

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminták  
N-glikánjainak kapilláris elektroforetikus analízise

Döncző Boglárka

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2018

# **Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminták N-glikánjainak kapilláris elektroforetikus analízise**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Döncző Boglárka** okleveles biológiatesttanár – földrajztesttanár

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Borbás Anikó, az MTA doktora

Dr. Drahos László, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet könyvtára

2018. március 19. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora

Dr. Csósz Éva, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Borbás Anikó, az MTA doktora

Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora

Dr. Csósz Éva, PhD

Dr. Drahos László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”

épület tanterme 2018. március 19. 15:00 óra

# 1. Bevezetés

A szénhidrátokról alkotott elképzeléseink az elmúlt néhány évtizedben jelentősen átértékelődtek: sokáig csak vázanyagként (cellulóz és kitin), energiaforrásként (keményítő és glikogén) vagy a nukleinsavak alkotóiként tartottuk számon őket. Mára a glikomika tudományának köszönhetően, fény derült a szénhidrát-szénhidrát, szénhidrát-fehérje, valamint a szénhidrát-nukleinsav kölcsönhatások jelentős részére és azok fontos élettani jelentőségére. A különböző glikoformák fontos szerepet játszanak a biológiai folyamatokban. Ilyenek például a vírusfertőzés folyamata, a szignáltranszdukció, a gyulladás, sejt-sejt kölcsönhatások, baktérium-gazdasejt kölcsönhatások, a fertilitás és fejlődés. A komplex cukormolekulák makro- és mikroheterogenitása azonban lényegesen nagyobb kihívást jelent a kutatók számára az izoláció során, mint a fehérjék és a nukleinsavak esetében. A cukorszerkezetek gyakori elágazási és kapcsolódási diverzitásának következményeként a szénhidrátoknak a legnagyobb a strukturális komplexitásuk a biopolimerek között.

A Ferdinand Blum német kutató által bevezetett formalin fixálóként használva megóvjaa a szöveteket a zsugorodástól és degradálódástól. Mivel a hagyományos és széles körben használt szövettani metszetek festésére alkalmazott vegyületek, mint a hematoxin és az eozin, kompatibilisek a formalin fixálással, a technika a szövetfixálás terén szinte kizárólagossá vált a patológiában. További előnye a módszernek, hogy a szöveti struktúrát és a sejtalakot is megfelelően stabilizálja.

A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) minták vizsgálata értékes alternatívát jelent, mivel ilyen minták rutinszerűen készülnek a hisztopatológiai vizsgálatokhoz. Az FFPE mintákat sikeresen alkalmazzák a genomika, proteomika, metabolomika ill. lipidomika területén is biomolekulák vizsgálatára. A glikomika egy viszonylag új, de felívelőben lévő ága az omikáknak. A terület fontosságát az is aláhúzza, hogy a szénhidrátok létfontosságú feladatokat látnak el a biológiai folyamatokban. Mivel a rákos elváltozások általában kapcsolatba hozhatók a sejtfelszíni szénhidrátprofilok megváltozásával, ezért a specifikus szénhidrát szerkezeti változások nyomon követése új rák-biomarkerek felfedezéséhez vezethet.

## 2. Célkitűzés

A növekvő igény az archív minták felhasználására az analízis módszerek fejlődését indukálta. Eddig leginkább az LC/MS és MALDI technikákat alkalmazták a vizsgálatokhoz. Legjobb tudomásom szerint a mi kutatócsoportunk volt az első, aki CE-LIF (kapilláris elektroforézis lézer indukált fluorescenciával) módszert használt FFPE minták glikánprofiljának analíziséhez. Először azt kívántam tesztelni, hogy a fixálás okoz-e szerkezeti változást a szénhidrátokban. Ehhez a formalinnal fixált paraffinba ágyazott glikoproteineket, humán szérumot majd egérből származó tumoros szövetmintákat PNGase F emésztésnek vettem alá, majd a kinyert cukrokat fluoreszcensen jelöltem (aminopiréntrisulfonát - APTS - festékkel), majd CE-LIF módszerrel vizsgáltam.

Dolgozatom célja bemutatni, hogy 1) a glikoproteinek aszparaginhoz kötött (N-linked) oligoszacharid része nem változik meg formalinnal való fixálás és paraffinba ágyazás során, valamint, hogy 2) FFPE szövetmintákból meghatározható a szövetre jellemző teljes glikánprofil ill. azonosíthatók az egyes cukorstruktúrák.

## 3. Eredmények és megbeszélés

### 3.1 A formalin fixálás cukorprofilra gyakorolt hatásának vizsgálata

#### 3.1.1 Standard glikoproteinek

Standard glikoproteinek képezték kutatásom alapját, mivel N-glikán struktúráik ismertek és CE-LIF módszerrel történő elválasztásuk is megoldott. Ennek kapcsán, három glikoproteint (Immunglobulin G, fetuin és Ribonukleáz B) nem fixált (kontroll), formalinnal fixált ill. formalinnal fixált paraffinba ágyazott formában vizsgáltam. Ezen glikoproteinek az N-glikoziláció fontos alcsoportjait képviselik: főleg neutrális, szialilált ill. magas mannóztartalmú cukorstruktúrákat tartalmaznak. A kísérleteket 3 párhuzamos mintával 3 ismétléssel végeztem. A minta-elválasztás során minden mintát kétszer injektáltam. Megállapítottam, hogy egyik standard glikoprotein esetén sem volt látható eltérés sem a struktúrákat jelentő csúcsok számában, sem a csúcsarányban a kezeletlen mintával összevetve.

#### 3.1.2 Humán szérum

A formalin fixálás hatására esetlegesen létrejövő glikozilációs változásokat a továbbiakban humán szérumon teszteltem, mivel ez komplexitásában közelebb áll a klinikai mintákhoz, mint a glikoproteinek. A vizsgálatok a fentebb tárgyalt glikoproteinekéhez hasonlóan zajlottak, azaz nem fixált, formalinnal fixált és formalinnal fixált paraffinba ágyazott mintákat hasonlítottam össze.

Ennél a komplex mintánál némi eltérést tapasztaltam a három különbözően előkészített minta N-glikán profiljai között. Azonban ennek az eltérésnek (12,68 RSD % relatív standard deviáció), ami az ICH (Az emberi felhasználásra szánt gyógyszerekkel kapcsolatos műszaki követelmények harmonizációját célzó nemzetközi tanács) előírásainak megfelelően 15% határérték alatti (<http://www.ich.org/home.html>), ezért nem tulajdonítottam neki biológiai jelentőséget.

#### 3.1.3 Egérből származó tumoros szövetminta

A fenti pozitív eredményekre alapozva a következő vizsgálatom tárgya egy egérből származó tumoros szövetminta teljes N-glikozilációs profiljának analízise volt. A kísérlethez az Országos Onkológiai Intézet SCID (súlyos kombinált immunhiányos) hím egereit használtam fel. Ezen

egerek genetikai módosítás miatt nem képesek immunválaszra általában a hiányzó vagy atipikus T és B limfociták miatt. Az egerek bőre alá HT-1975 tüdőrákos sejteket injekciótak (mindegyikbe 2 millió sejtet) laterálisan, mivel a keletkezett tumort vissza kellett mérni és itt kevésbé sérülékeny a bőr. A biopsziát akkor készítették, mikor a tumor átmérője elérte a 0,5-0,8 cm-t. A mintát elhalt állatból vették.

Az oligoszacharidok pontos, strukturális meghatározásához szekvenálásra van szükség, ami a napjainkban széles körben elterjedt módszert alkalmazva a nem-redukáló láncvégekről kiindulva lehetséges a struktúrák enzimatisz emésztése utáni analízissel és bioinformatikai módszerekkel. Ezen szekvenálási technikához monoszacharidokra ill. azok kötésére specifikus exoglikozidáz enzimek szükségesek, melyek a következők: *Arthrobacter ureafaciens* szialidáz (ABS) az  $\alpha(2-3,6,8,9)$  kötött szialsavak eltávolításához; borjú vese fukozidáz (BKF) az  $\alpha(1-2,3,4,6)$  fukozok; kardbab (*Canavalia ensiformis*) galaktozidáz (JBG) a  $\beta(1-4,6)$  kötött galaktózok; kávébab (*Coffea arabica*)  $\alpha$ -galaktozidáz az  $\alpha(1-3,4,6)$  galaktóz egységek valamint kardbab hexózaminidáz (JBH) a  $\beta(1-2,3,4,6)$  kötéssel rendelkező N-acetilglükózamin lehasításához (mindegyik a Prozyme cégtől, 0,5 U mennyiségben). A szekvenálást az enzimek együttes, mátrixszerű hozzáadásával végeztem. Ehhez a mintát egyenlő részekre osztottam, az elsőhöz csak szialidáz enzimet adtam, a másodikhoz szialidáz és fukozidáz enzimeket, a harmadikhoz szialidázt, fukozidázt és  $\beta$ -galaktozidázt, a negyedikhez szialidázt, fukozidázt,  $\beta$ -galaktozidázt és  $\alpha$ -galatozidázt és végül az ötödikhez szialidázt, fukozidázt,  $\beta$ - és  $\alpha$ -galatozidázt valamint hexózaminidázt adtam. A szekvenálás eredményeként 22 különböző cukorszerkezetet azonosítottam az egerből származó tumoros szövetminta N-glikomjából.

Az intakt, formalinnal fixált ill. FFPE minták között mindössze három struktúra esetén tapasztaltam eltérést, és ezen esetekben is csak mennyiségit: ezen csúcsok mindegyike 3x nagyobb mértékben jelent meg formalinnal fixált állapotban, mint a kontroll mintánál. A párhuzamos minták relatív standard deviációja a kérdéses három csúcs esetén 12,91-16,22 RSD % volt. A három struktúra olyan monoszialo oligoszacharid, melyben a szialsav egységek  $\alpha(2,6)$  kötéssel kapcsolódnak, és három olyan diszialo struktúrából származnak, melyek a fixálás során elveszítették az egyébként ismert labilisabb  $\alpha(2,3)$  kötött szialsav egységeiket.

### 3.2 Egerből származó FFPE minták glikánjainak analízise

Mivel előző vizsgálataim eredményei azt sugallták, hogy a formalin fixálás és a paraffinba ágyazás nincs szignifikáns hatással a glikoproteinek karbohidrát részére, a következőkben kiterjesztettem a teljes N-glikán profil meghatározást különböző eger szervekből származó

FFPE szövetmintákra és az azokban talált struktúrák pontos azonosítására. Ezen kísérleteimhez a következő formalin fixált és paraffinba ágyazott egér szerveket használtam: tüdőt, agyat, szívet, lépet, májat, vesét ill. belet. A különböző típusú szövetminták eltérő N-glikán profilt mutatnak, ami ennek megfelelően specifikusnak tekinthető az adott szövetre nézve. A glikánprofilok relatív standard deviációja 8,72 RSD % volt az azonos napon mért minták esetén. Hovatovább, az egyes szervek szövetei különböző arányban tartalmaznak magas, valamint alacsony sziálsav tartalmú, ill. különböző mérettartományba eső neutrális struktúrákat.

Ahhoz, hogy teljes biztonsággal meggyőződjünk arról, mely struktúrák adják az egyes szövetekre jellemző N-glikán profilt oligoszacharid szekvenálás volt szükséges, a glikánok cukor építőelemeinek és azok kötés típusának meghatározásához. A vizsgálatot exoglikozidáz mátrix emésztéssel végeztem el a fentebb leírt módon. Elsőként a tüdőből származó N-glikánokat vizsgáltam, amiben 16 különböző N-kötött oligoszacharidot határoztam meg.

A tüdő szövetmintáján elvégzett kísérletek alapján a többi FFPE egér szervből származó APTS-el jelölt, tisztított N-glikán profilok egyes oligoszacharidjainak azonosítását is elvégeztem exoglikozidáz enzimes szekvenálással és online adatbázis igénybevételével.

### 3.3 A cukorprofil változása a halál beálltától a fixálásig

Munkám harmadik részében arra kerestem a választ, hogy van-e összefüggés a cukor struktúrák totál N-glikán profilban való előfordulásának aránya és a mintavételtől a fixálásig eltelt időtartam között. A kísérletekhez egérből származó agy és tüdő szövetmintát használtam. Egyértelműen megfigyelhető volt egy olyan tendencia, miszerint a sziálsavas struktúrák érzékenyen reagálnak arra, ha sokáig szobahőmérsékleten állnak a fixálás előtt. A sziálsav egységek minden esetben az oligoszacharidok fehérjéhez való kapcsolódásától (vagy a fluorofór csoporttól) legtávolabb helyezkednek el és gyakran a hőmérséklet növelésekor enzimatisz emésztés nélkül is lehasadhatnak. Ezzel magyarázható, hogy a halál beálltakor közvetlenül feldolgozott szövetminta őrizte meg ezen struktúrákat a legnagyobb mértékben.

Érdekes módon, tüdő szövetmintánál nem tudjuk ezt a szabályosságot egyértelműen bizonyítani. Magyarázható ez azzal a ténnyel, hogy nem azonos struktúrák alkotják a két szövet N-glikán profilját. Mindazonáltal kijelenthetem, hogy nagyon sok olyan N-oligoszacharidot őriznek meg a kórházakban és kutatóintézetekben tárolt FFPE minták, melyek fontos információt rejthetnek a glikobiomarkerek felfedezése szempontjából.

## 4. Összefoglalás

Az élő sejtek felületét gazdagon borítják különféle szénhidrátláncok, melyek a glikokonjugátumok részeként fontos funkciókat látnak el a szervezet és a sejt életében. A glikoproteinek szénhidrát láncai befolyásolják a hozzájuk kapcsolódó fehérje konformációját, élettartamát, közreműködhetnek a sejt-sejt kölcsönhatásokban továbbá receptorai lehetnek különböző lektineknek vagy antitesteknek. A glikomika tudománya a szénhidrátok felépítését és funkcióit vizsgálja. Mivel az oligoszacharidok megváltozhatnak betegségek hatására, alkalmazhatóak biomarkerként. Az FFPE minták jó alternatívát jelenthetnek a friss/fagyasztott mintákkal szemben, könnyebb és hosszabb ideig való eltarthatóságuk miatt. Az FFPE mintákat több kevesebb sikerrel alkalmazták a genomika területén nukleinsavak izolálására, melyeket azután génexpressziós analízisre használtak, valamint a proteomika területén Western blotting analízisre, fordított fázisú fehérje array-re és tömegspektrometriai kutatásokra is. Vizsgálataim során megállapítottam, hogy a fehérjékhez kötött szénhidrátok nem változnak formalin fixálás hatására, így glikomikai kutatásokban is felhasználhatók. Eddig főleg MSI (mass spectrometry imaging) technikát használtak az FFPE minták glikozilációjának vizsgálatára. Azonban ez a technika annak ellenére, hogy egyszerre nagy számú különböző anyag detektálására és meghatározására alkalmas, nem tud különbséget tenni az egyes kötési és pozicionális izomerek között, melyeknek fontos élettani szerepük, és ennek megfelelően biomarker jelentőségük lehet, ezenfelül nagy mennyiségű mintát igényel, mivel viszonylag kis érzékenységgel bír. A kapilláris elektroforézis módszer ellenben olyan nagy felbontású technika, mellyel lehetővé válik az előbbieken említett izomerek és anomerek elválasztása is. Lézer indukált fluorescenciával alkalmazva nagyfokú érzékenységet érhetünk el.

Dolgozatomban azon kérdésekre kerestem a választ, hogy 1) megváltozik-e a glikoproteinek oligoszacharid szerkezete formalinnal való fixálás és paraffinba ágyazás hatására, valamint, hogy 2) lehetséges-e az FFPE szövetmintákból teljes glikánprofil meghatározása ill. az egyes cukorstruktúrák azonosítása. Munkám során standard glikoproteineken, humán szérumon ill. egérből származó tumoros szövetmintán végzett kísérleteimmel sikerül a speciális sziálsavas szerkezettől eltekintve nem változtatja meg a cukorprofil. Az FFPE egér szövetminták glikomikai analízise során a különböző szövetekből kinyert N-kötött glikánok a szövettípusokra jellemző glikozilációs profilt adtak. Az egyes szövetmintákban található glikánok pontos szerkezetmeghatározását exoglikozidáz mátrix emésztéssel oldottam meg. Megállapítottam, hogy az FFPE minták alkalmasak az N-glikánok

kapilláris elektroforetikus analízisére lézer indukált fluorescens detektálással. A jövőben a mintaelőkészítési módszerek fejlesztésével kisebb anyagmennyiségekből is lehetővé válna a cukorstruktúrák azonosítása, valamint nagyobb mintaszámmal el lehet végezni a módszer analitikai validálását.



Nyilvántartási szám: DEENK/398/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dönczö Boglárka  
Neptun kód: XHAOG3  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10037975

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dönczö, B.**, Szarka, M., Tóvári, J., Ostoros, G., Csánky, E., Guttman, A.: Molecular glycopathology by capillary electrophoresis: analysis of the N-glycome of formalin-fixed paraffin-embedded mouse tissue samples.  
*Electrophoresis*. 38 (12), 1602-1608, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201600558>  
IF: 2.744 (2016)
2. **Dönczö, B.**, Szigeti, M., Ostoros, G., Gács, A., Tóvári, J., Guttman, A.: N-Glycosylation analysis of formalin fixed paraffin embedded samples by capillary electrophoresis.  
*Electrophoresis*. 37 (17-18), 2292-2296, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201500446>  
IF: 2.744





### További közlemények

3. **Dönczö, B.**, Kerégyártó, J., Szurmai, Z., Guttman, A.: Glycan microarrays: new angles and new strategies.  
*Analyst*. 139 (11), 2650-2657, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c3an02289g>  
IF: 4.107
4. Ágoston, K., Gyémánt, G., Kalmár, L., Kerégyártó, J., Szurmai, Z., **Dönczö, B.**, Guttman, A.: Synthesis and MALDI-TOF MS Analysis of Protected Oligosaccharide Components of N-Glycoproteins.  
*J. Carbohydr. Chem.* 33 (6), 326-343, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07328303.2014.950737>  
IF: 1.417
5. Kalmár, L., Ágoston, K., Szurmai, Z., **Dönczö, B.**, Kerégyártó, J.: Synthesis of Fully O-Benzylated N-Linked Core Pentasaccharide Glycosyl Azide.  
*J. Carbohydr. Chem.* 31 (3), 203-219, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07328303.2011.642433>  
IF: 0.847

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,859**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,488**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.11.16.

