ำตาลฟูโคสเชื่อมต่อด้วยพันธะ α1, 3 กับน้ำตาล HexNAc ที่ส่วนของแขนงภายนอกของไกลแคน ซึ่งเป็นคุณลักษณะโครงสร้างของ sialyl Lewis^{x} ผลการทดลองเหล่านี้นำเสนอให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของการเติมฟูโคสของแฮปโทโกลบิน ซึ่งเป็นโครงสร้างของ sialyl Lewis^{X} ในซีรัม สามารถประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งเพื่อเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งปอดได้

นอกจากนี้ การศึกษายังเผยให้เห็นถึงไอโซฟอร์มใหม่ของแฮปโทโกลบินในซีรัม ซึ่งมีการเติมไกลแคนเพียงแค่สามตำแหน่ง การหาลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้ LC-ESI-MS/MS และตรวจสอบชนิดของโปรตีน บ่งชี้ว่า ไอโซฟอร์มใหม่นี้ไม่มีไกลแคนที่ตำแหน่ง N241 แม้ว่าลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวจะยังคงเหมือนเดิม

หลังจากจัดจำแนกตัวอย่างตามแต่ฟีโนไทป์ของแฮปโทโกลบิน โดยการใช้ Native-PAGE ตามด้วย western blot พบว่า การกระจายฟีโนไทป์ของแฮปโทโกลบินระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดและคนสุขภาพดีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สัดส่วนที่มากขึ้นของผู้ป่วยที่เป็นฟีโนไทป์ Hp1-1 และ Hp2-1 สัมพันธ์กับความถี่ที่เพิ่มขึ้นของ *Hp^{1} allele* ในกลุ่มผู้ป่วย (0.34 vs. 0.23 ของคนสุขภาพดี) ผลการทดลองนี้ชี้ถึงปัจจัยเสี่ยงอันเนื่องจากฟีโนไทป์ของแฮปโทโกลบินสำหรับโรคมะเร็งปอด ทั้งนี้แม้ว่าปริมาณของแฮปโทโกลบินในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดจะไม่ขึ้นอยู่กับฟีโนไทป์ของแฮปโทโกลบิน แต่ระดับของน้ำตาลฟูโคสบนไกลแคนของแฮปโท-โกลบินนั้นกลับผันแปรโดยฟีโนไทป์ กล่าวคือ มีระดับต่ำกว่าในผู้ป่วยที่เป็นฟีโนไทป์ Hp2-2 เมื่อเทียบกับ Hp1-1 และ Hp2-1 ตามลำดับ การค้นพบนี้จึงย้ำเตือนให้เห็นความสำคัญการจัดจำแนก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟีโนไทป์ของแฮปโทโกลบิน ซึ่งจะช่วยเสริมความแม่นยำในการใช้พารามิเตอร์เหล่านี้สำหรับการวินิจฉัยทางคลีนิค

ภาพรวมของไกลแคนบนแฮปโทโกลบินมัลติเมอร์แบบต่างๆ ซึ่งแต่งต่างทั้งขนาดและรูปลักษณะของโครงสร้างได้ถูกศึกษาในลำดับต่อมา ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ว่า โครงสร้างของไกลแคนนั้นจะแตกต่างไปตามแต่จำนวนของโมโนเมอร์ที่มาประกอบกัน และรูปลักษณะของมัลติเมอร์ โดยในมัลติเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ ปริมาณของน้ำตาลกรดไซอะลิค, ฟูโคส และไกลแคนที่มีสามแขนงจะพบได้น้อยลง การผันแปรนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติที่ต่างกันของแฮปโทโกลบินจากสามฟีโนไทป์ และน่าจะเป็นสาเหตุให้มีระดับของน้ำตาลฟูโคสต่ำในคนที่เป็นฟีโนไทป์ Hp2-2 แบบจำลองโมเลกุลของแฮปโทรโกลบินมัลติเมอร์แสดงถึงผลกระทบที่จากการกีดขวางทางโครงสร้างอันเกิดจากการรวมตัวกันเป็นมัลติเมอร์ ต่อการเพิ่มขนาดของโครงสร้างไกลแคน

โดยสรุป การศึกษาชิ้นนี้ ได้แสดงรายละเอียดโครงสร้างไกลแคนของแฮปโทรโกลบินในซีรัม และแสดงถึงศักยภาพของการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลฟูโคสของแฮปโทรโกลบิน ในการเป็นตัวบ่งชี้เพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งปอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved