

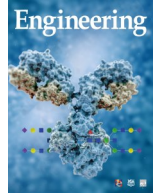


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

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



Research
Glycomedicine—Article

月经周期中免疫球蛋白 G N-糖基化的周期性变化

Julija Jurić^{a, #}, Hongli Peng^{b, c, #}, Manshu Song^{c, d, #}, Frano Vučković^a, Jelena Šimunović^a,
Irena Trbojević-Akmačić^a, Youxin Wang^{c, d}, Jiaonan Liu^{b, c}, Qing Gao^c, Hao Wang^{c, d}, Qiaoyun Chu^e,
Marija Pezer^{a, †}, Wei Wang^{c, d, †, *}, Gordan Lauc^{a, f, †, *}

^a Genos Glycoscience Research Laboratory, Zagreb 10000, Croatia

^b Beijing Fengtai Traditional Chinese Medicine Hospital, Beijing 100076, China

^c Beijing Municipal Key Laboratory of Clinical Epidemiology, School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China

^d Centre for Precision Health, Edith Cowan University, Perth, WA 6027, Australia

^e School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

^f Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry at University of Zagreb, Zagreb 10000, Croatia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2022

Revised 29 September 2022

Accepted 12 October 2022

Available online 15 June 2023

关键词

N-糖基化
免疫球蛋白 G
月经周期
女性性激素
雌激素
孕酮
睾酮
妇女

摘要

免疫球蛋白 G(IgG)是最丰富的血浆糖蛋白,也是重要的体液免疫介质。聚糖组成影响 IgG 对配体的亲和力和随之而来的免疫反应。IgG N-糖基化的修饰被认为是性激素调节免疫系统的各种机制之一。虽然月经周期是大多数育龄妇女中与性激素相关的中枢生理过程,但月经周期中的 IgG N-糖基化动力学尚未得到研究。为了填补这一空白,本研究使用亲水相互作用超高效液相色谱(HILIC-UPLC)分析了 70 名绝经前健康妇女在月经周期的 12 个时间点(每 7 天一次,持续 3 个月)的血浆 IgG N-聚糖。研究观察到 IgG N-糖基化的周期性变化与月经周期阶段和血浆中的性激素浓度有关。在综合队列水平上,每种性状的模拟平均月经周期对 IgG N-糖基化性状丰度的影响较低,无半乳糖基化 N-聚糖的峰值为 1.1%。然而,在某些情况下,个体自身变化相对较高;例如,月经周期中唾液酸化 N-聚糖的最小值和最大值之间的最大差异高达 21%。在所有测量中,月经周期阶段可以解释单半乳糖基化的单个 IgG 糖基化性状丰度高达 0.72% 的变化。相比之下,高达 99% 的双半乳糖基化丰度变化可归因于 IgG N-糖基化的个体差异。总之,月经周期中发生的 IgG N-聚糖模式变化的平均程度很小;因此,无论月经周期阶段如何,都可以在大样本量研究中对女性进行 IgG N-聚糖谱分析。

© 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

月经周期是一系列自然过程,这些过程打乱了女性生育年龄期间的的生活。月经周期通常被分为卵泡期和黄体期两个周期阶段,由交替的雌激素(E)和孕酮(P)优势

期与短暂的排卵期和月经期定义[1]。性激素的浓度在月经周期中起伏不定,导致女性身体产生不同的生理和免疫反应,这些反应高度依赖于周期阶段[2]。

在进化过程中,人类发展出一种先天性和适应性(体液)免疫力,由刺激免疫反应或提供各种效应功能的免疫

* Corresponding authors.

E-mail addresses: wei.wang@ecu.edu.au (W. Wang), glauc@pharma.hr (G. Lauc).

These authors contributed equally to this work as first authors.

† These authors contributed equally to this work as last authors.

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): 108–118

引用本文: Julija Jurić, Hongli Peng, Manshu Song, Frano Vučković, Jelena Šimunović, Irena Trbojević-Akmačić, Youxin Wang, Jiaonan Liu, Qing Gao, Hao Wang, Qiaoyun Chu, Marija Pezer, Wei Wang, Gordan Lauc. Periodic Changes in the N-Glycosylation of Immunoglobulin G During the Menstrual Cycle. *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.10.020>

细胞和分子组成[3]。在免疫球蛋白（IgG、IgM、IgA、IgD和IgE）中，IgG是最丰富的人血浆糖蛋白，是体液免疫的重要效应分子。IgG通过Asn297的复杂共翻译和翻译后糖基化过程与被称为聚糖的寡糖链共价修饰，Asn297是IgG重链每个Fc部分的保守N-糖基化位点[4]。聚糖是必需的结构和功能成分，是IgG抗体效应功能的关键调节因子[5–6]。免疫应答的启动需要抗原识别以及IgG与各种配体结合，例如，免疫效应细胞上存在的Fc γ 受体（Fc γ R）[7]、补体因子[8]和凝集素[9]。

已知IgG糖组成分可调节IgG对不同配体的亲和力，从而调节其下游效应功能。不含末端半乳糖的IgG聚糖与炎症和自身免疫性疾病病理学相关，并通过替代补体途径[10]或凝集素补体途径[9]来充当炎症引发剂。另外，半乳糖基化聚糖与炎症抗体潜力降低有关[11]。然而，当半乳糖基化聚糖缺乏核心岩藻糖时，它们会促进IgG与C1q补体成分的结合并激活炎症反应，从而导致补体依赖的细胞毒性（CDC）[12]。通常情况下，超过90%的血浆IgG糖型在聚糖核心部分具有岩藻糖；这是IgG炎症性质的“安全开关”[13]，因为核心岩藻糖基化聚糖在激活抗体依赖的细胞毒性（ADCC）[14]方面的效率比同一IgG分子的非岩藻糖基化糖型低100倍[15]。此外，末端唾液酸化聚糖的独特之处在于它们通过减少IgG与激活Fc γ R的结合[16]以及促进与II型（凝集素）Fc γ R（如DC-SIGN）的结合来启动抗炎效应功能，同时还刺激抑制性Fc γ RIIB的表达[17]。

IgG上N-聚糖的组成随年龄的变化而变化，这种变化首先在半乳糖基化聚糖被发现[18]。进一步的研究显示，IgG的半乳糖基化和唾液酸化与年龄相关的变化存在性别差异，表明女性的二半乳糖基化和唾液酸化N-聚糖水平高于男性，但绝经期后，这种观察结果出现逆转[19–21]。此外，一项纳入甲状腺癌患者的研究报道称，健康女性对照组（尤其是青春期和绝经期）的IgG半乳糖基化存在严重偏斜，并将这一观察结果与性激素水平的显著变化联系起来[22]。

有报道称，性激素可能是女性各种自身免疫性疾病和炎症性疾病的重要调节因子[23]。许多关于疾病机制的研究认为IgG N-糖基化的改变起着重要作用[24]。性激素与IgG N-糖基化之间的关系通过比较女性妊娠前、妊娠期间和妊娠后的疾病活动度[25–27]、检查与内源性绝经后性激素水平相关的增加的疾病风险[20]，或比较同龄男性和女性的疾病发病率得以证明[28–31]。血浆雌激素水平极低与绝经期类风湿性关节炎发生风险增加有关[32–33]。此外，内分泌干预研究表明，性激素与IgG糖基化改变之

间存在直接因果关系[32,34]。本文研究小组最近发现，健康月经期女性性腺激素的慢性抑制增加了聚糖年龄指数[20]。该指数是一种新开发的生物年龄聚糖生物标志物，与生活方式和疾病风险生物标志物非常吻合，并且随着不含半乳糖和唾液酸的IgG聚糖丰度的增加而增加[35]。相反，高雌激素可促进IgG半乳糖基化和唾液酸化，使妊娠类风湿疾病女性的病情得到缓解[27]。至于月经周期，绝经前女性通常在经前期或性激素低的月经期间出现慢性疾病症状恶化[2]。

上述研究表明，月经周期性激素的波动可能会影响IgG N-糖基化，从而影响女性的免疫力。由于IgG糖基化的变化是衰老、健康和性激素状态的相关因素，因此聚糖已成为越来越多流行病学研究中不可避免的研究主题[24]。聚糖已被证明是疾病风险及发展的促成因素和预测因子[36]，并有可能成为被广泛使用的诊断生物标志物[37–38]。因此，必须彻底研究可能影响IgG的N-糖基化的所有因素。

目前还没有关于月经周期中可能的IgG N-糖基化变化的数据，也不知道在流行病学研究中是否应将月经周期阶段视为混杂因素。因此，本研究检查了一组健康绝经前妇女在月经周期中IgG糖组组成的纵向变化，还检查了丰富的IgG聚糖性状是否与月经周期阶段和血浆中性激素的浓度有关。

2. 材料和方法

2.1. 参与者

本研究通过名为“IgG糖基化与女性月经周期之间的关联”的项目招募了女性志愿者，该项目由首都医科大学（Capital Medical University in Beijing）资助。排除标准包括：确认绝经状态；研究前的疾病或症状；使用口服避孕药、其他激素物质或药物；吸烟；饮酒；怀孕。已知所有这些因素都会影响IgG N-糖基化[39]。共有70名年龄在19–48岁之间、绝经前月经周期规律的妇女符合调查[问卷1（见附录A）]标准，并有资格参加该研究（见附录A中的表S1和图S1）。

2.2. 研究设计

本研究是一项观察性研究，从2016年9月至11月连续12周对参与者进行目的性采样。无论月经周期阶段如何（每人12份样本），每周（每7天）采集一次血液样本，持续三个月。附录A中的图S2显示了研究设计图，概述了采样方案和随后的实验程序。简而言之，将血浆从

每个血液样品中分离并储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至进行性激素和IgG N-聚糖分析(详细信息见附录A)。在每周的访问中,参与者接受了表型测量和后续调查[问卷2(见附录A)],其中要求参与者告知自上次抽血以来的月经周期细节。该信息用于确定12周研究期间每个参与者的月经周期长度(见附录A中的表S2)。

2.3. 性激素

分析血浆样品以确定三种性激素 17β -雌二醇(E2)、孕酮(P)和总睾酮(T)的浓度,使用市售的免疫测定试剂盒(ARC Estradiol RGT、ARC Progesterone RGT和ARC 2nd Gen TestoRGT; Abbott, Abbott Laboratories, 美国)。使用Architect i1000SR化学发光免疫分析仪(Abbott, Abbott Laboratories, 美国)以单个读数的方式测量性激素血浆浓度,并使用Architect System软件进行自动数据分析。

2.4. IgG分离、N-聚糖释放和标记

整个过程按照Pucic等[40]建立的方案进行。简而言之,在96孔蛋白G培养板(BIA Separations, 斯洛文尼亚)上通过亲和色谱法从血浆样品中分离IgG。在每次IgG分离程序(平均IgG浓度为 $0.7\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;范围:最小IgG浓度为 $0.36\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大IgG浓度为 $1.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)后,在NanoDrop 8000分光光度计(Thermo Fisher)上测量每个样品中的IgG含量。通过加入十二烷基硫酸钠(SDS;美国维特罗根)对分离的IgG进行变性并在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育。Igepal-CA630(Sigma-Aldrich, 美国)用于中和多余的SDS。在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中加入PNGase F(Promega, 美国),释放IgG N-聚糖,然后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。将释放的N-聚糖用2-氨基苯甲酰胺(2AB)染料进行荧光标记(Merck, 德国)。使用亲水相互作用液相色谱固相萃取(HILIC-SPE)技术从样品中除去游离标记和还原剂。将IgG N-聚糖用超纯水洗脱并储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至使用。

2.5. IgG N-聚糖分析

在由样品管理器、四元溶剂管理器和荧光检测器(FLR)组成的Waters Acquity超高效液相色谱(UPLC)系统(Waters, 美国)上,通过亲水相互作用液相色谱(HILIC)分离标记的N-聚糖。通过酰胺Acquity UPLC Glycan BEH色谱柱(Waters, 美国),用 $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$ (内径)和 $1.7\text{ }\mu\text{m}$ 杂合的乙烯桥颗粒分离N-聚糖,将pH值为4.4的 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵作为溶剂A,100%乙腈(ACN)作为溶剂B。样品在进样前保持在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,

分离操作在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行。在27 min分析运行中,分离方法使用75%~62%乙腈的线性梯度,流速为 $0.40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。通过FLR检测器检测N-聚糖,激发和发射波长分别设置为250 nm和428 nm。该系统由Empower 3软件[build 3471(Waters, 美国)]控制。

数据处理包括色谱图的内置积分,然后手动校正色谱图以保持所有样品相同的积分区间。选定的色谱图用于模板化所有样品的色谱聚糖数据的自动积分[41]。将色谱图平均分成含有不同聚糖结构的24个聚糖峰(GP1~GP24)(图1)[19,42]。色谱峰中的N-聚糖组成先前由Pucic等[40]确定。每个峰中游离寡糖的丰度以占总积分面积的百分比表示(%面积)。

2.6. 统计分析

为了避免在不同时间和不同培养板上分析多个样品时产生的批量效应,将采自一名女性的所有样品随机分布在单个96孔板上,并在同一次运行中进行分析。按照这个逻辑,分配了3~5个年龄匹配个体的血浆样品和每个培养板的内部血浆样品(标准品)。作为标准品,使用由克罗地亚萨格勒布市的Department of Transfusiology在一个时间点收集的匿名健康女性供体(32岁)的血浆。该标准品一式五份分布在所有平板上,以控制非生物学变异,即方法的技术变异。UPLC聚糖数据按总色谱面积归一化,使样品之间的测量具有可比性。将每个聚糖峰定量为总IgG N-糖组的百分比。

每个聚糖峰的生物学变异按以下方式计算:24个聚糖峰(可变)中每一个的标准品变异中位数(技术变异)与队列中每位女性所有样品变异的中位数之比再乘以100%(见附录A中的表S3)。除了24个直接测量的聚糖峰外,对于IgG聚糖,计算了另外6个衍生性状,作为具有相似结构特征的选定聚糖峰的总和(表1)。衍生性状代表无半乳糖基化聚糖(G0)、单半乳糖基化聚糖(G1)、二半乳糖基化聚糖(G2)、唾液酸化聚糖(S)、核心岩藻糖基化聚糖(F)和具有平分型GlcNAc(B)的N-聚糖的相对丰度。

为了评估月经周期中聚糖和性激素的动态,通过将研究中每个月经周期的长度标准化为100%来建立一个月经周期模型。该模型是根据来自60名女性的140个月经周期中的500个分析血浆样品的聚糖和性激素数据构建的(有关详细信息请参阅第3.2节)。月经周期和IgG聚糖性状之间的关联分析使用线性混合模型进行,年龄(固定效应)和受试者(随机效应)作为额外的协变量被包括在内。假设的纵向聚糖测量周期模式被建模为月经周期阶段的正弦

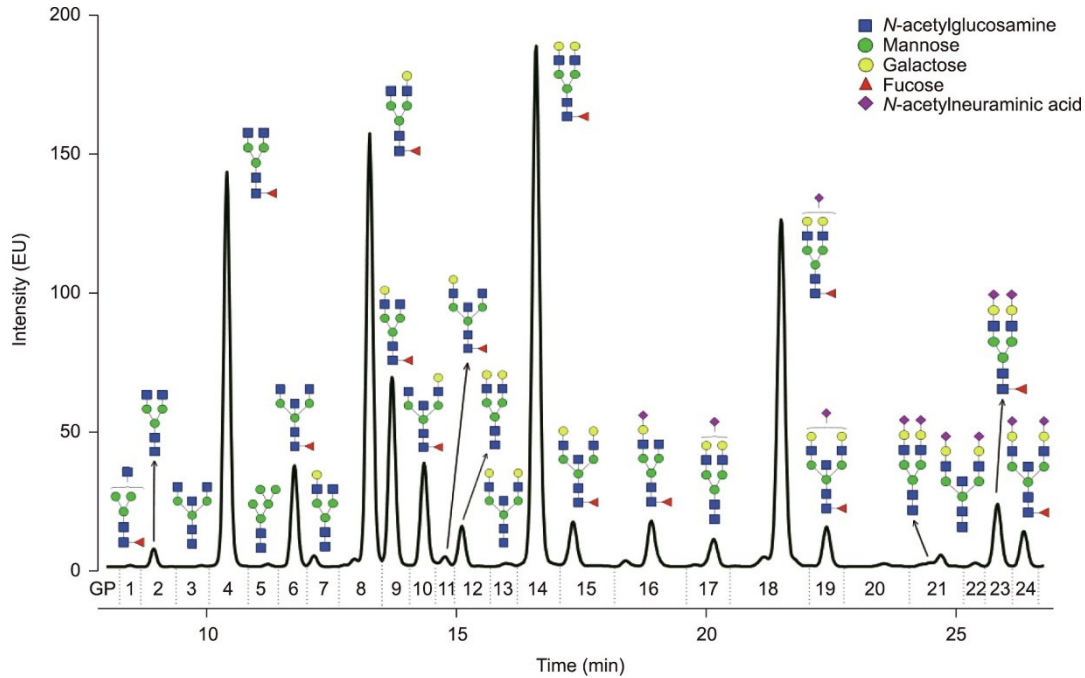


图1. 人IgG N-糖组。从血浆衍生的IgG释放的N-连接聚糖（由HILIC-UPLC-FLR分析的2-AB标记）的代表性色谱图，由24个色谱峰（GP1~GP24）组成。每个聚糖峰仅呈现最丰富的糖型，以简化色谱数据。人IgG N-糖组聚糖结构的完整列表见参考文献[19]。单糖残基以几何符号表示，并根据 Consortium for Functional Glycomics 的建议进行颜色编码。使用 GlycoWorkbench 软件描绘聚糖结构[42]。EU：排放单位；GP：聚糖峰。

表1 利用24个直接测量的聚糖峰定义的衍生IgG聚糖性状(图1)

| Derived glycan trait | Chromatographic peaks corresponding to glycans with similar structural features |
|----------------------|--|
| G0 | GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP6 |
| G1 | GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 |
| G2 | GP12 + GP13 + GP14 + GP15 |
| S | GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 |
| B | GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24 |
| F | GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24 |

G0: glycans with no galactose (agalactosylated); G1: glycans with one galactose (monogalactosylated); G2: glycans with two galactoses (digalactosylated); S: glycans with sialic acid (sialylated); B: glycans with bisecting *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) (bisected); F: glycans with fucose on the most inner GlcNAc (core-fucosylated).

和余弦函数的线性组合。使用线性混合模型进行每种性激素浓度与IgG聚糖性状之间的关联分析，包括年龄（固定效应）和受试者（随机效应）作为附加协变量。

在整个研究期间，通过将每个聚糖性状除以个体内的平均值来标准化所有聚糖测量结果，从而使不同聚糖性状之间和个体之间的月经周期的估计效果具有可比性。Benjamini-Hochberg 方法用于调整所进行的假设检验数量的 *P* 值。*P* 值低于 0.05 被认为具有统计学意义。使用 R 编程软件（版本 3.01）分析和可视化数据。

2.7. 机构审查委员会声明

该研究是根据《赫尔辛基宣言》进行的，得到了首都医科大学（CMU）伦理委员会（协议代码 2016SY106；2017年7月11日批准）和克罗地亚萨格勒布大学医学院

（School of Medicine at University of Zagreb, Croatia）伦理委员会（协议代码 380-59-10106-18-111/151；2018年7月12日批准）的批准。与会者根据《赫尔辛基宣言》提供了书面知情同意书。

2.8. 知情同意声明

从参与研究的所有受试者那里获得了知情同意声明。

3. 结果

3.1. 研究概述

对 70 名月经周期规律、自然绝经前健康的妇女进行了血浆来源的 IgG 纵向 N-聚糖谱分析，目的是研究月经周期阶段与 IgG N-聚糖组成之间的可能关联。无论月经周期

阶段如何，连续12周跟踪了IgG糖组分的变化，每周进行一次样本采集。7名受试者没有参与完整的抽样研究方案，一名受试者从第三周开始参与抽样方案；因此，对于这些个体来说，获得的血浆样本数少于最初计划的每人12个血浆样本。采样方案产生了806个血浆样品，可用于实验程序（见附录A中的图S2）。

3.2. 月经周期选择标准

为了定义研究中月经周期的长度，使用了自我上报的月经周期信息，这些信息是通过每个参与者在进入研究之前和研究期间每次抽血后完成的调查问卷获得的。问卷结果显示一些月经周期超出了正常的月经周期范围[43]，这被认为是一个排除标准。最后，建立了(30 ± 4)天的研究特异性可接受平均月经周期长度，从而产生了来自60名女性的140个月经周期中的500个UPLC IgG聚糖数据集，以作进一步的统计分析（见附录A中的表S2）。

3.3. IgG N-糖基化变异性的评估

在评估月经周期中IgG N-糖基化变化的程度之前，首先必须确定单个IgG聚糖的生物学变异性。将队列中所有分析样品中的每个聚糖峰的变化与整个研究期间标准样品的分析变化进行了比较。结果发现，根据Baković等[19]确定的结果，24个聚糖峰中有14个的生物学变异超过了分析变异（见附录A中的表S3），这些峰约占总色谱面积的85%。

确定了队列中IgG N-糖基化个体之间的变异性，该队列以所有分析样品中衍生聚糖性状的四分位距（第25~

75个百分位数）表示，如附录A中的表S4所述。研究发现半乳糖基化相关性状水平的变化最显著，尤其是无半乳糖基化（G0）（ $s = 4.3$ ，其中 s 代表标准偏差），而岩藻糖基化（F）在队列中的所有样品中具有最低的变异范围（ $s = 0.9$ ）[图2（a）]。

接下来，评估了每个参与者衍生的IgG聚糖性状的变化。图2（b）显示，唾液酸化（S）（最小值和最大值之间的最大差异高达21%）和无半乳糖基化（G0）（最小值和最大值之间的最大差异高达16%）IgG N-聚糖的个体差异程度最明显。相比之下，核心岩藻糖基化（F）IgG N-聚糖在单个女性体内表现出最小的变异（最小值和最大值之间的最大差异小于3%）。

3.4. IgG N-糖基化在月经周期中显示出周期性的周期模式

研究测试了月经周期阶段与衍生聚糖性状之间的关联，以表征月经周期中检测到的IgG N-糖基化变化。结果揭示了6个IgG N-糖基化性状中有5个的丰度动态具有循环周期性：无半乳糖基化（G0）、单半乳糖基化（G1）、二半乳糖基化（G2）、唾液酸化（S）和平分型GlcNAc（B）（图3、表2）。循环阶段引起的丰度平均变化相对较小，仅高达1.1%。表2显示，与IgG的半乳糖基化和唾液酸化相关的衍生聚糖性状变化最大：G0为1.1%、G2和S为1.0%。含有一种半乳糖的N-聚糖变化适中（G1为0.8%），含有平分型GlcNAcB的N-聚糖为0.5%。岩藻糖基化（F）水平保持稳定，在月经周期中没有显示出统计学上的显著周期性（表2）。

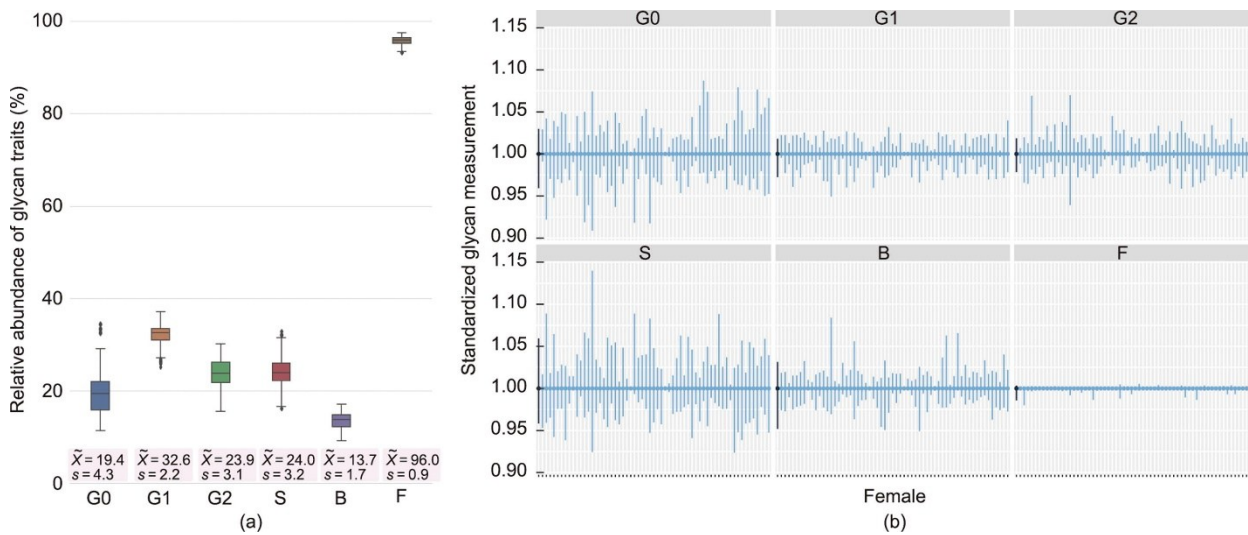


图2. IgG N-糖基化的变异性。(a) 队列中N-糖基化的个体间变异性；队列中分析的所有样品中6种衍生IgG聚糖性状相对丰度的箱形图。每个框表示四分位距（第25~75个百分位数）。框内的线条表示中位数（ \bar{X} ），而细线表示第5个和第95个百分位数。点表示异常值。对于每个衍生性状，还计算了平均值（ \bar{x} ）和标准差（ s ）（见附录A中的表S4）。(b) 一个人N-糖基化的个体间变异性。每条蓝色垂直线代表在12周研究期间每位女性（ $n = 60$ ）的6个衍生IgG聚糖性状的最小值和最大值所定义的变异范围。黑色垂直线表示标准品聚糖性状的变化范围，该标准品是具有已知N-糖基化图谱的内部样品，用于跟踪技术变异。聚糖测量根据个体内的平均值进行标准化以便比较不同的聚糖性状。

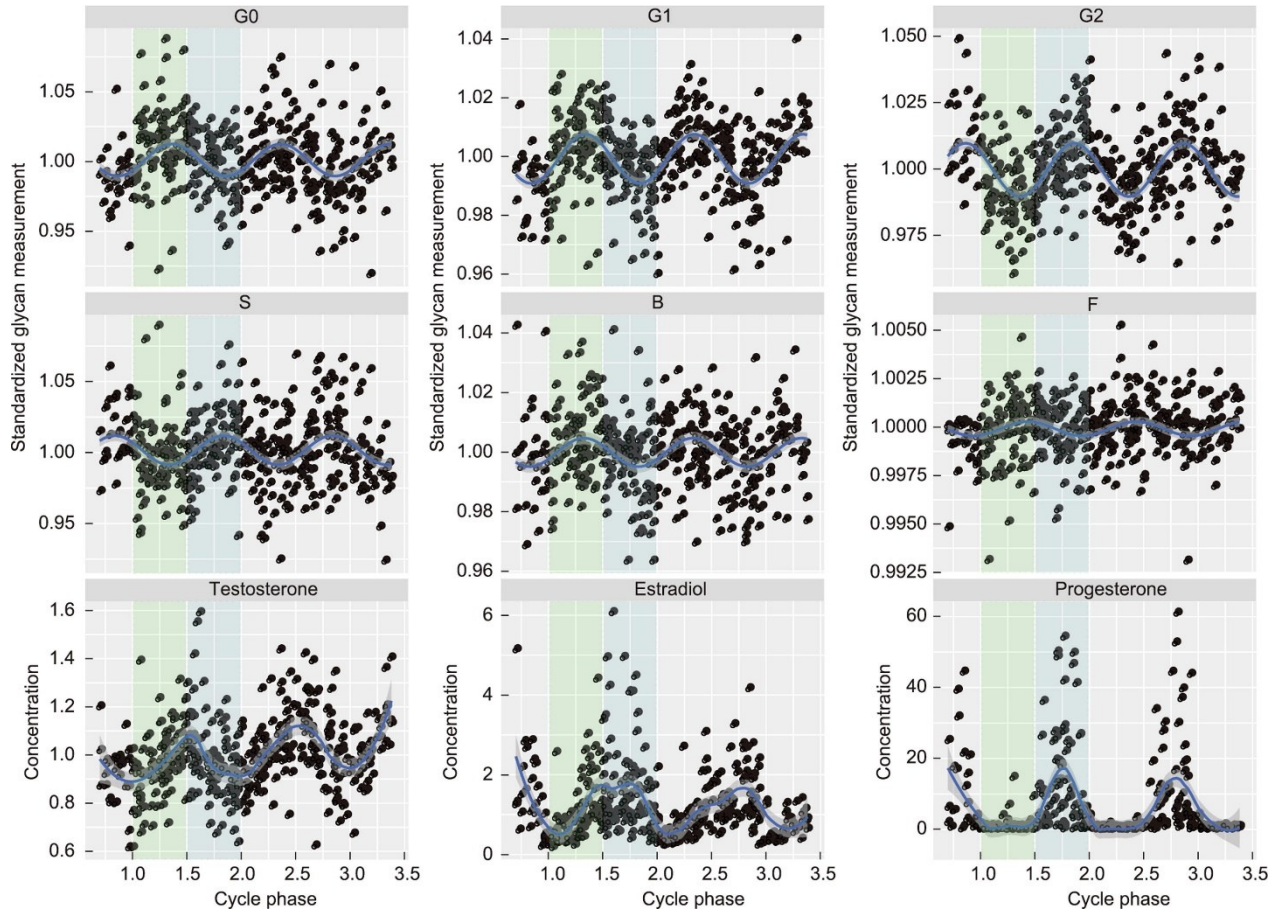


图3. IgG N-糖基化和性激素在几个连续月经周期中的动力学。蓝色曲线表示建模函数，深灰色区域表示无半乳糖 (G0)、单半乳糖 (G1)、二半乳糖 (G2)、唾液酸 (S)、平分型 GlcNAc(B)和核心岩藻糖 (F) 的N-聚糖变异的95%置信区间，以及通过几个月经周期的卵泡期和黄体期三种性激素睾酮 (nmol·L⁻¹)、雌二醇 (pmol·L⁻¹) 和孕酮 (nmol·L⁻¹) 的血浆浓度 (如表3所示)。x轴上的整数表示每个后续月经周期的开始。聚糖测量根据个体内的平均值进行标准化 (见第2.6节)，以便比较不同的聚糖性状。绿色矩形：卵泡期 (仅针对观察到的第一个月经周期显示)；蓝色矩形：黄体期 (仅针对观察到的第一个月经周期显示)；每个点代表一个样本；*n* (样本) = 500。

表2 月经周期阶段与衍生IgG聚糖性状的关联，以及月经周期引起的衍生聚糖性状变异和IgG N-糖基化的个体差异分析

| Derived glycan trait | Glycan trait peak ^a (% MC) | Ratio peak/all measurements | MC phase effect ^b | | Person Var ^c (%) | MC Var ^d (%) | <i>p</i> value | Adj <i>p</i> value |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | | Percentage (%) | <i>s</i> | | | | |
| G0 | 35 | 1.011 | 1.1 | 0.05 | 98 | 0.12 | 4.15 × 10⁻⁹ | 8.30 × 10⁻⁹ |
| G1 | 35 | 1.008 | 0.8 | 0.12 | 92 | 0.72 | 1.12 × 10⁻²² | 3.36 × 10⁻²² |
| G2 | 85 | 1.010 | 1.0 | 0.08 | 99 | 0.30 | 4.15 × 10⁻²⁵ | 2.49 × 10⁻²⁴ |
| S | 84 | 1.010 | 1.0 | 0.07 | 90 | 0.26 | 2.79 × 10⁻⁶ | 4.19 × 10⁻⁶ |
| B | 31 | 1.005 | 0.5 | 0.04 | 86 | 0.06 | 0.01 | 0.01 |
| F | 47 | 1.000 | 0 | 0.05 | 93 | 0.10 | 0.09 | 0.09 |

p values describe the statistical significance of derived glycan trait abundance variability introduced by the menstrual cycle. False discovery rate was controlled using the Benjamini–Hochberg procedure (*p*-value adjusted). Statistically significant adjusted *p* (Adj *p*) values are in bold (*p* < 0.05). The duration of one MC corresponds to 100%. Follicular phase range: 0%–50% MC; luteal phase range: 50%–100% MC. MC: menstrual cycle.

^a The point of the menstrual cycle phase at which the highest abundance of glycans with a similar structural feature, i.e., derived glycan trait, was observed.

^b Ratios of an average peak trait measurement and an average of all trait measurements for each derived glycan trait are shown as effects of the menstrual cycle phase on the variability of derived glycan trait abundance, expressed in percentages (%) and standard deviations (*s*).

^c Percentage of derived glycan trait variability explained by interpersonal differences (Person Var) in IgG N-glycosylation (%).

^d Percentage of derived glycan trait variability explained by the menstrual cycle (MC Var; %).

本研究还能够区分月经周期中N-糖基化变化的两种不同模式。研究显示G0、G1和B在月经周期的卵泡期丰度最高，而G2和S在月经周期的黄体期达到最高丰度，

如图3所示。

接下来，研究了月经周期对IgG N-糖基化总体变化的贡献程度。以年龄为固定变量和以受试者为随机变量的线

性混合模型分析表明，月经周期可以解释低至0.06%的平分型GlcNAc(B) [调整 (Adj) $p = 0.01$] N-聚糖丰度的变化，可解释单半乳糖基化 (G1) (Adj $p = 3.36 \times 10^{-22}$) N-聚糖丰度最多0.72%的变异性。因此，结果表明，仅由月经周期引起的IgG N-糖基化变化占队列中所有样品的任一聚糖性状丰度变异性的不到0.8%。相比之下，在IgG上检测到的平分型N-聚糖 (B) 超过86%的丰度变异性，可归因于个体之间N-糖基化的差异。此外，由于同样的原因，两个人之间二半乳糖基化N-聚糖的丰度可能相差高达99% (表2)。

3.5. IgG N-糖基化的峰值变化和性激素的最高浓度在整个月经周期中发生时移

为了探索性激素 (尤其是雌激素) 与IgG N-糖基化变化的已知联系[32,34]，首先检查是否可以将本文研究的性激素的血浆峰值浓度与衍生聚糖性状的峰值丰度进行匹配。血浆中最高浓度的性激素与月经周期中最高水平的衍生IgG聚糖性状之间的关系在附录A的表S5中给出。

研究观察到，基于文献的卵泡期最高雌二醇浓度[44]与G2或S聚糖的最高丰度不重叠，尽管该浓度与月经周期黄体期的雌二醇和孕酮峰值一致，如图3所示。研究表

明，G2和S峰值大约出现在黄体期的第25天 (82% MC，其中MC代表月经周期)，12天后，在月经周期卵泡期大约第13天 (45% MC) 达到基于文献的最高雌二醇浓度。此外，大约在月经周期第16天睾酮浓度达到最高 (55% MC) 后第9天观察IgG二半乳糖基化和唾液酸化峰值，同时在月经周期黄体期孕酮和雌二醇浓度达到最高。另外，无半乳糖基化N-聚糖、单半乳糖基化N-聚糖和平分型GlcNAc N-聚糖的最高丰度与月经周期中的任何一点 (性激素浓度最高) 都没有重叠。相反，研究发现IgG的平分型、无半乳糖基化和单半乳糖基化水平在卵泡期早期月经周期的第9天 (31% MC) 和第10天 (35% MC) 达到峰值，显示低 (孕酮) 至中度 (雌二醇和睾酮) 水平 (图3)。

3.6. 性激素的血浆浓度与IgG N-糖基化模式有关

在发现月经周期中IgG N-糖基化模式与性激素波动不匹配后，检查了性激素与衍生的IgG聚糖性状之间的可能关联。本文研究的三种性激素的峰浓度与不同IgG聚糖性状的峰丰度的关联如表3所示。

研究发现孕酮和雌二醇在月经周期中与IgG N-糖基化表现出相似的关联。雌二醇与唾液酸化增加有关，而孕

表3 月经周期中性激素与衍生的IgG聚糖性状的关联

| Derived glycan trait | Hormone | Hormone peak ^a (% MC) | Glycan trait peak ^b (% MC) | Hormone effect on glycan trait abundance | <i>p</i> value | Adj <i>p</i> value |
|----------------------|--------------|----------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| G0 | Testosterone | 55 | 35 | Positive | 0.002 | 0.003 |
| | Estradiol | 45 | 35 | Positive | 0.211 | 0.253 |
| | Progesterone | 82 | 35 | Negative | 1.662 × 10⁻⁶ | 9.972 × 10⁻⁶ |
| G1 | Testosterone | 55 | 35 | Positive | 0.001 | 0.002 |
| | Estradiol | 45 | 35 | Negative | 0.001 | 0.002 |
| | Progesterone | 82 | 35 | Negative | 2.962 × 10⁻¹¹ | 2.665 × 10⁻¹⁰ |
| G2 | Testosterone | 55 | 85 | Negative | 1.421 × 10⁻⁴ | 5.116 × 10⁻⁴ |
| | Estradiol | 45 | 85 | Positive | 0.074 | 0.095 |
| | Progesterone | 82 | 85 | Positive | 1.505 × 10⁻¹⁵ | 2.708 × 10⁻¹⁴ |
| S | Testosterone | 55 | 84 | Negative | 0.016 | 0.024 |
| | Estradiol | 45 | 84 | Positive | 0.032 | 0.045 |
| | Progesterone | 82 | 84 | Positive | 4.404 × 10⁻⁴ | 0.001 |
| B | Testosterone | 55 | 31 | Positive | 0.529 | 0.560 |
| | Estradiol | 45 | 31 | Negative | 0.002 | 0.004 |
| | Progesterone | 82 | 31 | Negative | 2.595 × 10⁻⁵ | 1.168 × 10⁻⁴ |
| F | Testosterone | 55 | 47 | Positive | 0.013 | 0.021 |
| | Estradiol | 45 | 47 | Positive | 0.285 | 0.320 |
| | Progesterone | 82 | 47 | Negative | 0.784 | 0.784 |

p values describe the statistical significance of associations between peak concentrations of sex hormones in plasma and peak abundances of derived glycan traits. Associations are shown as the functional effect of sex hormones on derived glycan trait abundance. The false discovery rate was controlled using the Benjamini-Hochberg procedure (*p*-value adjusted). Statistically significant Adj *p* values are in bold ($p < 0.05$). The duration of one MC corresponds to 100%. Follicular phase range: 0%–50% MC; luteal phase range: 50%–100% MC.

^a The point of the menstrual cycle phase at which the highest serum concentration of analyzed sex hormone was observed.

^b The point of the menstrual cycle phase at which the highest abundance of glycans with a similar structural feature, i.e., derived glycan trait, was observed.

酮（除唾液酸化外）与IgG的二半乳糖基化增加有关。此外，雌二醇和孕酮都与具有平分型GlcNAc或一个半乳糖单位的IgG聚糖呈负相关，而无半乳糖基化IgG聚糖仅与血浆中的孕酮浓度呈负相关。与孕酮和雌二醇相比，已发现睾酮与IgG的糖基化具有完全相反的关系：睾酮与月经周期中无半乳糖基化、单半乳糖基化和核心岩藻糖基化IgG聚糖增加有关。

4. 讨论

本研究分析了70名健康的月经正常女性月经周期中IgG糖基化模式，连续12周（大约三个月经周期）每周采集血样。研究表明，IgG糖基化的组成在月经周期中经历了适度的周期性变化，这与女性性激素和月经周期阶段有关。然而，单个IgG聚糖性状的峰值改变与血浆中最高浓度的性激素不重叠，表现为月经周期阶段特异性事件。此外，研究发现在单个女性中和队列水平上唾液酸化和无半乳糖基化IgG聚糖性状变化最大。鉴于IgG的N-糖基化会影响抗体-配体相互作用，从而影响免疫反应，因此有关IgG糖基化的激素调节的研究对于了解女性健康至关重要。

先前发表的关于性激素对女性IgG N-糖基化影响的数据是从流行病学研究中推断出来的，这些研究涉及各种疾病[23]或怀孕[25]和更年期[32]等生理状态（随性激素浓度的变化而变化）的病理机制研究。目前的数据支持性激素与健康绝经前月经期妇女的IgG N-糖基化相关的假设。在月经周期中，在雌激素和孕酮调节下，免疫活动强烈的生殖不利期和免疫反应减弱的生殖有利期二者交替出现[45]。已知雌激素同时具有炎症和抗炎特性，这取决于其浓度（高浓度具有抗炎活性）以及体内雌激素和孕酮浓度之间的比例[46]，而孕酮主要发挥抗炎作用[47]。这些发现表明，月经周期中的性激素波动可能会影响女性的IgG N-糖基化，从而影响细胞[2]和体液免疫[48]。

此外，将IgG N-糖基化变化的动力学定义为大多数聚糖性状中相对丰度的周期性变化。研究发现，月经周期卵泡期的特征是无半乳糖基化聚糖、单半乳糖基化聚糖和具有平分型GlcNAc的聚糖丰度最高，已知这些聚糖与炎症性IgG活性有关[49]；而在排卵后，抗炎二半乳糖基化和唾液酸化N-聚糖的丰度增加[11,16]。在报道高雌激素和孕酮水平与由妊娠调节的女性免疫系统产生的抗炎导向型抗体共存的研究中也发现了类似的结果[50–51]。先前的研究表明，人类IgG N-糖基化在人群水平上的个体差异显示了聚糖丰度的显著变化[40,52]，其中半乳糖基化性状变化

最大[53–54]，本研究证实了这一点。另外，岩藻糖基化N-聚糖的相对丰度不会随着月经周期变化而出现周期性变化。这并不奇怪，因为IgG岩藻糖基化在成年期保持稳定[19]，只有在出现自身免疫性疾病和癌症时才会发生显著变化[55–56]。本研究的队列由健康女性组成，她们在研究抽样期间没有受到病原体入侵或健康状况良好。此外，到目前为止，文献中尚未报道总IgG岩藻糖基化的变化与性激素之间的关联。因此，观察月经周期中岩藻糖基化水平的微小变化符合预期目标。

基于上述发现，假设IgG N-糖基化模式的循环特征可能与每月月经周期中重复的性激素波动有关。在这种情况下，月经周期天数可以作为评估IgG N-糖基化变化的混杂因素[57]。虽然聚糖性状丰度的峰值变化与月经周期阶段有关，但它们导致队列中任一聚糖性状在整个月经周期中的平均变化最小，如本研究中模型所示。此外，与疾病或年龄引起的变化相比，与月经周期相关的IgG N-糖基化变化似乎非常小，本文研究小组先前已对此进行了检查[58]。在健康年轻女性的月经周期中，激素对IgG N-糖基化影响较小的原因可能是IgG的半衰期较长，为三周[59]。这意味着月经周期中性激素波动变化比新IgG的产生和糖基化更快。因此，IgG的糖基化很可能反映了超过一个月经周期长度的时间段内的平均性激素水平。总而言之，观察的趋势表明，经期女性中IgG N-糖基化取决于月经周期天数，尽管在涉及大量参与者的研究中，这种影响很小。

本研究首次显示了月经周期中聚糖性状丰度的峰值变化与单个性激素的峰值浓度变化之间的差异。性激素对IgG N-糖基化影响的表现发生了变化，因为与月经周期的持续时间相比，IgG具有较长的半衰期（21天）。这假定了IgG的产生和N-糖基化可能是通过持续的月经周期前的性激素浓度波动，由免疫系统的早期刺激所引发[60]。

雌激素对IgG糖基化影响的激素干预研究结果是一致的[32–34]。本研究揭示了雌二醇浓度与唾液酸化N-聚糖丰度呈正相关关系，这可能是由 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶1（St6Gal1；在B谱系细胞中将唾液酸添加到IgG中的关键唾液酸转移酶）上调引起[32]。最近，Jones等[61]报道称，血液中存在一种快速替代的B细胞非依赖性IgG唾液酸化反应；这不能完全归因于雌二醇，因为本文研究表明雌二醇和唾液酸化峰值出现在月经周期的不同阶段。已知半乳糖基化聚糖是随后末端IgG唾液酸化的底物[62]。据此，本文研究团队注意到在整个月经周期中IgG的唾液酸化和二半乳糖基化模式的变化方向相同。这可能意味着在细胞分泌途径中存在IgG半乳糖基化和唾液酸化的相互调节机制[63]，可能通过在添加半乳糖的 β -1,4-半

乳糖基转移酶 (B4GalT1) 和添加唾液酸的 St6Gal1 之间形成异二聚体复合物[64]。这两种糖基转移酶的酶活性可以被雌激素受体修饰, 雌激素受体在 E2 结合时充当核转录因子, 作为免疫系统活性的一部分启动特定基因的表达[65]。

尽管已有研究报道了雌激素会影响 IgG 半乳糖基化[34], 但具体机制仍然不清楚。2020 年的一项全基因组关联研究 (GWAS) [66] 确定了编码转录因子 RUNX1、RUNX3、SPINK4 和 ELL2 的基因是连接 E2 与 IgG 半乳糖基化下游信号传导机制的潜在参与者, 如 Mijakovac 等[67]进行的体外实验所示。本研究没有直接显示雌二醇和二半乳糖基化聚糖之间的显著关联, 表明雌二醇可能通常相关, 但可能不是月经周期中调节 IgG 半乳糖基化水平的单一关键因素。

评估其他激素对蛋白质糖基化影响的研究很少[68]。关于孕酮[69]和睾酮[70]的干预研究很少, 但提示与 IgG N-糖基化水平有关; 因此, 这些激素对 IgG N-糖基化的影响还有待进一步研究。已经发现睾酮对 IgG 半乳糖基化的体内调节反映了睾酮衍生雌二醇的作用, 而不是睾酮本身[34]。本研究观察到睾酮与几乎所有 IgG 聚糖性状之间的关联。这并不奇怪, 因为睾酮通过雄激素受体在成熟 B 和 T 淋巴细胞的发育中起着关键作用, 雄激素受体作为配体激活的转录因子, 改变一般基因表达[71], 并且还可能影响编码 B 细胞内参与蛋白质 N 糖基化处理的酶的基因表达。Munkley 等[70]先前对前列腺癌的研究揭示了睾酮通过下调唾液酸转移酶活性来表达抗炎 N-糖基化免疫特性, 从而降低癌细胞活力的可能机制。尽管针对男性的研究指出睾酮通过限制 B 细胞数量[73]而具有抗炎[72]和自身免疫保护特性, 但女性睾酮过量与慢性低度炎症有关, 这是多囊卵巢综合征 (PCOS) 性激素紊乱的潜在病理机制[74]。根据这些研究, 目前的数据通过与炎症糖型呈正相关以及与抗炎糖型呈负相关, 强调了睾酮在女性整体炎症性 IgG 表型中的相关性。尽管如此, 在健康的经期女性中, 卵巢产生的睾酮提供了一个丰富的储存库, 随后通过芳香酶的作用合成最有效的雌激素——雌二醇[75–76], 使睾酮在女性生殖系统的正常功能中具有不可替代性。

孕酮还显示出可靠的免疫调节特性[77], 特别是在免疫耐受方面, 这是成功妊娠的最关键特征[78]。本研究暗示了孕酮与月经周期黄体期抗炎 IgG 活性的相关性, 推测可能对免疫系统产生生理影响并延伸至妊娠期[78]。孕酮对免疫的作用可能采用不同的机制, 包括调节免疫细胞[79]和抗体功能[69,80], 以及阻碍促炎细胞因子的产生[81], 导致较少炎症抗体占主导地位。本研究表明, 统计

学上显著的孕酮相关性可能超过雌二醇和睾酮与 IgG N-糖基化的相关性。

假设月经周期中 IgG 糖基化激素调节机制可以通过将性激素与糖原活性联系起来来解释。糖原是编码直接参与 IgG N-糖基化的酶的基因 (如糖基转移酶、糖苷酶和糖核苷酸转运蛋白); 据估计, 这样的基因有 250–900 个, 占人类基因组的 1%–4%, 具体参考文献[82–84]。根据文献的最新发现, 孕酮调节寡糖转移酶活性。该酶将 N-聚糖前体从多萜醇载体转移至内质网中的合成蛋白[69]。同时, 雌激素比孕酮对于进一步的 N-聚糖修饰更关键, 因为雌激素激活糖基转移酶 B4GalT1 和 ST6Gal1, 这些酶分别通过在高尔基体中加入半乳糖和唾液酸来修饰 IgG N-聚糖末端[32,85–86]。睾酮与男性前列腺癌细胞中的糖蛋白唾液酸化有关[87], 但其对女性 N-糖基化的影响仍有待研究。本研究提出的关于雌二醇、孕酮和睾酮的所有结果表明, 性腺性激素在介导 IgG N-糖基化方面以及在月经周期中女性免疫方面 (最有可能) 具有潜在的相关作用。本研究也有一些局限性。例如, 由于这是关于月经周期中 IgG N-糖基化动力学的第一项研究, 因此检查了 IgG N-糖基化模式存在的变化, 方法是仅在平均分布的时间点 (每 7 天) 每周进行一次血液采样, 而不管月经周期阶段如何。然而这是在相对较长的时间内对每位女性进行的血液采用, 因此至少涵盖了两个完整的月经周期。测量的性激素血浆浓度并不能全面评估月经周期中日常激素的变化。未来对于旨在详细评估月经周期中特定生理过程的研究可能需要考虑更频繁 (每日) 的血液采样, 以获得更精确的性激素水平变化。

5. 结论

本研究应该是第一个评估月经周期中 IgG N-糖基化动态的研究。调节 IgG 上特异性聚糖结构的确切的决定性因素仍未被完全阐明; 然而, 这些决定性因素包括已经确定的遗传和环境因素, 以及性激素环境[88]。IgG 聚糖不仅是重要的生物标志物, 也是自身免疫性疾病和炎症性疾病的功能效应物, 已知在女性中占据主导地位并与女性性激素相关[31]。这项研究使区分生理月经周期驱动和病理性疾病相关的 IgG 糖基化变化之间的差异成为可能。此外, 特异性 IgG 糖型与许多疾病直接相关, 并且在本研究在单个个体的月经周期中显示出更大程度的变化。这在通过新开发的聚糖生物标志物 (GlycanAge 指数) 进行个性化健康监测的背景下可能很重要[35], 但这仍需要探索。然而, 在队列水平上, 月经周期引起的 IgG 糖基化变化很小

(小于0.8%), 允许大样本量的研究对妇女进行抽样, 而不考虑其月经周期阶段, 并在没有此类数据时使用历史样本。由于生理周期和N-糖基化过程的生物学复杂性, 需要额外的激素干预研究来阐明个体性激素浓度与IgG N-糖基化变化之间的机制背景。

Acknowledgements

We are grateful to the medical staff of the Jidong Oilfield Hospital (Beijing, China) for supporting this study. We want to thank Sasa Kralik Oguic from University Hospital Centre Zagreb, Croatia, for her help with measuring sex hormone concentrations. We acknowledge the members of our research groups who carried out daily activities for the project. We are most grateful to our colleague Thomas Klaric for the critical reading of the manuscript and his valuable and constructive suggestions, and our colleague Borna Rapčan for help with visualization. Finally, we want to thank the women who participated in the study for their time and efforts. This research was funded by the European Structural and Investment Funds grant for the Croatian National Centre of Research Excellence in Personalized Healthcare (KK.01.1.1.01), Australia-China International Collaborative Grant (NHMRC APP1112767 – NSFC 81561128020), National Natural Science Foundation of China (81773527 and 81573215), and the European Structural and Investment Funds CEKOM (KK.01.2.2.03.0006).

Authors' contributions

Conceptualization: Julija Jurić, Manshu Song, Frano Vučković, Marija Pezer, Wei Wang, and Gordan Lauc; methodology: Julija Jurić and Frano Vučković; software: Frano Vučković; validation: Julija Jurić; formal analysis: Frano Vučković; investigation: Julija Jurić and Jelena Šimunović; resources: Hongli Peng, Manshu Song, Youxin Wang, Jiaonan Liu, Qing Gao, Hao Wang, and Qiaoyun Chu; data curation: Julija Jurić and Frano Vučković; writing—original draft preparation: Julija Jurić, Frano Vučković, and Marija Pezer; writing—review and editing: Manshu Song, Irena Trbojević-Akmačić, Wei Wang, and Gordan Lauc; visualization: Frano Vučković and Julija Jurić; supervision: Irena Trbojević-Akmačić, Marija Pezer, Manshu Song, Gordan Lauc, and Wei Wang; project administration: Hongli Peng, Manshu Song, Youxin Wang, Marija Pezer, Irena Trbojević-Akmačić, Gordan Lauc, and Wei Wang; funding acquisition: Gordan Lauc, Manshu Song, Youxin Wang, and Wei Wang All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

hu Song, Gordan Lauc, and Wei Wang; project administration: Hongli Peng, Manshu Song, Youxin Wang, Marija Pezer, Irena Trbojević-Akmačić, Gordan Lauc, and Wei Wang; funding acquisition: Gordan Lauc, Manshu Song, Youxin Wang, and Wei Wang All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Compliance with ethics guidelines

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Gordan Lauc is the founder and owner of Genos Glycoscience Research Laboratory, a private research organization specializing in highthroughput glycomic analyses and has several patents in this field; Julija Jurić, Frano Vučković, Jelena Šimunović, Irena Trbojević-Akmačić, and Marija Pezer are employees of Genos Glycoscience Research Laboratory. The other authors declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.10.020>.

References

- [1] Channing CP, Schaerf FW, Anderson LD, Tsafirri A. Ovarian follicular and luteal physiology. *Int Rev Physiol* 1980;22:117–201.
- [2] Oertelt-Prigione S. Immunology and the menstrual cycle. *Autoimmun Rev* 2012;11(6–7):A486–92.
- [3] Janeway C. *Immunobiology 5: the immune system in health and disease*. New York City: Garland Pub; 2001.
- [4] Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al. *Essentials of glycobiology*. 3rd ed. New York City: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
- [5] Quast I, Peschke B, Lünemann JD. Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. *Cell Mol Life Sci* 2017;74(5):837–47.
- [6] Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017;27(1):3–49.
- [7] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 2007;96:179–204.
- [8] Diebolder CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 2014;343(6176):1260–3.
- [9] Arnold JN, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunol Lett* 2006; 106(2):103–10.
- [10] Banda NK, Wood AK, Takahashi K, Levitt B, Rudd PM, Royle L, et al. Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. *Arthritis Rheum* 2008;

- 58(10):3081–9.
- [11] Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med* 2012;18(9):1401–6.
 - [12] Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, Lünemann JD. Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Front Immunol* 2017;8:646.
 - [13] Freidin MB, Keser T, Gudelj I, Štambuk J, Vučenić D, Allegri M, et al. The association between low back pain and composition of IgG glycome. *Sci Rep* 2016;6(1):26815.
 - [14] Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277(30):26733–40.
 - [15] Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, et al. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol* 2007;44(12):3122–31.
 - [16] Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 2006;313(5787):670–3.
 - [17] Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MCI, Ravetch JV. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(50):19571–8.
 - [18] Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, Rademacher T. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J Exp Med* 1988;167(5):1731–6.
 - [19] Baković MP, Selman MHJ, Hoffmann M, Rudan I, Campbell H, Deelder AM, et al. High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides. *J Proteome Res* 2013;12(2):821–31.
 - [20] Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69(7):779–89.
 - [21] Yu X, Wang Y, Kristic J, Dong J, Chu X, Ge S, et al. Profiling IgG N-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: a community-based study in a Han Chinese population. *Medicine* 2016;95(28):e4112.
 - [22] Chen G, Wang Y, Qiu L, Qin X, Liu H, Wang X, et al. Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. *J Proteomics* 2012;75(10):2824–34.
 - [23] Hughes GC, Choubey D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(12):740–51.
 - [24] Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol* 2018;333:65–79.
 - [25] Bondt A, Selman MHJ, Deelder AM, Hazes JMW, Willemsen SP, Wuhrer M, et al. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *J Proteome Res* 2013;12(10):4522–31.
 - [26] Selman MHJ, Derks RJE, Bondt A, Palmblad M, Schoenmaker B, Koeleman CAM, et al. Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. *J Proteomics* 2012;75(4):1318–29.
 - [27] van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, et al. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009;11(6):R193.
 - [28] Cincinelli G, Generali E, Dudam R, Ravindran V, Selmi C. Why women or why not men? Sex and autoimmune diseases. *Indian J Rheumatol* 2018;13(1):44.
 - [29] Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* 2014;35(3):347–69.
 - [30] Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;2(9):777–80.
 - [31] Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA, Blankenhorn E, Brinley F, Collier E, et al. A gender gap in autoimmunity. *Science* 1999;283(5406):1277–8.
 - [32] Engdahl C, Bondt A, Harre U, Rauffer J, Pfeifle R, Camponeschi A, et al. Estrogen induces St6gal1 expression and increases IgG sialylation in mice and patients with rheumatoid arthritis: a potential explanation for the increased risk of rheumatoid arthritis in postmenopausal women. *Arthritis Res Ther* 2018;20(1):84.
 - [33] Huang C, Liu Y, Wu H, Sun D, Li Y. Characterization of IgG glycosylation in rheumatoid arthritis patients by MALDI-TOF-MSn and capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* 2017;409(15):3731–9.
 - [34] Ercan A, Kohrt WM, Cui J, Deane KD, Pezer M, Yu EW, et al. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight* 2017;2(4):e89703.
 - [35] Jurić J, Kohrt WM, Kifer D, Gavin KM, Pezer M, Nigrovic PA, et al. Effects of estradiol on biological age measured using the Glycan Age Index [Internet]. Albany: Aging; 2020 Oct 13 [cited 2020 Oct 27]. Available from: <https://www.aging-us.com/article/104060>.
 - [36] Štambuk T, Klasić M, Zoldoš V, Lauc G. N-glycans as functional effectors of genetic and epigenetic disease risk. *Mol Aspects Med* 2020;79:100891.
 - [37] Liu D, Li Q, Zhang X, Wang H, Cao W, Li D, et al. Systematic review: immunoglobulin G N-glycans as next-generation diagnostic biomarkers for common chronic diseases. *OMICS* 2019;23(12):607–14.
 - [38] Russell A, Adua E, Ugrina I, Laws S, Wang W. Unravelling immunoglobulin G Fc N-glycosylation: a dynamic marker potentiating predictive, preventive and personalised medicine. *Int J Mol Sci* 2018;19(2):E390.
 - [39] Kavur M, Lauc G, Pezer M. Systems glycobiochemistry: immunoglobulin G glycans as biomarkers and functional effectors in aging and diseases. In: Barchi JJ Jr, editor. *Comprehensive glycoscience*, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier B.V.; 2021. p. 439–78.
 - [40] Pucić M, Knezević A, Vidić J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(10):010090.
 - [41] Agakova A, Vučković F, Klarić L, Lauc G, Agakov F. Automated integration of a UPLC glycomic profile. *Methods Mol Biol* 2017;1503:217–33.
 - [42] 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):1650–9.
 - [43] Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 2011;124(3–4):229–36.
 - [44] Reed BG, Carr BR. The normal menstrual cycle and the control of ovulation. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth: MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2020 Oct 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/>.
 - [45] Stelzer IA, Arck PC. Immunity and the endocrine system. In: Ratcliffe MJH, editor. *Encyclopedia of immunobiology*. Oxford: Academic Press; 2016. p. 73–85.
 - [46] Khan D, Ansar Ahmed S. The immune system is a natural target for estrogen action: opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. *Front Immunol* 2016;6:635.
 - [47] Hughes GC. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2012;11(6–7):A502–14.
 - [48] Alvergne A, Högvist Tabor V. Is female health cyclical? Evolutionary perspectives on menstruation. *Trends Ecol Evol* 2018;33(6):399–414.
 - [49] Irvine EB, Alter G. Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology* 2020;30(4):241–53.
 - [50] Canellada A, Blois S, Gentile T, Margni Idehu RA. In vitro modulation of protective antibody responses by estrogen, progesterone and interleukin-6. *Am J Reprod Immunol* 2002;48(5):334–43.
 - [51] Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2017;17(8):469–82.
 - [52] Štambuk J, Nakić N, Vučković F, Pučić-Baković M, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, et al. Global variability of the human IgG glycome. *Aging* 2020;12(15):15222–59.
 - [53] Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins—implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(9):1318–26.
 - [54] Huhn C, Selman MHJ, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 2009;9(4):882–913.
 - [55] Martin TC, Šimurina M, Ząbczyńska M, Kavur MM, Rydlewska M, Pezer M, et al. Decreased IgG core fucosylation, a player in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, is associated with autoimmune thyroid diseases. *Mol Cell Proteomics* 2020;19(5):774–92.
 - [56] Vučković F, Theodoratou E, Tačaji K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J, et al. IgG glycome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):3078–86.
 - [57] Ahmad N, Pollard TM, Unwin N. The optimal timing of blood collection during the menstrual cycle for the assessment of endogenous sex hormones: can interindividual differences in levels over the whole cycle be assessed on a single day? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(1):147–51.
 - [58] Lauc G. Precision medicine that transcends genomics: glycans as integrators of genes and environment. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860(8):1571–3.
 - [59] Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing

- therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol* 2015;67(2 Pt A):171–82.
- [60] Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, Kumpfel T, Derfuss T, Khademi M, et al. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neuroinflammation* 2015;12(1):235.
- [61] Jones MB, Oswald DM, Joshi S, Whiteheart SW, Orlando R, Cobb BA. B-cell-independent sialylation of IgG. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(26):7207–12.
- [62] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014;5:520.
- [63] Hassinen A, Pujol FM, Kokkonen N, Pieters C, Kihlström M, Korhonen K, et al. Functional organization of Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells. *J Biol Chem* 2011;286(44):38329–40.
- [64] Khoder-Agha F, Harrus D, Brysbaert G, Lensink MF, Harduin-Lepers A, Glumoff T, et al. Assembly of B4GALT1/ST6GAL1 heteromers in the Golgi membranes involves lateral interactions via highly charged surface domains. *J Biol Chem* 2019;294(39):14383–93.
- [65] Cunningham M, Gilkeson G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;40(1):66–73.
- [66] Klarić L, Tsepilov YA, Stanton CM, Mangino M, Sikka TT, Esko T, et al. Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. *Sci Adv* 2020;6(8):eaax0301.
- [67] Mijakovac A, Jurić J, Kohrt WM, Krištić J, Kifer D, Gavin KM, et al. Effects of estradiol on immunoglobulin G glycosylation: mapping of the downstream signaling mechanism. *Front Immunol* 2021;12:680227.
- [68] Medvedová L, Farkas R. Hormonal control of protein glycosylation: role of steroids and related lipophilic ligands. *Endocr Regul* 2004;38(2):65–79.
- [69] Prados MB, La Blunda J, Szekeres-Bartho J, Caramelo J, Miranda S. Progesterone induces a switch in oligosaccharyltransferase isoform expression: consequences on IgG N-glycosylation. *Immunol Lett* 2011;137(1–2):28–37.
- [70] Munkley J, Vodak D, Livermore KE, James K, Wilson BT, Knight B, et al. Glycosylation is an androgen-regulated process essential for prostate cancer cell viability. *EBioMedicine* 2016;8:103–16.
- [71] Tsai MJ, O' Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994;63(1):451–86.
- [72] Gubbels Bupp MR, Jorgensen TN. Androgen-induced immunosuppression. *Front Immunol* 2018;9:794.
- [73] Wilhelmson AS, Lantero Rodriguez M, Stubelius A, Fogelstrand P, Johansson I, Buechler MB, et al. Testosterone is an endogenous regulator of BAFF and splenic B cell number. *Nat Commun* 2018;9(1):2067.
- [74] Çakıroğlu Y, Vural F, Vural B. The inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: association with obesity and IVF outcomes. *J Endocrinol Invest* 2016;39(8):899–907.
- [75] Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C. Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. *Front Immunol* 2018;9:1332.
- [76] Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004;25(6):947–70.
- [77] Hall OJ, Klein SL. Progesterone-based compounds affect immune responses and susceptibility to infections at diverse mucosal sites. *Mucosal Immunol* 2017;10(5):1097–107.
- [78] Shah NM, Lai PF, Imami N, Johnson MR. Progesterone-related immune modulation of pregnancy and labor. *Front Endocrinol* 2019;10:198.
- [79] Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Murdjeva M, Kyurkchiev S. Immunoregulation by progesterone: effects on immune cells and mesenchymal stem cells. *Adv Neuroimmune Biol* 2011;1(2):105–23.
- [80] Kelemen K, Bogнар I, Paal M, Szekeres-Bartho J. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cell Immunol* 1996;167(1):129–34.
- [81] Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S. Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):E719–30.
- [82] Cummings RD, Pierce JM. The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol* 2014;21(1):1–15.
- [83] Kikuchi N, Narimatsu H. Bioinformatics for comprehensive finding and analysis of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760(4):578–83.
- [84] Narimatsu H. Human glycogene cloning: focus on β 3-glycosyltransferase and β 4-glycosyltransferase families. *Curr Opin Struct Biol* 2006;16(5):567–75.
- [85] Coser KR, Chesnes J, Hur J, Ray S, Isselbacher KJ, Shioda T. Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(24):13994–9.
- [86] Hah N, Danko CG, Core L, Waterfall JJ, Siepel A, Lis JT, et al. A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. *Cell* 2011;145(4):622–34.
- [87] Munkley J. Glycosylation is a global target for androgen control in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2017;24(3):R49–64.
- [88] Wang W. Glycomedicine: the current state of the art. *Engineering*. In press.