

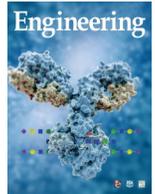


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Glycomedicine—Article

人前列腺特异性抗原携带含酮基-脱氧壬酮糖酸的 N-聚糖

Wei Wang^a, Tao Zhang^a, Jan Nouta^a, Peter A. van Veelen^a, Noortje de Haan^{a,b}, Theo M. de Reijke^c,
Manfred Wuhrer^a, Guinevere S.M. Lageveen-Kammeijer^{a,d,*}

^a Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, Leiden 2333 ZA, Netherlands

^b Copenhagen Center for Glycomics, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Copenhagen DK-2200, Denmark

^c Department of Urology, Amsterdam University Medical Centers, Location Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam 1105 AZ, Netherlands

^d Analytical Biochemistry, Groningen Research Institute of Pharmacy, Faculty of Science and Engineering, University of Groningen, Groningen 9747 AG, Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2022

Revised 20 December 2022

Accepted 8 February 2023

Available online 11 April 2023

关键词

酮基-脱氧壬酮糖酸

糖基化

前列腺癌

前列腺特异性抗原

摘要

酮基-脱氧壬酮糖酸(Kdn)是哺乳动物中相当少见的唾液酸。然而,已经发现游离或偶联Kdn浓度升高与人类癌症进展之间存在关联。迄今为止,还缺乏确凿的证据表明Kdn发生在(特定的)人类糖蛋白(偶联的Kdn)上。本文首次报道了Kdn在来自人类精浆和尿液的前列腺特异性抗原(PSA)N-连接聚糖上表达。有趣的是,仅在触角半乳糖 α 2,3-连接结构中发现了Kdn,表明Kdn具有高度特异性的生物合成。在与前列腺癌(PCa)相关的尿PSA队列中也发现了这种不寻常的糖基化特征,尽管在PCa和非PCa患者之间没有发现差异。需要进一步研究游离Kdn和偶联Kdn在人类中的发生、生物合成、生物作用和生物标志物的潜力。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

酮基-脱氧壬酮糖酸(Kdn)是一种脱氨基神经氨酸,广泛分布于细菌和脊椎动物中[1]。Kdn是结构上高度多样化的唾液酸单糖家族的一部分[2]。自从首次在虹鳟鱼卵中发现Kdn以来,在广泛的糖缀合物(包括糖脂、N-和O-连接糖蛋白和荚膜多糖)上也发现了有不同连接形式(α 2,3、 α 2,4、 α 2,6和 α 2,8)的Kdn[3–6]。有研究认为,Kdn与虹鳟鱼卵的皮质肺泡多聚唾液糖蛋白的附着,发生在连接到O-聚糖非还原末端N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)的 α 2,8-连接处,是一个封端反应。该反应防止细菌唾液

酸酶水解低聚/聚唾液酸链,表明Kdn在鲑鱼的早期胚胎发育中起着重要作用[7]。后来的研究表明,Kdn的各种连接是在生物合成过程中控制唾液酸基链延伸程度的“锚链固定器”(chain stoppers)[8]。此外,在虹鳟鱼精子发生过程中观察到不同的含Kdn神经节苷脂的分期和位点特异性表达,表明含Kdn神经节苷脂可能在这一过程中发挥重要作用[9–10]。Kdn也被认为是鱼类皮肤黏液和其他器官的重要唾液酸成分[1,11]。此外,致病性链霉菌细胞壁聚合物中Kdn的存在,表明Kdn参与了致病菌附着于宿主植物细胞的早期阶段,导致马铃薯和根茎作物疮痂病[12–13]。

* Corresponding author.

E-mail address: g.s.m.kammeijer@rug.nl (G.S.M. Lageveen-Kammeijer).

2095-8099/© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 26(7): 119–131

引用本文: Wei Wang, Tao Zhang, Jan Nouta, Peter A. van Veelen, Noortje de Haan, Theo M. de Reijke, Manfred Wuhrer, Guinevere S.M. Lageveen-Kammeijer. Human Prostate-Specific Antigen Carries N-Glycans with Ketodeoxynononic Acid. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.02.009>

相比在细菌和大多数脊椎动物中的生物合成, 通过将胞质蛋白 *N*-乙酰神经氨酸 9-磷酸合酶 (Neu5Ac-9-P 合酶, 这是 Kdn 合成的关键酶) 42 位上的一个苏氨酸替换为一个蛋氨酸[14], Kdn 的生物合成在大多数哺乳动物中是失活的。众所周知, 在两种哺乳动物[偶蹄类和灵长类动物(包括人类)]中, 这种胞质蛋白的活性被独立恢复以合成 Kdn9 磷酸[14–15]。因此, Kdn 仍然可以在低浓度下产生, 因为 Neu5Ac-9-P 合酶在 Kdn 生产中的活性远低于其在 *N*-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 生产中的活性[16]。

各种研究报道了 Kdn 作为一种游离单糖存在于哺乳动物中[17–19], 只有少量作为胞苷单磷酸 (CMP)-Kdn [17]或与糖脂和糖蛋白结合[20]。Kawanishi 等[14]证明了 Kdn 的产生与甘露糖的摄入有关, 导致尿液中游离 Kdn 的排泄增加。也有报道称, 与健康志愿者相比, 终末期肾病患者的游离 Kdn 血清水平显著升高[14]。此外, 与正常对照组相比, 在卵巢肿瘤组织和腹水癌细胞中发现游离 Kdn 单糖和 CMP-Kdn 水平升高[17]。同样, 在人类前列腺癌 (PCa) 组织中发现了大量含 Kdn 的 N-聚糖[21]。

一些研究已经调查了蛋白质或脂质相关 Kdn 的存在。在人类各种癌细胞、癌症组织和正常组织中, 已经发现游离态和结合态 Kdn 的典型数量相比 Neu5Ac 减少 100~1000 倍[17–20]。由于结合态 Kdn 的丰度较低, 只有在水解后才对其进行研究[17–20], 因此必然导致 Kdn 载体信息的丢失。尽管如此, 在体内和体外, Kdn 的存在与多种人类癌症有关。例如, 在糖脂和糖蛋白 (从人肺癌细胞中提取) 水解后的人肺癌细胞系 (A125、A549、Calu 和 Hotz) 中观察到 Kdn。虽然目前尚不清楚 Kdn 是游离形式还是结合形式, 但在头颈部癌症患者的喉咙组织中也发现了 Kdn [19], 因为组织经过轻度酸水解处理, 并且在水解之前没有进行提取。在人卵巢畸胎瘤细胞系 PA-1 中, 观察到游离 Kdn 和两种不同的含 Kdn 的糖蛋白: 通过免疫印迹试验检测的可溶性蛋白 (49 kDa) 和膜相关蛋白 (30 kDa) [18]。通过使用针对 Kdn(α 2,3)Gal(β 1) 表位的单克隆抗体以及使用 KDNase 来检测 30 kDa 糖蛋白中 Kdn 的存在。49 kDa 蛋白对单克隆抗体没有反应, 但对 KDNase 有反应, 表明该糖蛋白在 α 2,3 连接以外的另一个连接中含有 Kdn。虽然这是证明哺乳动物含 Kdn 糖蛋白的第一个报道, 但研究人员无法确定这些糖蛋白的性质。

在本研究中, 首次鉴定并表征了哺乳动物糖蛋白前列腺特异性抗原 (PSA) 上 Kdn 的表达。该糖蛋白被用作 PCa 的诊断工具, 因为循环中浓度升高 ($> 3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 表明患 PCa 的风险增加。然而, 由于这种生物标志物的特异

性较低, 因此迫切需要一种更好的生物标志物来防止过度诊断[22–23]。多项研究表明, PSA N-糖组图谱的改变可能是 PCa 发生的更好指标[24–26]; 特别是, 唾液酸化在这方面被认为是一个很有前途的糖基化特征[24–25]。如上所述, 在人类 PCa 组织中存在含游离 Kdn 的 N-聚糖, 表明 Kdn 可能在 PCa 中发挥作用[21], 因此可作为诊断标记物; 然而, 仍需进一步的研究。本文报道了提取自精浆的 PSA 上存在含结合态 Kdn 的 N-聚糖, 通过释放的 N-聚糖和糖肽的串联质谱 (MS/MS) 进行表征。此外, 在一个临床队列研究中, 使用来自血清 PSA 浓度升高的患者的尿液 PSA, 研究了 PSA 上 Kdn 的丰度。

2. 材料和方法

2.1. 化学品和标准品

来自精浆的 PSA 标准品购自 Lee BioSolutions 公司 (美国)。经 TPCK 处理的胰蛋白酶 (牛胰腺) 购自 Worthington Biochemical 公司 (美国)。肽 N-糖苷酶 F (PNGase F) 购自 Roche Diagnostics 公司 (德国)。碳酸氢铵 (ABC)、乙酸铵、Dowex 阳离子交换树脂 (50W-X8)、氯化钠 (NaCl)、50% 羟胺水溶液、盐酸盐 (HCl)、硼氢化钠 (NaBH_4)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA)、二甲亚砜 (DMSO)、氢氧化铵溶液和 2-甲基吡啶硼烷复合物 (PB) 从 Sigma-Aldrich 公司 (德国) 获得。异丙醇、甲酸 (FA)、冰醋酸、氢氧化钾 (KOH) 和液相色谱-质谱 (LC-MS) 级的水均来自 Honeywell Fluka 公司 (德国)。 β -巯基乙醇 (β ME) 和 Nonidet P-40 (NP40) 替代品购自 VWR International, LLC 公司 (美国), 而 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 购自 Fluorochem 公司 (英国)。LC-MS 级的乙腈 (MeCN) 来自 Biosolve 公司 (荷兰)。邻氨基苯甲酸 (2-AA)、40% 二甲胺水溶液、20% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 水溶液和 1-羟基苯并三唑水合物 (HOBt) 来自 Sigma-Aldrich (瑞士)。碳酸氢钠 (NaBC)、氢氧化钠 (NaOH)、甲醇、乙醇、2-丙醇、三氟乙酸 (TFA)、磷酸氢二钠二水合物 (Na_2HPO_4) 和磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 购自 Merck 公司 (德国)。Milli-Q 水 (MQ) 由 Q-Gard 2 系统 (Millipore, 荷兰) 产生, 保持在 $\geq 18 \text{ M}\Omega$ 。5 倍浓缩的 PBS ($5 \times \text{PBS}$) 由 $0.16 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 和 $0.73 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ ($\text{pH} = 7.3$) 制成。利用 MQ 稀释 $5 \times \text{PBS}$, 得到 $1 \times \text{PBS}$ ($\text{pH} = 7.6$)。圆锥形 96 孔 Nunc 板购自 Thermo Fisher Scientific 公司 (美国)。固相萃取 (SPE) 大块吸附碳从 Grace Discovery Sciences 公司 (美国) 获得。从 Millipore

公司获得多屏 HTS 96 多孔板（孔径为 0.45 μm ），具有高蛋白结合膜[疏水固定剂-P 聚偏氟乙烯（PVDF）膜]和 96 孔聚丙烯（PP）微孔板。一个 96 孔 PP 过滤板购自 Orochem Technologies 公司（美国）。TMTzero 标记试剂购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

2.2. 临床样本

使用由 10 个健康女性尿液样本组成的女性尿液池（FUP）进行尿液 PSA 检测，样本收集于莱顿大学医学中心（Leiden University Medical Center, LUMC）。FUP 作为临床队列分析的阴性对照和阳性对照（加入 PSA 标准）。来自疑似 PCa 患者的尿液样本[基于目前使用的 PCa 生物标志物 PSA，在血清浓度升高时（ $> 3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ），建议患者进行进一步检查]收集于阿姆斯特丹大学医学中心（Amsterdam University Medical Center）泌尿科。膀胱炎、接受化疗、使用 5-还原酶抑制剂、有癌症病史或非前列腺泌尿系统疾病的患者被排除在研究之外。在前列腺活检前，共采集了 52 份尿液样本。尿液样本和临床信息的收集得到了阿姆斯特丹大学医学中心医学伦理委员会的批准（W16_010#16.020）。患者的临床信息（如年龄、血清 PSA 浓度、前列腺体积、种族、临床肿瘤分期、Gleason 评分）见附录 A 中的表 S1。尿液捐赠（5~96 mL）后，将尿液冷却至室温（RT），并保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。更多关于抗 PSA 抗体和从尿液样本中捕获的 PSA 信息见附录 A 中的 S1.1 和 S1.2 部分。对尿液样本分两批进行处理。第一批样品在之前的研究[27]中进行了制备和分析；剩余的尿液（完全制备的样品；捕获和消化）保存了大约 6 个月，在当前测量之前进行了三次冻融循环。第二批样品最多只储存了两周，并进行了一次冻融循环。

2.3. 通过反相纳米液相色谱-质谱/质谱（RP-nanoLC-MS/MS）[四极杆飞行时间（Q-ToF）]对释放的 PSA N-聚糖进行 2-AA 标记

共取 PSA 标准品 10 μL （预浓缩至 $7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ）加入至 20 μL 、2% 的 SDS 中，在振荡器上以最大速度振荡 5 min。然后在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min。将样品冷却至 RT，并向样品中加入 20 μL 释放混合物（10 μL 、4% NP40，10 μL 酸性 5 \times PBS 和 1 μL PNGase F）。样品在振荡器上以最大速度再振荡 5 min。随后，样品在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜（ON）。在 2-AA 标记之前，通过棉花亲水相互作用液相色谱（HILIC）SPE 纯化 PSA 释放的 N-聚糖，如前所述[28]。简而言之，纯化 1 μL PSA 释放的 N-聚糖，然后用 10 μL MQ 洗脱。按之前所述方法[29-30]进行标记。然后，将 50 μL 释放的

PSA N-聚糖加入到由 25 μL 2-AA 溶液组成的 50 μL 标记溶液（ $48 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ，按 85% DMSO : 15% 乙酸的比例）和 25 μL PB 溶液（在 DMSO 中为 $107 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ）中。混合后，样品在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。注射前，将 PSA 聚糖用水稀释至 $3.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

2.4. 通过多孔石墨化碳（PGC）-nanoLC-MS/MS（离子阱）释放的 PSA N-聚糖进行阴性模式分析

PSA N-聚糖的释放采用 96 孔板样品制备方法，如前所述[31]。简而言之，将 20 μL 的 PSA 标准品（ $1.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ）以 96 孔板的形式加载在疏水性固定剂-P PVDF 膜上。随后，采用 75 μL 的变性混合物（72.5 μL 、 $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GuHCl 和 2.5 μL 、 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT）对样品进行变性处理，并在室温下振动培养板 15 min。然后，将样品置于潮湿的盒子中在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。通过离心分离（500g, 2 min）去除任何未结合的物质。每孔中加入 PNGase F（将 2 U 的酶用 MQ 稀释至 15 μL ），以释放 N-聚糖，然后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行 ON 孵育。通过离心分离（500g, 2 min）从 PVDF 板中洗脱释放的 N-聚糖。通过在样品中加入 20 μL 、 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵（ $\text{pH} = 5$ ）和在室温下额外孵育 1 h，水解释放的 N-聚糖的糖胺，随后在 SpeedVac 浓缩器 5301（Eppendorf, 德国）中在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下蒸发。为了减少释放的 N-聚糖和除去释放的 N-聚糖的盐分，本研究进行了 PGC-SPE 清除。为此，使用基于聚合酶链反应 96 孔板的方案[31]将 20 μL 、 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaBH_4 （50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH 溶液中）加入每个孔。此外，在 SpeedVac 浓缩器中干燥样品，用 10 μL MQ 使其恢复原状，并在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存，然后用 PGC-nanoLC-MS/MS 进行分析。

2.5. 胰蛋白酶 PSA 糖肽

关于酶切程序的更多信息见附录 A 中的 S1.3 部分。

2.6. 胰蛋白酶 PSA 糖肽的衍生化——通过毛细管电泳（CE）-MS/MS（Q-ToF）进行阳性模式分析的二甲基酰胺化（DA）

酶切后，对来自 PSA 标准品（精浆）的胰蛋白酶 PSA 糖肽进行衍生以稳定唾液酸，并能够区分不同的连接，如参考文献[28]所述。将 1 μL 胰蛋白酶 PSA 酶切物加入至 20 μL DA 试剂（ $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDC、 $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HOBt 和 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲胺的 DMSO）中，并在 96 孔板中以 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 一起孵育 1 h。加入 8 μL 、28% 氢氧化铵溶液后，样品在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下再孵育 2 h。用棉花 HILIC SPE 从反应混合物中富集 PSA 糖肽。将糖肽在 10 μL 的水中进行洗脱，保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，然后进行 CE-MS 分析。

2.7. 胰蛋白酶PSA糖肽的衍生化——通过RP-nanoLC-MS/MS(Orbitrap)进行正电离模式分析的TMTzero标记

采用胺反应性串联质量标签TMTzerr来提高胰蛋白酶PSA糖肽的疏水性。设计TMT标签用于MS水平的蛋白定量,以修饰赖氨酸残基和肽N端。简而言之,制备5 μL 的胰蛋白酶PSA (200 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)和2 μL TMTzero标签试剂的MeCN (4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)的混合物,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2 h。加入1.2 μL 、5%的羟胺,使反应淬灭,然后在室温下再孵育15 min。

2.8. CE-MS/MS

所有的CE-MS测量都是在CESI 8000系统(SCIEX, 美国)上进行的,该系统安装一个中性的OptiMS试剂盒(未捕获样品)或一个内部UltraTrol涂层的BFS OptiMS毛细管(捕获样品);两个毛细管长91 cm,内径(i.d.)为30 μm ,外径(o.d.)为150 μm (SCIEX)。使用在多孔尖端外壳上有一个内部聚合物锥体的OptiMS Bruker MS适配器(SCIEX),将CESI 8000系统与UHR-QqToF maXis Impact HD质谱仪(Bruker Daltonics, 德国)耦合在一起,以允许使用富含掺杂剂的氮(DEN)气体[32]。在分析之前,按照制造商的说明对中性OptiMS试剂盒进行调适,按照Lageveen-Kammeijer等[33]的描述,对BFS OptiMS毛细管进行调适,并采用UltraTrol动态预涂层“低标准”(LN)电渗透流配方(Target Discovery, 美国)进行内部涂层。

为了分析中性OptiMS毛细管,在20 kV和20 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,使用含有20%乙酸($\text{pH} = 2.3$)的背景电解质(BGE)进行CE分离。在注射前,将样品与4 μL 前导电解质(LE; 1200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵, $\text{pH} = 3.2$)混合。所有标准品(来自精浆的PSA)均采用10 psi (1 psi = 6894.757 Pa)压力[相当于毛细管总体积(87 nL)的13.5%]注射60 s。样品注射后,采用2.5 psi的压力注射BGE post-plug 10 s (0.56%的毛细管体积)。使用20%乙酸,将10% MeOH作为BGE ($\text{pH} = 2.0$),在30 kV、24 $^{\circ}\text{C}$ 下对内部涂层的BFS OptiMS毛细管进行分析。共使用临床样本1.5 μL ,加入1.0 μL 、250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵[pH 值为4.0 (LE)]。在1 psi压力下进行水动力注射,持续60 s,相当于毛细管总体积(9 nL)的1.4%。随后,在0.5 psi压力下注射BGE post-plug,持续25 s (0.3%的毛细管体积)。

所有实验均在正电离模式下进行。在玻璃毛细管电压(位于1100 V到1300 V之间)下实现电喷雾电离(ESI)。在0.2 bar [1 bar = 10^5 Pa]下使用MeCN作为DEN气体的掺

杂物。温度和干燥气体(氮气)流速分别设置为150 $^{\circ}\text{C}$ 和1.2 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在 m/z 200和 m/z 2000之间采集MS,以1 Hz作为光谱采集速率。

2.9. RP-nanoLC-MS/MS(Q-ToF)

用于2-AA标记释放的N-聚糖分析的系统如下:一个Ultimate 3000高效液相色谱(HPLC)系统(Thermo Fisher Scientific),耦合maXis Impact HD Q-ToF-MS设备(Bruker Daltonics),配备一个Acclaim PepMap100 C18陷阱柱(5 mm \times 300 μm ; Thermo Fisher Scientific)和一个Ascentis Express C18 nanoLC分析柱(50 mm \times 75 μm ,含有2.7 μm 的熔融核心粒子; Supelco, 美国)。流动相A由一种水溶液(0.1%的TFA; V/V)组成,而流动相B由95% MeCN的MQ (V/V)组成。按每分钟增加移动相1.73%来设置梯度速度。为了提高灵敏度,以MeCN为掺杂剂,采用0.2 bar下的DEN气体。设置干气流量为3.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,干燥温度为180 $^{\circ}\text{C}$ 。MS和MS/MS均在 m/z 150和 m/z 2800之间的正电离模式下获得,光谱采集频率为1 Hz。

2.10. RP-nanoLC-MS/MS(Orbitrap)

TMT标记的胰蛋白酶PSA糖肽是在nanoLC-MS系统上测量的,该系统由Easy nLC1200梯度HPLC系统(Thermo Fisher Scientific, 德国)联合Orbitrap Fusion LU-MOS MS (Thermo Fisher Scientific)组成。TMT标记的10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶PSA糖肽类(在20 μL 水中)冻干并溶解在10 μL 溶剂A(水/MeCN/FA; 95.0/3.0/0.1, $V/V/V$)中,装载至内部包装的C18前置柱(100 $\mu\text{m}\times$ 15 mm; Reprosil-Pur C18-AQ 3 μm , 德国),并在国产的nanoLC分析柱(50 cm \times 75 μm ; Reprosil-Pur C18-AQ 3 μm)上分离。对于分析物的洗脱,设置溶剂B在20 min内的线性梯度(10%~40%; 水/MeCN/FA; 20.0/80.0/0.1, $V/V/V$)。拉长nanoLC柱使其形成约5 μm 的尖端,作为质谱源的电喷雾针。MS在依赖于数据的MS/MS模式(前20名模式)下运行。在自动增益控制(AGC)标准目标值下,以最大积累时间50 ms,获得了质量范围为 m/z 750至 m/z 1800的MS1图谱。MS1扫描的分辨率被设定为120 000。动态排除设置为10 s,按一次重复计数,MS/MS包含2~3种电荷状态。在AGC目标为 2×10^4 的情况下,MS/MS扫描的分辨率为30 000,最大填充时间为60 ms。在扫描范围(m/z)为110~3500时,用四极杆分离的前驱体产生了MS/MS图谱,分离宽度为1.2 Da。使用了12个最丰富的胰蛋白酶PSA糖肽的排除列表(见附录A中的表S2)。一旦在

m/z 204.087 (容许偏差为 15 pm) 处检测到 *N*-乙酰己糖胺 (HexNAc) 氧离子, 高能碰撞解离 (HCD) 扫描将被触发, 归一化能量为 25%、32% 和 39%, 归一化 AGC 目标为 200%, 最大填充时间为 200 ms [34]。

2.11. PGC-nanoLC-ESI-MS/MS

释放的 PSA *N*-聚糖的测量在 Ultimate 3000 ultra-HPLC (UHPLC) 系统 (Thermo Fisher Scientific) 上进行, 该系统耦合一个 amaZon 电子转移解离 (ETD) 速度离子阱 (Bruker Daltonics Inc.), 配备一个自制 PGC 陷阱柱 (5 μm Hypercarb, 320 μm \times 30 mm) 和自制 PGC 纳米柱 (3 μm Hypercarb, 100 μm \times 150 mm)。溶剂 A 由 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABC 组成, 溶剂 B 由 60% MeCN 和 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABC 组成。为了分析释放的 *N*-聚糖, 将 10 μL 样品中的 3 μL 注入, 并在 2% 的缓冲液 B 中以 6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的加载速率将样品装载至陷阱柱上, 持续时间 5 min。为了实现分离, 采用多级梯度, 其中溶剂 B 在 1 min 中从 2% 增加到 9%, 然后在 80 min 中增加到 49%。每次分析后, 使用 95% 的溶剂 B, 以 0.6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速, 进行 10 min 的洗涤步骤。以异丙醇为掺杂剂, nanoBooster 源促进电离。在 5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下, 柱温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压为 1000 V, 干气体温度为 280 $^{\circ}\text{C}$, 并应用 3 psi 的喷雾器。智能参数被设定为 m/z 1200。在 m/z 500 至 m/z 1850 范围内, 采用负离子模式在增强模式下获得 MS 光谱。在 m/z 100 至 m/z 2500 范围内获得了三个强度最大的 MS/MS 光谱。

2.12. 数据分析

对从 Bruker MS 仪器 (RP-nanoLC-MS (/MS)、PGC-nanoLC-MS (/MS (/MS)) 获得的原始数据采用 Data-Analysis 5.0 (Build 203; Bruker Daltonics) 进行分析, 用于糖肽和聚糖的发现和鉴定。在峰值积分之前, CE-MS (/MS) 数据用钠加合物进行内部重新校准。PSA 糖肽和 *N*-聚糖组成由单、双、三电荷分析物的前三个同位素提取 (m/z 窗口为 ± 0.02), 获得提取的离子色谱/电泳图 (EIC/EIE; 用高斯拟合平滑)。EIC 和 EIE 用于评价分析物的洗脱时间 (LC) 和迁移时间 (CE)、准确质量 (± 20 ppm) 和同位素峰模式 (与理论同位素模式比较), 然后对峰面积进行积分。通过在单个分析中对所有分析物的总面积进行积分来实现相对定量。基于已知的负离子模式下的 MS/MS 碎片模式, 在 PGC-nanoLC-MS/MS 分析中确定 *N*-聚糖结构, 使用的软件为 Glycoworkbench [35] 和 Glycomod [36]。

对于临床样本, 当分析物的迁移时间属于正确的迁移

聚类, 在 -10~10 之间观察到百万分之一 (ppm) 的误差, 并且该分析物至少存在于超过 2/3 的光谱中时, 则对该分析物进行进一步的数据分析。光谱管理是根据在光谱中确定的分析物的数量进行的。如果鉴定出的分析物数量低于 60 (在单个光谱中检测到的最高分析物数量的 2/3), 则排除光谱。最后, 将所纳入分析物的绝对面积归一化为所有分析物的绝对面积之和 (总面积归一化)。使用 R (版本 3.4.3, R Foundation for Statistical Computing) 和 RStudio (版本 1.2.1335) 对临床样本进行进一步的数据分析。通过对两批样品的主成分分析 (PCA; R, pcaMethods) 对数据进行可视化。

对使用 Thermo MS 仪器获得的原始 RP-nanoLC-MS (/MS) 数据进行高质量精度分析, 通过 Xcalibur (Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48, 美国) 手动进行, 以获得更可靠的糖肽确认。

3. 结果

本文提出了一项基于 MS 的研究, 证明了来自不同生物流体 (精浆和尿液; 表 1) 的人类 PSA 上存在 Kdn 唾液酸化。在 PSA 上鉴定出 4 个含有 Kdn 的 *N*-聚糖: H5N4F1S1K1、H5N4F1K1 (其中 H 代表己糖, N 代表 *N*-乙酰己糖, F 代表岩藻糖, S 代表 Neu5Ac, K 代表 Kdn) 及其非岩藻糖基化变体 [图 1 (a)]。采用 4 种互补的分析平台, 即 RP-nanoLC 以正离子模式与 Orbitrap 或 Q-ToF-MS 设备耦合, CE-MS (正离子模式; Q-ToF) 和 PGC-nanoLC-MS (负离子模式; 离子阱) 进行表征和相对定量, 并获得碰撞诱导的 MS/MS (见表 1 和附录 A 中的图 S3)。利用有和没有连接特异性唾液酸化衍生化对糖肽进行评估。

为了进行结构鉴定, 分别用 RP-nanoLC-MS/MS 和 PGC-nanoLC-MS/MS 对还原端标记和还原的 *N*-聚糖进行分析。此外, 对于 PSA 上 Kdn 的存在及 Kdn 与 PCa 的关系, 研究了来自男性尿液的 PSA 和浓度升高 ($> 3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的血清 PSA。虽然含有 Kdn 的 *N*-聚糖是在 PSA 标准品 (该标准品相当纯净) 上被鉴定出来的, 但不能假定从生物流体中捕获的 PSA 也是如此。也就是说, 其他糖蛋白的特异性结合可能导致共捕获, 在 *N*-聚糖释放的情况下, 样品中所有的 *N*-聚糖都会被释放。其他糖蛋白的污染将导致一个有偏差的糖组学图谱。在污染的情况下, PSA 的糖组学图谱将是具有偏差的。通过进行蛋白水解, PSA 糖肽可以被特异性靶向, 因为肽部分可以作为 PSA 的标识符。

表1 利用串联质谱的不同分析方法获得含Kdn的PSA聚糖/糖肽的鉴定和关键信息

Analytical platform	Mass analyzer	Ionization mode	Analyte class	Analyte modification	Key information
CE-MS	Q-ToF	Positive	Glycopeptides	NA	Kdn expression is indicated by the presence of the oxonium ion of H1N1K1 antennae in MS/MS spectra of four tryptic glycopeptides of PSA (glycosylation site N ₆₉). Site-specific glycosylation of PSA site N ₆₉ is indicated via tryptic glycopeptide backbone asparagine-lysine (NK)
				DA followed by amidation	Sialic acid derivatization of Kdn on PSA is demonstrated to be solely α 2,3-linked
RP-nanoLC-MS	Q-ToF	Positive	Released N-glycans	2-AA labeling	Kdn expression is further supported by the presence of oxonium ions of H1N1K1 and H2N1K1 in MS/MS spectra
PGC-nanoLC-MS	Ion trap	Negative	Released N-glycans	Reduction	MS/MS analysis reveals the Kdn monosaccharide to be a deprotonated ion. Arm occupancy by Kdn is elucidated
RP-nanoLC-MS	Orbitrap	Positive	Glycopeptides	TMT labeling	MS/MS analysis reveals the oxonium ion of the Kdn monosaccharide at high mass accuracy

NA: not available.

3.1. Kdn在哺乳动物PSA上的表达

PSA上4个含Kdn的N-聚糖最初是用CE-MS观察到的。CE-MS以其高灵敏度而闻名，它可以检测低丰度的分析物，如结合状态的Kdn。值得注意的是，用CE-MS对非衍生的PSA糖肽的MS/MS进行了检查，发现了不同的B和Y离子，这对于从人类来源（在 m/z 616.208¹⁺处的B离子和在 m/z 1606.621¹⁺、 m/z 1752.679¹⁺、 m/z 1768.674¹⁺和 m/z 1914.732¹⁺处的Y离子；见图1和附录A中的图S1）提取的N-聚糖是不常见的。在 m/z 616.208¹⁺处对氧铵离子的观察表明，存在一个Kdn修饰。在这种情况下，氧铵离子在 m/z 616.208¹⁺处表示H1N1K1组成，在 m/z 1606.621¹⁺、 m/z 1752.679¹⁺、 m/z 1768.674¹⁺和 m/z 1914.732¹⁺处不同的Y离子可分别归为H3N3K1[NK]、H3N3F1K1[NK]、H4N3K1[NK]和H4N3F1K1[NK]（其中[NK]为胰蛋白酶PSA糖肽的天冬酰胺-赖氨酸肽部分）。

有趣的是，通过生成 m/z 1140.436²⁺处的EIE，发现了一些异构体，对应于Kdn-糖肽H5N4F1K1 [NK]的质量[见附录A中的图S1 (a)]。靠近Kdn-糖肽类[与氧离子在 m/z 616.208¹⁺处结合形成H1N1K1，见附录A中的图S1 (e) ~ (g)]，MS/MS显示存在异构杂合型N-聚糖H6N3F1S1 [NK]{分别由在 m/z 657.235¹⁺处的H1N1S1、 m/z 1826.716¹⁺处的H5N3F1[NK]（失去一个H1S1）和 m/z 1988.769¹⁺处的H6N3F1[NK] [失去S1，见附录A中的图S1 (f) ~ (h)]组成}，这与之前的发现一致[27]。与这些发现一致的是，检测到一系列缺乏岩藻糖的变异体。更具体地说，是 m/z 1067.407²⁺处的碎片对应于1.4.1峰[显示同时存在含Kdn的糖肽H5N4K1[NK]；H1N1K1在 m/z 616.208¹⁺处，见附录A中的图S1 (i)]和一个杂合型N-聚糖H6N3S1[NK]

(H1N1S1在 m/z 657.235¹⁺处，H5N3[NK]在 m/z 1680.658¹⁺处，H6N3[NK]在 m/z 1842.711¹⁺处)，而 m/z 1067.407²⁺处的碎片对应于1.4.2峰，表示唯一存在H6N3S1[NK] [见附录A中的图S1 (j)]。

用CE-MS/MS方法对所有4种N-聚糖成分的异构分离进行观察（见图1和附录A中的图S1）。基于CE的分离特性及其分离不同连接的唾液酸的能力[37]，本文假设这些结构大多数将显示唾液酸连接差异。因此，为了进一步表征这些异构体，对胰蛋白酶PSA糖肽进行了连接特异性唾液酸衍生化[28]，然后进行了CE-MS。与Neu5Ac相似，不同连接的Kdn具有相同的质量。衍生化使 α 2,6-连接的Kdn发生二甲基酰胺化 (+27.0473 Da)，而 α 2,3-连接的Kdn经历了酰胺化 (-0.9840 Da)。由此产生的质量差异使同分异构体得以区分。在没有Neu5Ac (H5N4Ka1和H5N4F1Ka1；Ka: α 2,3-连接的酰胺化Kdn)的情况下，导致含Kdn N-聚糖组分的每个物种产生一个峰，而含有Kdn和Neu5Ac的N-聚糖组分各显示为两个单独的异构体 [H5N4Ka1A1、H5N4Ka1D1、H5N4F1Ka1A1和H5N4F1Ka1D1；A: α 2,3-连接的酰胺化Neu5Ac；D: α 2,6-连接的二甲基酰胺化Neu5Ac。见图2及附录A中的图S2、图S3（反应方案）和表S3]。

有趣的是，Kdn唾液酸化触角仅在 α 2,3-连接构型中被检测到，这进一步得到了MS/MS的支持[图2 (b)和(c)]。更具体地说，是 m/z 615.224¹⁺处的氧铵离子证实了H1N1Ka1触角，而与H1N1Kd1对应的氧离子 (Kd: α 2,6-连接的二甲基化Kdn；预期质量为 m/z 643.256¹⁺) 未被检测到 (图2)。前驱体离子在 m/z 1144.955²⁺处的碎片进一步证实了附着在二肽[NK]上的复合型N-聚糖

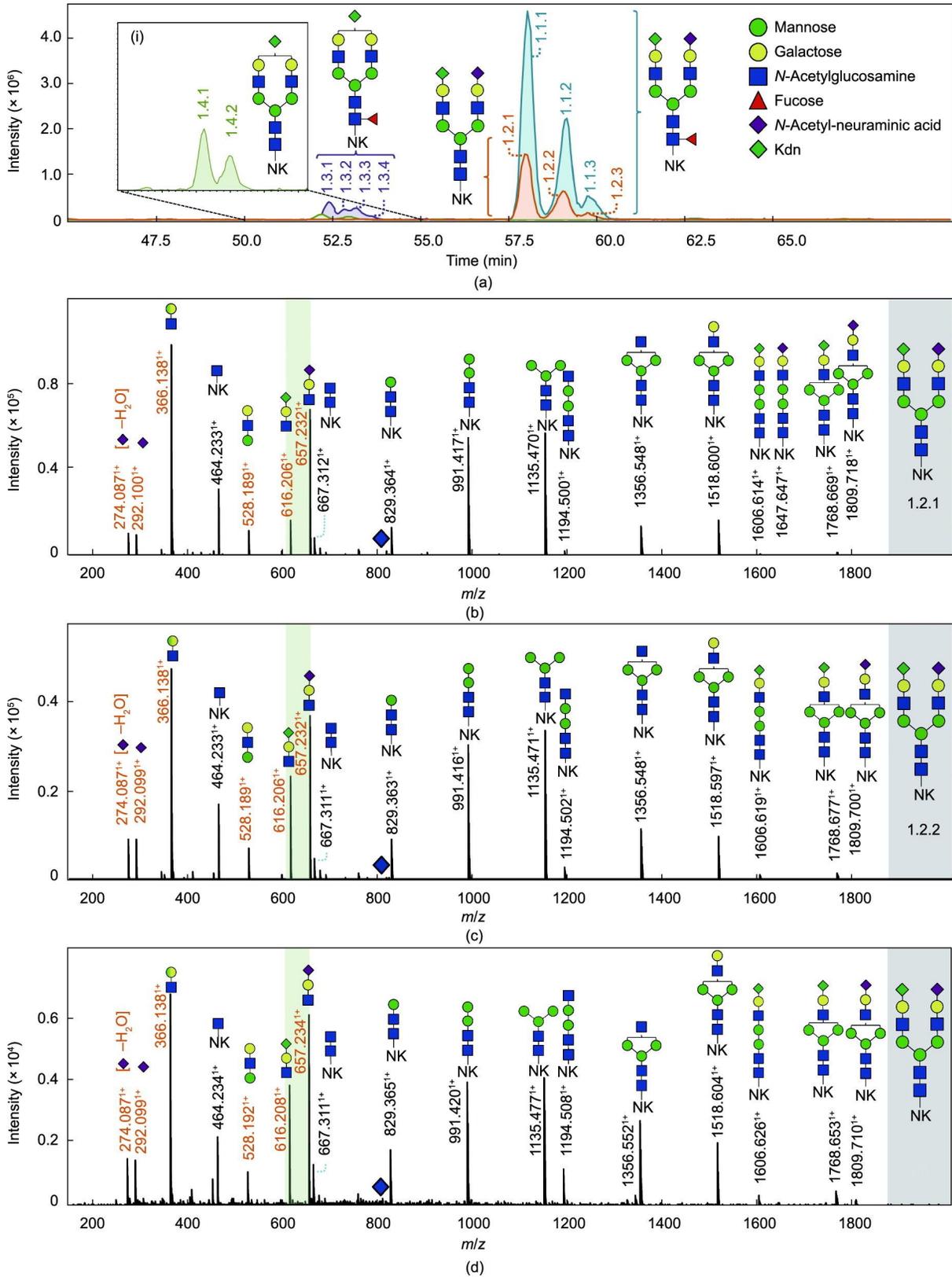


图1. 利用CE-MS/MS在正电离子模式下鉴定天然胰蛋白酶PSA糖肽上的Kdn基序(H1N1K1)。(a)含H1N1K1基序的4种糖肽的EIE: H5N4F1S1K1[NK] (三种异构体: 1.1.1、1.1.2、1.1.3); H5N4S1K1[NK] (三种异构体: 1.2.1、1.2.2、1.2.3); H5N4F1K1[NK] (4种异构体: 1.3.1、1.3.2、1.3.3、1.3.4); H5N4K1[NK] [两种异构体: 1.4.1、1.4.2(i)]。(b)串联质谱对应于H5N4S1K1[NK]的第一个异构体。(c)串联质谱对应于H5N4H1K1[NK]第二个异构体。(d)串联质谱对应于H5N4S1K1[NK]的第三个异构体。氧化铵(B-)离子和Y离子分别用橙色和黑色突出显示。蓝色的方形表示先驱体离子。绿色图分别显示了 m/z 616.208处和 m/z 657.242处的Kdn(H1N1K1)和Neu5Ac(H1N1S1)触角。Kdn结构并不专属于 α 1,6触角或 α 1,3触角。其他同分异构体的碎片化数据见附录A中的图S1。

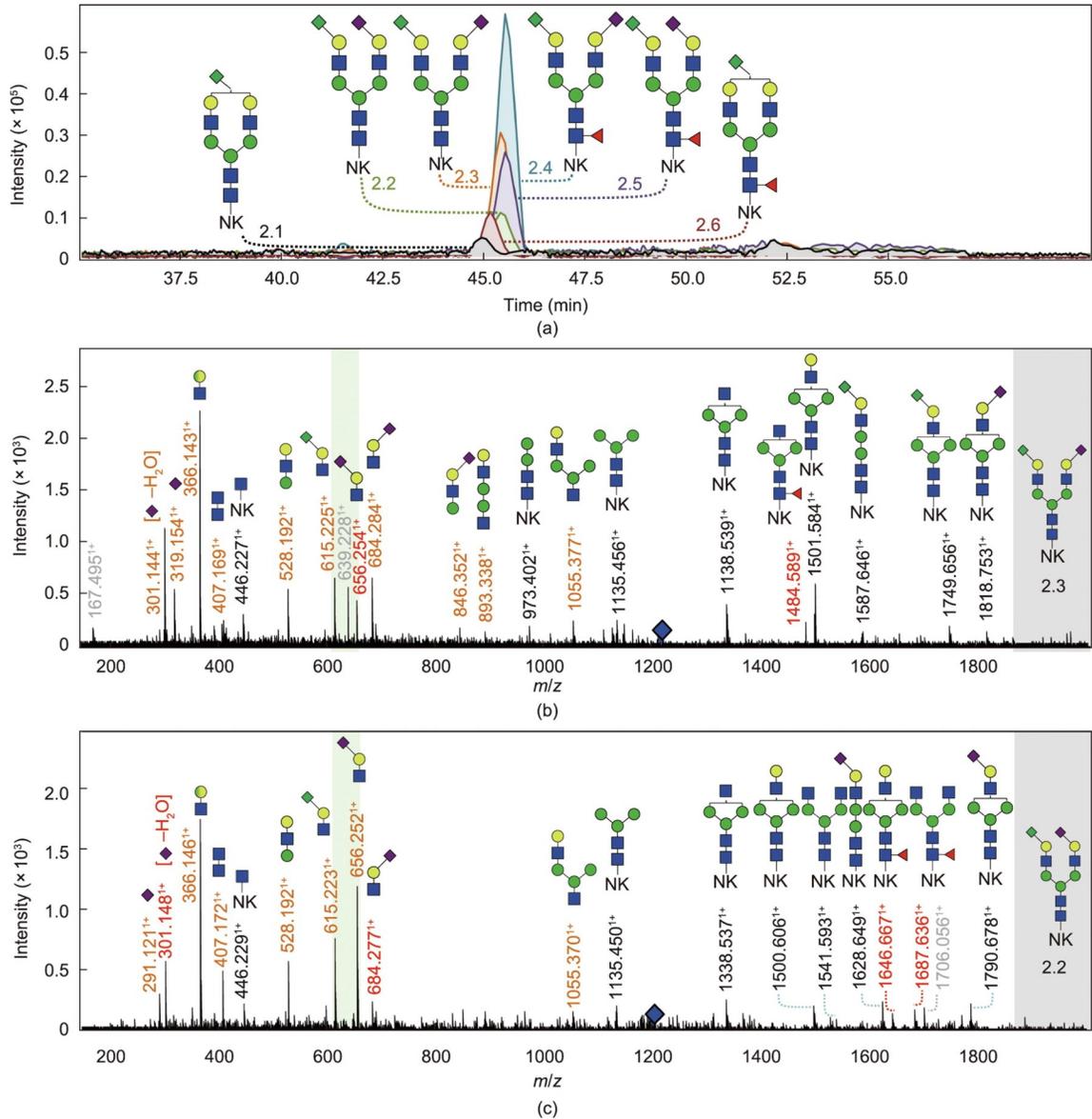


图2. 用CE-MS/MS以正电离模式鉴定衍生的PSA糖肽上的Kdn基序(H1N1K1)。(a)唾液酸化衍生后含有H1N1K1基序的4种糖肽的EIE: H5N4K1[NK] (2.1)、H5N4F1K1[NK] (2.6)、H5N4F1S1K1[NK] (两种异构体: 2.4和2.5)和H5N4S1K1[NK] (两种异构体: 2.2和2.3)。H5N4A1D1[NK] (2.3)的串联质谱和(b) H5N4A2[NK] (2.2)的串联质谱(c)。氧化铵(B⁻)离子和Y离子分别用橙色和黑色突出显示。灰色突出显示的离子是来自共分离分析物的离子,其 m/z 值与碎片化前体离子相似。蓝色的方形表示前驱体离子。在 m/z 615.224⁺ (H1N1Ka1)处存在氧铵离子和在 m/z 643.256⁺ (H1N1Kd1)处没有氧铵离子表示H1N1K1基序的出现,表明Kdn连接只存在于一个 α 2,3-连接(绿色图片)中。Kdn结构并不专属于 α 1,6触角或 α 1,3触角。分析物2.1和分析物2.4-2.6的碎片化数据见附录A中的图S2。

(H5N4F1Ka1)和杂合型N-聚糖(H6N3F1A1)的共洗脱和存在。在MS/MS中发现了一些特定的离子,支持了这些聚糖的共存[分别对应于Y离子H5N2F1[NK]和B离子H1N1Ka1、H1N1A1和H6N2的 m/z 1605.626⁺、 m/z 615.229⁺、 m/z 656.256⁺、 m/z 1379.483⁺;见附录A中的图S2(e)],这与非生化样品的结果一致。

为了进一步探索同分异构体的存在,并更深入地了解异构体所对应的组分和连接,从PSA中释放N-聚糖,用2-AA标记,利用通过正电离模式的RP-nanoLC-MS(Q-ToF)进行分析(见附录A中的图S4和表S3)。释放的N-

聚糖没有被保留在C18柱上,不能用RP-LC-MS直接分析。为了提高疏水性,在N-聚糖中添加了一个2-AA标记(一种开发良好、常用的聚糖标记,且具有相对较高的标记效率[38-39])。通过这种方法,所有4个含Kdn的N-聚糖都被鉴定出来,并通过MS/MS光谱中 m/z 616.208⁺处(H1N1K1)的氧离子的存在得到确认。在 m/z 778.261⁺处(H2N1K1)的氧铵离子进一步证实了Kdn唾液酸化触角的存在。其他不同的Y离子,如 m/z 1631.593⁺处的H3N3F1K1[2AA]、 m/z 1793.646⁺处的H4N3F1K1[2AA],以及它们的非岩藻糖基化变体也被检测到。对于组分为

H5N4F1S1K1[2AA]的N-聚糖,也观察到了 m/z 1100.406²⁺处H5N4F1K1[2AA]和 m/z 1079.893²⁺处H5N4F1S1[2AA]的Y离子。此外,在 m/z 1079.893²⁺处含有母离子的*k*、*l*、*j*峰的碎片包含离子,表明由于在 m/z 616.208¹⁺处观察到H1N1K1,在 m/z 657.235¹⁺处观察到H1N1S1,以及在 m/z 1502.550¹⁺观察到H5N2F1[2AA][见附录A中的图S4(j)~(l)],杂合型N-聚糖H6N3F1S1[2AA]和H5N4F1K1[2AA](峰*k*)都存在,或仅存在其中一个(分别为峰*l*和峰*j*)。这一发现与CE-MS的结果一致。

为了进一步了解臂的占用率,在负离子模式下用PGC-nanoLC-MS测量了酶释放和还原的PSA N-聚糖(图3)。由于PGC-nanoLC-MS平台中使用的离子阱对用于CE-MS的Q-TOF不敏感,因此进行了高浓度注射。与CE-MS中的一样,在PGC-nanoLC-MS中观察到H5N4F1K1S1的三种异构体(见图3附录A中的图S5),以及非岩藻糖基化聚糖(H5N4K1S1)。PSA上出现的Kdn部分通过不同的离子得到证实,如在 m/z 249.06¹⁻处的B1离子(K1)、 m/z 614.19¹⁻处的B3离子(H1N1K1)、 m/z 2037.73¹⁻处的Y6离子(H5N4F1K1),以及Kdn的损失[m/z 2078.75¹⁻(H5N4F1S1)];对Neu5Ac的观察支持了这一发现[m/z 290.09¹⁻(S1)和 m/z 655.22¹⁻(H1N1S1)]。通过PGC-nanoLC-MS/MS观察到三种不同的异构体,碎片光谱中的D离子显示了每个异构体的Kdn位于哪个臂。而 m/z 938.30¹⁻处的D离子表明Kdn位于 α 1,6臂[异构体2;图3(c)],另一个D离子(在 m/z 979.33¹⁻处)表明, α 1,6臂被Neu5Ac占据,Kdn存在于 α 1,3臂[异构体3;图3(d)]。如图3(b)所示,第一个峰包含 m/z 938.30¹⁻和 m/z 979.33¹⁻处的两个离子,表明该峰对应两种分析物的共洗脱,含有H5N4F1S1K1结构(在 α 1,3臂或 α 1,6臂上都有Kdn)。离子之间的比例意味着Kdn主要存在于 α 1,3臂上,在 α 1,6臂上较少。不幸的是,虽然观察到三种异构体,但从H5N4S1K1的碎片光谱没有获得有关臂占用率的确切信息(见附录A中的图S5)。

为了进一步支持本文的发现,采用RP-nanoLC-MS(Orbitrap)进行了高质量精度的MS/MS分析(见图4和附录A中的和图S6)。为了通过提供足够的保留量来分析RP C18柱上的PSA糖二肽,需要引入一个名为TMTzero的串联质量标签标记,该标记也作为一个“轻”标签被设计用于MS水平的肽定量。此外,TMT标记的目的是提高分析物的电离效率。在低质量范围内(m/z 251.0760¹⁺[K1]、 m/z 215.0549¹⁺[K1-2H₂O]和 m/z 616.2082¹⁺[H1N1K1])发现了Kdn特征的明显的氧离子。鉴定出的含Kdn的糖肽和含Kdn的碎片离子均在低百万分之一

(ppm)的误差范围内(± 5 ppm;见附录A中的图S7)。

根据CE-MS结果(未进行衍生化),具有同分异构体区别的4种含Kdn的聚糖(H5N4K1、H5N4F1K1、H5N4K1S1和H5N4F1K1S1)的总体相对丰度均低于PSA标准(来自精浆;见附录A中的表S4)中鉴定的所有糖肽的0.80%。大多数PSA糖肽(不含Kdn)的聚糖结构在之前的研究[27]中通过CE-MS/MS进行了鉴定。在所有鉴定的含Kdn的聚糖中,H5N4F1K_{2,3}1S_{2,6}1[NK](异构体1)的相对丰度最高为0.78%。

3.2. Kdn在尿液PSA队列中的表达

为了研究Kdn基序能否在患者尿液中的PSA上被检测到,本文重新分析了之前的临床队列[27],并纳入了其他患者样本(共52例患者,血清PSA浓度升高, >3 ng·mL⁻¹)。所采用的尿液PSA测试的可重复性之前通过测定三天的日内和日间精度(每天三次重复)得到验证,并在每个测量批次前后测量系统适用性样本,以监测CE-MS的性能[27]。因为男性尿液含有PSA,所以不适合在PSA捕获过程研究中使用。相比之下,FUP不含PSA,其基质与男性尿液样本最接近,因此,被选择用于方案开发。通过将一个PSA标准加入FUP,能够验证整体检测的性能。

9个个体的数据被排除在外,因为超过三分之一的PSA糖肽由于低信号强度没有被观察到。其余43例患者的尿液数据被纳入该数据集(21例PCa和22例非PCa;临床信息见附录A中的表S1)。71个PSA N-糖肽得到全面鉴定,包括唾液酸异构体的区分。通过PCA进行数据可视化,两个批次的阳性对照(添加精浆PSA标准品的FUP)聚类表明,两个批次之间没有实质性的差异,尽管采用两个不同的时间点进行处理,以及存在存储和冻融循环的差异(见附录A中的图S8)。合并患者样本(包括所有捕获和消化的批次1和批次2样本,共0.5 μ L)在个体患者样本中的聚类说明了CE-MS测量的低技术可变性。与来自精浆的PSA一致,Kdn唾液酸化在临床队列中的总体丰度也较低(见附录A中的表S1和图S8)。

在PCa样品中,H5N4K1[NK]的相对丰度为 $4.15\% \pm 1.58\%$ 、H5N4F1K1[NK]的为 $0.15\% \pm 0.04\%$ 、H5N4K1S1[NK]的为 $0.27\% \pm 0.15\%$ 、H5N4F1K1S1[NK]的为 $0.95\% \pm 0.39\%$ 。在非PCa样品中,H5N4K1[NK]的相对丰度为 $4.91\% \pm 1.48\%$ 、H5N4F1K1[NK]的为 $0.15\% \pm 0.04\%$ 、H5N4K1S1[NK]的为 $0.29\% \pm 0.14\%$ 、H5N4F1K1S1[NK]的为 $0.96\% \pm 0.24\%$ 。Kdn唾液酸化的差异较大,平均相对标准差(RSD)分别为41.20%(PCa患者)、32.44%(非PCa患者)和36.70%(所有患者),提示存在较大的

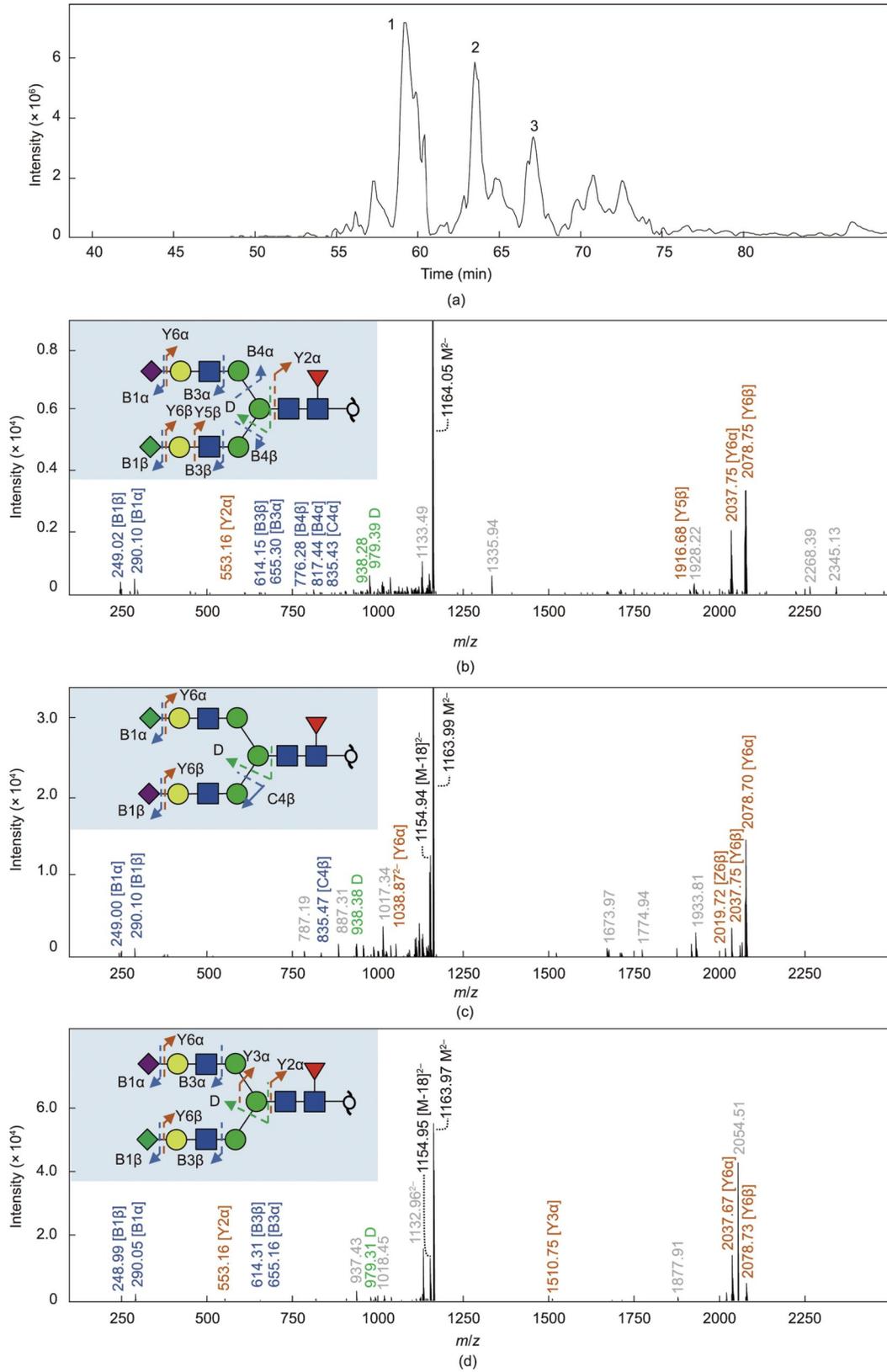


图3. 通过PGC-nanoLC-MS/MS在负离子模式下鉴定PSA释放的N-聚糖上的Kdn基序。(a) 从含有Kdn基序的PSA中释放的N-聚糖的EIC。释放的N-聚糖在质量为1163.91²时的碎片光谱表明这属于释放的N-聚糖，组分为H5N4F1K1S1。(b) H5N4F1K1S1异构体1的碎片光谱。(c) H5N4F1K1S1异构体2的碎片光谱。(d) H5N4F1K1S1异构体3的碎片光谱。B离子和C离子用蓝色突出显示。Y离子用橘色表示。绿色的D离子表示臂的占用率。M表示先驱体离子。在异构体1的光谱(b)中，均观察到m/z 979.33处和m/z 938.30处的离子，表明该异构体是H5N4F1K1S1与Kdn在 α 1,3臂或 α 1,6臂上的混合物(共洗脱)。(c)表示 α 1,6臂上有含Kdn的聚糖结构，(d)表示 α 1,3臂上有Kdn。

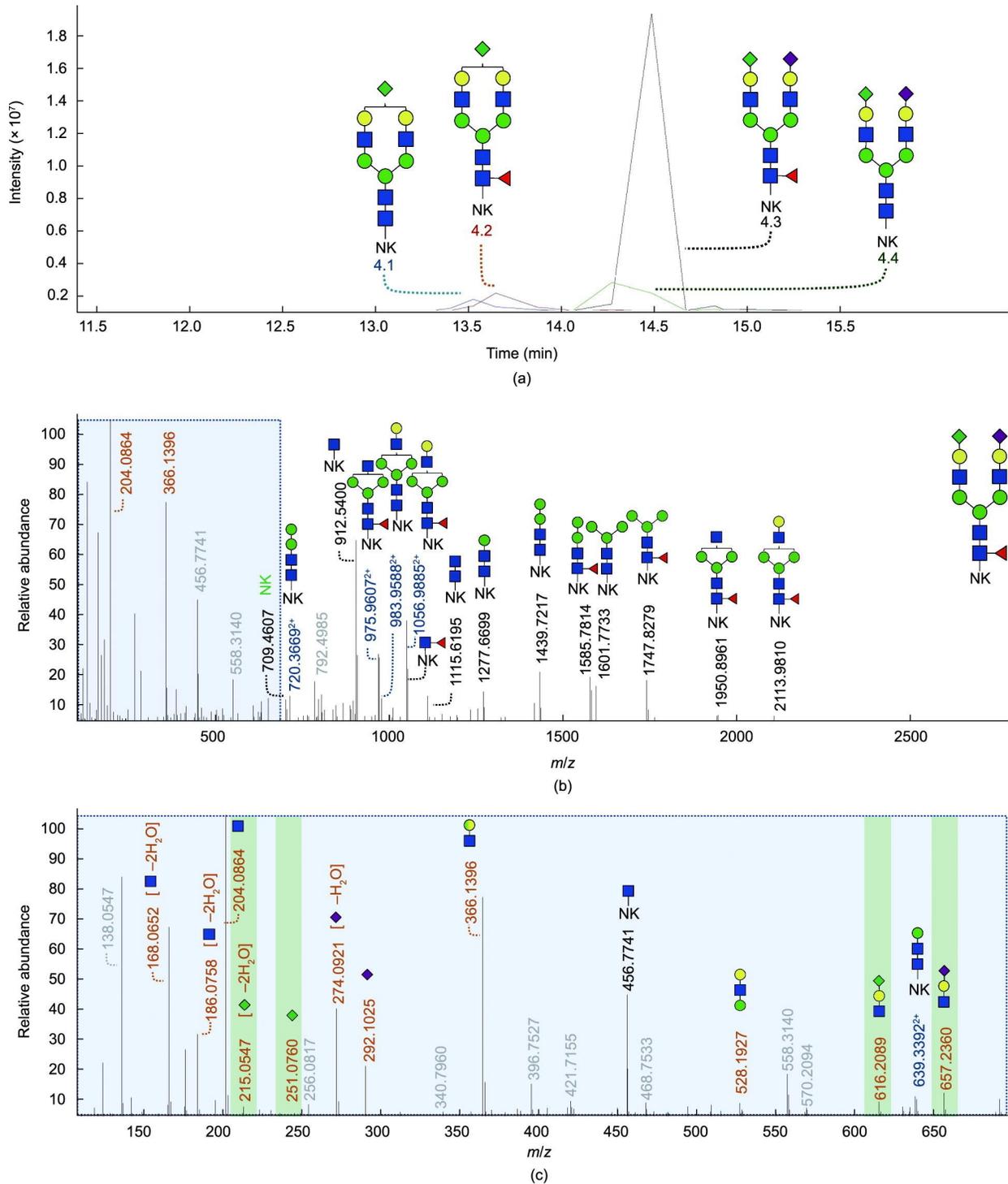


图4. 通过RP-LC-MS/MS (Orbitrap) 在正电离模式下鉴定TMT标记的PSA糖肽上的Kdn基序 (H1N1K1)。(a) 含有H1N1K1基序的4个糖肽的EIC: H5N4K1[NK] (4.1)、H5N4F1K1[NK] (4.2)、H5N4F1S1K1I[NK] (4.3) 和H5N4S1K1I[NK] (4.4)。糖肽H5N4F1S1K1的全范围 (b) 和放大串联质谱 (c), 前体质量为 m/z 1007.0930³⁺。在低质量范围内的全碎片光谱和扩展的碎片光谱表明, 该前体 m/z 属于含成分H5N4F1K1S1[NK-TMT]的糖肽类。氧化物 (B-) 离子用橙色突出显示。Y离子用黑色和蓝色突出显示, 分别表示单电荷和双电荷。灰色的未分配离子是未知的。Kdn基序并没有专门分配给 α 1,6触角或 α 1,3触角。单唾液酸化分析物的碎片数据如附录A中的图S6所示。

生物学变异。有趣的是, 研究发现, 胰蛋白酶PSA糖肽 (理论质量为2133.806 Da, 对应于N-糖肽组成H5N4K1[NK]或H6N3S1[NK]) 的来自尿液的队列样本的相对丰度比来自精浆的PSA标准品高100倍。属于H5N4K1[NK]和

H6N3S1[NK]的碎片前体质量显示, 样品中都存在这两种分析物 (见附录A中的图S9)。然而, 来自H6N3S1[NK]的碎片似乎比来自H5N4K1[NK]的碎片更丰富。最后, 研究发现, 在不同的疾病条件 (PCa与非PCa) 之间尿液中

的Kdn特征没有显著差异。

4. 讨论

4.1. Kdn在哺乳动物PSA上的表达

之前描述了分析物H6N3(F1)S2存在于精浆PSA和PSA血清浓度($> 3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)升高个体的尿液中[27–28]。然而,这些N-聚糖的结构未被阐明,目前还不清楚这些N-聚糖是复合型还是杂合型,以及假定的第二唾液酸的具体位置。为了进一步弄清楚这一点,用MS/MS研究了从精浆中提取的PSA标准品,并检测了PSA标准品中未识别的N-聚糖。通过结合4种不同分析方法获得的证据(表1),能够将这些N-聚糖归因于Kdn唾液酸化的发生。需要注意的是,N1K1和H1S1的组成是同分异构的,可以(部分地)将先前分配的H6N3(F1)S1和H6N3(F1)S2 N-聚糖重新分配给4个含Kdn的N-聚糖(H5N4K1、H5N4F1K1、H5N4K1S1和H5N4F1K1S1)。有趣的是,在所有4个互补平台上都观察到不同的H1N1K1氧离子,而不同的K1氧离子仅通过PGC-nanoLC-MS和RP-nanoLC-MS(Orbitrap)被观察到。这一结果可能与附着在半乳糖上的Kdn和Neu5Ac单糖之间的连接稳定性的差异有关,值得进一步探索。

通过CE-MS,可以观察到所有4种含Kdn的N-聚糖组成的异构体分离(见附录A中的图S1和图S10)。然而,观察到一些差异,例如,通过CE-MS观察到H5N4F1K1S1组分的三种异构体。而用RP-nanoLC-MS(Q-ToF)观察到4种异构体[见附录A中的图S4(a)],同样也观察到了非岩藻糖基化N-聚糖(H5N4K1S1)相应的质量。为了获得有关这些异构体是否与Kdn不同唾液酸连接相关的信息,本文分析了唾液酸连接特异性衍生的胰蛋白酶PSA糖肽。这些实验结果表明,Neu5Ac唾液酸化触角连接存在差异,而仅在 $\alpha 2,3$ 结构中观察到Kdn唾液酸化触角(图2)。这些发现与之前的一项研究相反,该研究报道了人类PCa组织中复合型游离N-聚糖的积累,Kdn以 $\alpha 2,3$ 和 $\alpha 2,6$ 结构与半乳糖相连[21]。此外,研究人员指出, $\alpha 2,6$ -Kdn N-聚糖是这些样品的主要形式,其积累很可能与降解不足有关。需要注意的是,在本研究中, $\alpha 2,6$ -Kdn N-聚糖仍然可能存在于PSA上,但低于分析方法的检测限度。此外,通过PGC-nanoLC-MS分析解决了Kdn触角占用问题,表明该问题是含Kdn聚糖异构体分离的主要决定因素。

4.2. Kdn在尿液PSA队列中的表达

糖基化反映了人类的健康和疾病。糖基化改变是几种

疾病的特征,尽管目前尚不清楚糖基化改变是由疾病引起还是会导致疾病[40]。随着对聚糖结构和功能的认识逐渐加深,糖基化在医学中的作用正在不断扩大,许多不同的技术已被研发并用于分析聚糖和糖缀合物。例如,MS技术实现了对聚糖的鉴定和表征,而用于聚糖合成的糖组学工程和化学酶技术促进了优化的糖组学疗法[即预防(疫苗)、预测和个性化糖医学]的发展[41–43]。异常糖基化具有成为更好地靶向疾病诊断和预后的生物标志物的潜力,并可能成为治疗的靶点[44]。目前,许多以聚糖为基础的治疗方法已投入使用或正在开发中,使用聚糖作为治疗药物或治疗药物的载体[40,45–47]。

本研究首次报道了来自精浆的PSA上含Kdn的N-聚糖。如前所述,人类癌细胞和组织中Kdn(游离单糖或结合型单糖)水平的升高表明,该糖与癌症的发展有关[40]。因此,Kdn修饰具有生物标志物的潜力,并可能最终成为癌症治疗的靶点。因此,探索Kdn对不同尿液和血清的PSA的修饰是很有趣的。

本研究探索了尿液糖组,因为分析血清PSA的糖组学图谱仍然具有挑战性:①血清PSA的浓度至少比尿液的低100倍[48–49],因此需要一个高度敏感的分析平台;②血浆是一种高度复杂和富含蛋白质的基质,使PSA的纯化或富集具有挑战性;③与其他蛋白质相比,PSA在血清/血浆中的丰度相对较低,这增加了特异性结合的风险和使分析复杂化。此外,一些研究已经揭示了改变的尿液糖组学图谱的生物标志物潜力[50–52],而且尿液收集对患者的侵入性较小。虽然在尿液中没有发现不同疾病条件(PCa与非PCa)之间的显著差异,但应该考虑的是,研究的队列了较小,并且尿液PSA样本显示出较高的多样性(如PSA浓度多样性高、每Gleason评分的患者数量相对较低、肿瘤临床分期不同等。)。因此,在得出关于这种不常见的单糖的诊断价值的有力结论之前,建议进行更大的队列调查。

此外,精浆PSA(阳性对照)来自健康个体,因此调查健康男性尿液PSA N-糖组是否也显示更高丰度的N-聚糖H6N3S1[NK]/H5N4K1[NK],以及这是否是一个与PSA浓度升高个体相关的特征的问题将是非常有趣的。此外,基于本研究的发现,应该重新评估先前糖组学研究中关于PSA的N-聚糖分配,该研究确定了H6N3(F1)S1的存在[28,50],认为PSA也可能包含被Kdn基序占据的N-聚糖,以及先前确定的N-聚糖可能包含H5N4(F1)K1或两个物种都存在。需要注意的是,这种考虑也可能适用于其他非PSA相关的N-糖组学研究,因此这些数据集也可能需要重新评估,以调查含Kdn的N-聚糖的存在。用更一般的

话来说, Kdn可能比目前认为的要普遍得多, 并且在哺乳动物N-聚糖的组成鉴定中考虑Kdn是有必要的。

基于MS的方法在人类疾病诊断方面具有巨大的潜力[53], 因为该方法可用于在许多临床领域(如新生儿筛查、治疗性药物监测、药物滥用和临床毒理学[54–56])识别和定量活性化合物。先进的MS技术的发展推动临床MS转向诊断应用中对肽和蛋白质的分析, 尽管质谱对这些化合物, 特别是对糖肽的定量分析仍然具有挑战性。一种有针对性的方法对于基于MS的诊断检查是首选。近年来, 一些基于MS的体外诊断已被应用于常规临床实践, 在不久的将来将有更多的方法实现从实验室到临床的过渡[57–58]。该技术具有显著的高灵敏度、特异性和在单一测量中检测多种疾病的能力, 在疾病检测和治疗监测方面具有非常强大的能力。如果在游离Kdn或在含Kdn的聚糖中发现了有前途的PCa生物标记物, 应进行基于MS的诊断方法的队列研究和临床试验, 以使这些生物标记物实现临床转化。人体内游离和结合的Kdn水平的升高与抗体介导的炎症的发生有关, 因为在汇集的人免疫球蛋白中检测到针对Kdn-聚糖的抗体[14]。因此, 提高Kdn水平的病理学条件可能导致抗体介导的炎症异常[14]。Kawanishi等[14]表明, 甘露糖的摄入导致人类尿液中游离Kdn增加, 并提出了假设, 即游离Kdn的生物合成是一个关键的代谢途径, 缓解了哺乳动物摄入过量甘露糖后胞质甘露糖6-磷酸和果糖6-磷酸的潜在毒性浓度。Go等[59]提出了一种在人类癌细胞中游离Kdn表达升高的机制: 晚期局部肿瘤缺氧的共同特征诱导了关键酶[即Neu5Ac-9-P合酶和磷酸甘露糖异构酶(PMI)]的活性和Kdn生物合成途径中相应酶mRNA的表达[59]。此外, 缺氧增强了甘露糖诱导的游离Kdn表达的增加[59]。研究表明, Neu5Ac-9-P合酶和CMP-唾液酸合酶都参与哺乳动物中含Neu5Ac和Neu5Gc聚糖的生物合成, 也催化Kdn和含Kdn聚糖的合成, 尽管效率低得多[18,60]。此外, 一项对人类细胞系的研究表明, 基因突变(PMI敲除)和斑马鱼Cmas基因转染可以迫使Kdn掺入细胞膜聚糖, 从而提高Kdn的利用率; 这意味着在自然条件下, Kdn在人类糖基化中的效用有限[14]。然而, 还需要进一步的研究来充分了解Kdn是如何融入人类糖组中的。此外, 未来的努力还应关注Kdn唾液酸化在其他生物液体和其他人类糖蛋白中的存在。最后, 研究表明, 在几种人类癌症以及终末期肾脏疾病中, 游离Kdn和Kdn唾液酸化水平升高。目前尚不清楚Kdn在这些疾病中起什么作用, 因此, 应该探讨Kdn与这些人类疾病的关系。最后, 关于人类疾病, 应充分利用游离Kdn和含Kdn的聚糖作为一种有价值的聚糖生物标志物或癌症治疗靶点

的潜力。

5. 结论

本研究提供了证据, 表明Kdn唾液酸化发生在来自不同生物流体(尿液和精浆)的PSA的N-连接聚糖上。此外, 这种单糖很可能不仅仅存在于PSA上, 也可能存在于其他哺乳动物的糖蛋白上; 这可能在以前的质谱研究中被误解了, 因为N1K1和H1S1组分具有相同的质量。建议进一步研究Kdn在人类糖蛋白和人体组织中的分布, 以及Kdn糖缀合物的生物合成和生物学相关性。

Acknowledgements

The authors would like to thank Arnoud de Ru, George M.C. Janssen, Carolien A.M. Koeleman, and Irina Dragan for their contributions to this study. This research was supported by the Chinese Scholarship Council, Cure for Cancer Foundation and Astellas Pharma B.V.

Authors' contributions

Wei Wang performed the experiments and data analysis. Tao Zhang performed the experiments and data analysis regarding PGC-nanoLC-MS. Jan Nouta and Guinevere S.M. Lageveen-Kammeijer performed the experiments regarding the clinical cohort. Peter A. van Veelen provided the Orbitrap measurements. Wei Wang, Manfred Wuhrer, and Guinevere S.M. Lageveen-Kammeijer conceptually designed the work, and wrote the manuscript. All authors read and commented on the manuscript.

Compliance with ethics guidelines

Wei Wang, Tao Zhang, Jan Nouta, Peter A. van Veelen, Noortje de Haan, Theo M. de Reijke, Manfred Wuhrer, and Guinevere S.M.Lageveen-Kammeijer declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Data availability

The raw mass spectrometric data files that support the

findings of this study and the clinical cohort data files are available in MassIVE in .mzXML format, with the identifier MSV000089140 [https://doi: 10.25345/C5BG2HF07]. All other data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.02.009>.

References

- [1] Inoue S, Kitajima K. KDN (deaminated neuraminic acid): dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconj J* 2006;23(5–6):277–90.
- [2] Schauer R, Kamerling JP. Exploration of the sialic acid world. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 2018;75:1–213.
- [3] Kanamori A, Inoue S, Iwasaki M, Kitajima K, Kawai G, Yokoyama S, et al. Deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein of rainbow trout egg vitelline envelope. Occurrence of a novel alpha-2,8-linked oligo(deaminated neuraminic acid) structure in O-linked glycan chains. *J Biol Chem* 1990;265(35):21811–9.
- [4] Kitazume S, Kitajima K, Inoue S, Troy 2nd FA, Cho JW, Lennarz WJ, et al. Identification of polysialic acid-containing glycoprotein in the jelly coat of sea urchin eggs. Occurrence of a novel type of polysialic acid structure. *J Biol Chem* 1994;269(36):22712–8.
- [5] Miyata S, Sato C, Kitamura S, Toriyama M, Kitajima K. A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an α 2,9-linked poly-*N*-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-O-sulfated sialic acid residue. *Glycobiology* 2004;14(9):827–40.
- [6] Tezuka T, Taguchi T, Kanamori A, Muto Y, Kitajima K, Inoue Y, et al. Identification and structural determination of the KDN-containing N-linked glycan chains consisting of bi- and triantennary complex-type units of KDN-glycoprotein previously isolated from rainbow trout vitelline envelopes. *Biochemistry* 1994;33(21):6495–502.
- [7] Nadano D, Iwasaki M, Endo S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-*D*-glycero-*D*-galactono-ulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J Biol Chem* 1986;261(25):11550–7.
- [8] Iwasaki M, Inoue S, Nadano D, Inoue Y. Isolation and structure of a novel deaminated neuraminic acid-containing oligosaccharide chain present in rainbow trout egg polysialoglycoprotein. *Biochemistry* 1987;26(5):1452–7.
- [9] Song Y, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. Isolation and structural elucidation of a novel type of ganglioside, deaminated neuraminic acid (KDN)-containing glycosphingolipid, from rainbow trout sperm. The first example of the natural occurrence of KDN-ganglioside, (KDN)GM3. *J Biol Chem* 1991; 266(32): 21929–35.
- [10] Song Y, Kitajima K, Inoue S, Khoo KH, Morris HR, Dell A, et al. Expression of new KDN-gangliosides in rainbow trout testis during spermatogenesis and their structural identification. *Glycobiology* 1995;5(2):207–18.
- [11] Kimura M, Hama Y, Sumi T, Asakawa M, Rao BN, Horne AP, et al. Characterization of a deaminated neuraminic acid-containing glycoprotein from the skin mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *J Biol Chem* 1994; 269(51):32138–43.
- [12] Shashkov AS, Kosmachevskaya LN, Streshinskaya GM, Evtushenko LI, Bueva OV, Denisenko VA, et al. A polymer with a backbone of 3-deoxy-*D*-glycero-*D*-galacto-non-2-ulopyranosonic acid, a teichuronic acid, and a β -glucosylated ribitol teichoic acid in the cell wall of plant pathogenic *Streptomyces* sp. VKM Ac-2124. *Eur J Biochem* 2002;269(24):6020–5.
- [13] Shashkov AS, Tul'skaya EM, Evtushenko LI, Denisenko VA, Ivanyuk VG, Stomakhin AA, et al. Cell wall anionic polymers of *Streptomyces* sp. MB-8, the causative agent of potato scab. *Carbohydr Res* 2002;337(21–23):2255–61.
- [14] Kawanishi K, Saha S, Diaz S, Vaill M, Sasmal A, Siddiqui SS, et al. Evolutionary conservation of human ketodeoxynonulosonic acid production is independent of sialoglycan biosynthesis. *J Clin Invest* 2021;131(5):e137681.
- [15] Hao J, Vann WF, Hinderlich S, Sundaramoorthy M. Elimination of 2-keto-3-deoxy-*D*-glycero-*D*-galacto-nonulosonic acid 9-phosphate synthase activity from human *N*-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase by a single mutation. *Biochem J* 2006;397(1):195–201.
- [16] Lawrence SM, Huddleston KA, Pitts LR, Nguyen N, Lee YC, Vann WF, et al. Cloning and expression of the human *N*-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-*D*-glycero-*D*-galacto-nononic acid biosynthetic ability. *J Biol Chem* 2000;275(23):17869–77.
- [17] Inoue S, Lin SL, Chang T, Wu SH, Yao CW, Chu TY, et al. Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-*D*-glycero-*D*-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 1998;273(42):27199–204.
- [18] Inoue S, Poongodi GL, Suresh N, Chang T, Inoue Y. Identification and partial characterization of soluble and membrane-bound KDN(deaminoneuraminic acid)-glycoproteins in human ovarian teratocarcinoma PA-1, and enhanced expression of free and bound KDN in cells cultured in mannose-rich media. *Glycoconj J* 2006;23(5–6):401–10.
- [19] Wang F, Xie B, Wang B, Troy 2nd FA. LC-MS/MS glycomic analyses of free and conjugated forms of the sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in human throat cancers. *Glycobiology* 2015;25(12):1362–74.
- [20] Inoue S, Kitajima K, Inoue Y. Identification of 2-keto-3-deoxy-*D*-glycero-*D*-galactono-ulosonic acid (KDN, deaminoneuraminic acid) residues in mammalian tissues and human lung carcinoma cells: chemical evidence of the occurrence of KDN glycoconjugates in mammals. *J Biol Chem* 1996;271(40):24341–4.
- [21] Yabu M, Korekane H, Hatano K, Kaneda Y, Nonomura N, Sato C, et al. Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type *N*-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology* 2013;23(6):634–42.
- [22] Wolf AM, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, D'Amico AV, Volk RJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60(2):70–98.
- [23] Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *Eur Urol* 2017;71(4):618–29.
- [24] Llop E, Ferrer-Batallé M, Barrabés S, Guerrero PE, Ramirez M, Saldova R, et al. Improvement of prostate cancer diagnosis by detecting PSA glycosylation-specific changes. *Theranostics* 2016;6(8):1190–204.
- [25] Yoneyama T, Ohyama C, Hatakeyama S, Narita S, Habuchi T, Koie T, et al. Measurement of aberrant glycosylation of prostate specific antigen can improve specificity in early detection of prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;448(4):390–6.
- [26] Inoue T, Kaneko T, Muramatsu S, Kimura H, Yoshino T, Goto T, et al. LaediNAc-glycosylated prostate-specific antigen density is a potential biomarker of prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2020;18(1):e28–36.
- [27] Kammeijer GSM, Nouta J, de la Rosette JJMCH, de Reijke TM, Wuhrer M. An in-depth glycosylation assay for urinary prostate-specific antigen. *Anal Chem* 2018;90(7):4414–21.
- [28] Wang W, Kalu_za A, Nouta J, Nicolardi S, Ferens-Sieczkowska M, Wuhrer M, et al. High-throughput glycopeptide profiling of prostate-specific antigen from seminal plasma by MALDI-MS. *Talanta* 2021;222:121495.
- [29] Ruhaak LR, Steenvoorden E, Koeleman CA, Deelder AM, Wuhrer M. 2-Picoline-borane: a non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *Proteomics* 2010;10(12):2330–6.
- [30] Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem* 2010;397(8):3457–81.
- [31] Zhang T, Madunić K, Holst S, Zhang J, Jin C, Ten Dijke P, et al. Development of a 96-well plate sample preparation method for integrated N- and O-glycomics using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Omics* 2020;16(4):355–63.
- [32] Kammeijer GSM, Kohler I, Jansen BC, Hensbergen PJ, Mayboroda OA, Falck D, et al. Dopant enriched nitrogen gas combined with sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for improved sensitivity and repeatability in glycopeptide analysis. *Anal Chem* 2016;88(11): 5849–56.
- [33] Lageveen-Kammeijer GSM, de Haan N, Mohaupt P, Wagt S, Filius M, Nouta J, et al. Highly sensitive CE-ESI-MS analysis of *N*-glycans from complex biological samples. *Nat Commun* 2019;10(1):2137.
- [34] Wojcik I, Sénard T, de Graaf EL, Janssen GMC, de Ru AH, Mohammed Y,

- et al. Site-specific glycosylation mapping of Fc gamma receptor IIIb from neutrophils of individual healthy donors. *Anal Chem* 2020;92(19):13172–81.
- [35] Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res* 2008;7(4):16509.
- [36] Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod—a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* 2001;1(2):340–9.
- [37] Kammeijer GSM, Jansen BC, Kohler I, Heemskerk AAM, Mayboroda OA, Hensbergen PJ, et al. Sialic acid linkage differentiation of glycopeptides using capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. *Sci Rep* 2017;7(1):3733.
- [38] Anumula KR. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem* 2006;350(1):1–23.
- [39] Anumula KR, Dhume ST. High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterization by normal phase high performance liquid chromatography following derivatization with highly fluorescent anthranilic acid. *Glycobiology* 1998;8(7):685–94.
- [40] Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019;15(6):346–66.
- [41] Inazu T. New materials and techniques for glycomedicine. *Int Congr Ser* 2001; 1223:91–5.
- [42] Wang W. Glycomedicine: the current state of the art. *Engineering*. In press.
- [43] Özdemir V, Arga KY, Aziz RK, Bayram M, Conley SN, Dandara C, et al. Digging deeper into precision/personalized medicine: cracking the sugar code, the third alphabet of life, and sociomateriality of the cell. *OMICS J Integr Biol* 2020;24(2):62–80.
- [44] Thomas D, Rathinavel AK, Radhakrishnan P. Altered glycosylation in cancer: a promising target for biomarkers and therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021;1875(1):188464.
- [45] Brasil S, Pascoal C, Francisco R, Marques-da-Silva D, Andreotti G, Videira PA, et al. CDG therapies: from bench to bedside. *Int J Mol Sci* 2018;19(5):1304.
- [46] Apostolopoulos V, McKenzie IF. Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev Immunol* 2017;37(2–6):445–61.
- [47] Doran RC, Tatsuno GP, O’Rourke SM, Yu B, Alexander DL, Mesa KA, et al. Glycan modifications to the gp120 immunogens used in the RV144 vaccine trial improve binding to broadly neutralizing antibodies. *PLoS One* 2018;13(4): e0196370.
- [48] Breul J, Pickl U, Hartung R. Prostate-specific antigen in urine. *Eur Urol* 1994; 26(1):18–21.
- [49] Kuriyama M, Wang MC, Papsidero LD, Killian CS, Shimano T, Valenzuela L, et al. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Res* 1980;40(12):4658–62.
- [50] Hsiao CJ, Tzai TS, Chen CH, Yang WH, Chen CH. Analysis of urinary prostate-specific antigen glycoforms in samples of prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Dis Markers* 2016;2016:8915809.
- [51] Janković MM, Kosanović MM. Glycosylation of urinary prostate-specific antigen in benign hyperplasia and cancer: assessment by lectin-binding patterns. *Clin Biochem* 2005;38(1):58–65.
- [52] Xu M, Yang A, Xia J, Jiang J, Liu CF, Ye Z, et al. Protein glycosylation in urine as a biomarker of diseases. *Transl Res* 2023;253:95–107.
- [53] Swiner DJ, Jackson S, Burris BJ, Badu-Tawiah AK. Applications of mass spectrometry for clinical diagnostics: the influence of turnaround time. *Anal Chem* 2020;92(1):183–202.
- [54] Ombrone D, Giocaliere E, Forni G, Malvagia S, la Marca G. Expanded newborn screening by mass spectrometry: new tests, future perspectives. *Mass Spectrom Rev* 2016;35(1):71–84.
- [55] Jannetto P. Therapeutic drug monitoring using mass spectrometry. In: Nair H, Clarke W, editors. *Mass spectrometry for the clinical laboratory*. London: Academic Press; 2017. p. 165–79.
- [56] Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the “gold standard” method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev* 2015;34(1):2–23.
- [57] Banerjee S. Empowering clinical diagnostics with mass spectrometry. *ACS Omega* 2020;5(5):2041–8.
- [58] Zhang J, Rector J, Lin JQ, Young JH, Sans M, Katta N, et al. Nondestructive tissue analysis for *ex vivo* and *in vivo* cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Sci Transl Med* 2017;9(406):eaan3968.
- [59] Go S, Sato C, Yin J, Kannagi R, Kitajima K. Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357(2):537–42.
- [60] Nakata D, Münster AK, Gerardy-Schahn R, Aoki N, Matsuda T, Kitajima K. Molecular cloning of a unique CMP-sialic acid synthetase that effectively utilizes both deaminoneuraminic acid (KDN) and *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) as substrates. *Glycobiology* 2001;11(8):685–92.