

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék:	3
1.Bevezetés és célkitűzés	5
2.Irodalmi áttekintés	6
2.1 Oligoszacharidok a biológiai rendszerekben	6
2.1.1 A glikoziláció típusai	6
2.1.2 N-glikánok biológiai funkciói	9
2.1.2.1 Immunfunkció.....	9
2.1.2.2 Strukturális funkció.....	10
2.1.2.3 Receptor funkció.....	11
2.1.2.4 Szabályozó funkció.....	12
2.1.2.5 Sejtek között kapcsolatban játszott szerep.....	13
2.1.3 Az N-glikánok analízise	16
2.2 Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminták.....	22
2.2.1 Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminták készítése és felhasználása	22
2.2.2 Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták analízise	26
2.2.2.1 Genomika.....	26
2.2.2.2 Proteomika	26
2.2.2.3 Glikomika	28
2.2.2.4 Metabolomika	30
2.2.2.5 Lipidomika.....	31
3. Anyagok és módszerek	33
3.1 Reagensek	33
3.2 Minták.....	33
3.3 Módszerek.....	33
3.3.1 Fixálás formalinnal és beágyazás paraffinba	33
3.3.2 Deparaffinizálás és mintaelőkészítés	34
3.3.3 Glikánok szekvenálása.....	35
3.3.4 Egérből származó szövetminták glikánprofil-változásának vizsgálata a halál beállta után az idő függvényében.....	35
3.4 Készülékek.....	36

3.4.1 CE-LIF	36
3.5 Az adatok kiértékelése	36
4. Eredmények	37
4.1 A formalin fixálás cukorprofilra gyakorolt hatásának vizsgálata	37
4.1.1 Standard glikoproteinek	37
4.1.2 Humán szérum	41
4.1.3 Egérből származó tumoros szövetminta	43
4.2 Egérből származó FFPE minták glikánjainak analízise.....	47
4.2.1 Egér szervek glikánprofiljának vizsgálata	47
4.2.2 Oligoszacharid szekvenálás exoglikozidáz enzimes kezeléssel	49
4.3 A cukorprofil változása a halál beálltától a fixálásig.....	51
5. Megbeszélés.....	54
5.1 Intakt, formalinnal fixált valamint formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták N-glikán profilbeli különbségei	54
5.2 Glikánstruktúrák azonosítása különböző egér szervekből.....	59
5.3 Időfüggés vizsgálata fixáláskor	65
6. Összefoglalás/Summary.....	66
7. Irodalomjegyzék	70
7.1 Dolgozat megírásához felhasznált irodalmak jegyzéke.....	70
7.2 Publikációs lista	85
8. Tárgyszavak/Keywords	87
9. Köszönetnyilvánítás.....	88
10.Függelék (megjelent publikációk)	89

1. Bevezetés és célkitűzés

Napjainkban egyre nagyobb az igény a különböző daganatos megbetegedések korai felismerésére és diagnózisára. Ehhez olyan biomarkerekre van szükség, melyekkel pontosan meghatározhatók a különböző betegségek és azok stádiumai. Doktori tanulmányaim során a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Molekuláris Medicina Kutatóközpontjához tartozó Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratóriumban az élő szervezetben fontos szerepet játszó szénhidrátok kapilláris elektroforetikus analízisével foglalkoztam. A biomarkerkutatáshoz felhasználható minták gyűjtése sok esetben hosszadalmas, akár éveket is igénybe vehet. Erre a problémára jelenthetnek megoldást a kórházakban/klinikákon készített és hosszú ideig tárolt formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetminták, melyek nagy számban állnak a kutatók rendelkezésére. 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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Oligoszacharidok a biológiai rendszerekben

2.1.1 A glikoziláció típusai

A szénhidrátokról alkotott elképzeléseink az elmúlt néhány évtizedben jelentősen ártértékelődtek: sokáig csak vázanyagként (cellulóz és kitin), energiaforrásként (keményítő és glikogén) vagy a nukleinsavak alkotóiként tartották 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 gyulladásos folyamatok, sejt-sejt, valamint baktérium-gazdasejt kölcsönhatások, a fertilitás és fejlődés. A komplex cukormolekulák makro-és mikroheterogenitása azonban lényegesen nagyobb kihívást jelent a kutatók számára, mint a fehérjék és a nukleinsavak esetén. A cukorszerkezetek gyakori elágazási és kapcsolódási diverzitásának következményeként a szénhidrátoknak a legnagyobb a strukturális komplexitásuk a biopolimerek között.

A szénhidrátok polihidroxi-aldehidek és –ketonok ill. ezek származékai. Kémiai tulajdonságaik és felépítésük alapján három csoportjuk különböztethető meg. A monoszacharidok általában 3-6, ritkán 7 vagy 8 szénatomot tartalmazó cukrok. Az oligoszacharidok 2-10 monoszacharid egységből álló, glikozidos kötéssel összekapcsolódó összetett szénhidrátok. A poliszacharidok több száz vagy ezer, monoszacharid egységből felépülő lineáris vagy elágazó láncú makromolekulák, melyek egyforma vagy különböző monoszacharidokból is állhatnak. Az oligoszacharidok számtalan élettani szerepet töltenek be a glikokonjugátumok hidrofíl részeként.

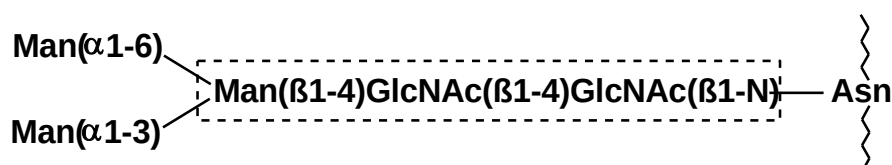
A glikokonjugátum kifejezés olyan makromolekulák leírására használható, melyek fehérjékkel vagy lipidekkel kovalensen kapcsolt mono- vagy oligoszacharidokat tartalmaznak. A gliko- előtag valamint a -szacharid és -glikán utótag szénhidrát alkotórészek jelentlétére utal az adott glikokonjugátum nevében (például glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok). Ezen biomolekulák szénhidrát komponenseinek többek között hatása van a konformációs és proteolitikus stabilitásra, vízkötő képességre. A

sejtfelszíni felismerést a közelmúltig protein-protein és protein-szénhidrát kölcsönhatásokkal magyarázták. A legújabb kutatások azonban rávilágítottak arra, hogy a szénhidrát-szénhidrát interakcióknak rendkívül fontos szerepük van a felismerési folyamatokban. Bizonyítást nyert, hogy a sejtfelszíni szénhidrátok meghatározó szerepet játszanak a sejtek külvilággal történő kommunikációjában kitüntetett helyzetüknek és szerkezeti változatosságuknak köszönhetően. Receptorként és markerként részt vesznek a sejt-sejt, valamint a sejt-extracelluláris biomolekula felismerésében és interakcióban. A glikoproteinek receptorai lehetnek különböző hormonoknak, enzimeknek, proteineknek, valamint kötőhelyet jelenthetnek vírusoknak, baktériumoknak és toxinoknak, továbbá nélkülözhetetlenek a sejtek szövetekké szerveződésében. Ezen sejtfelszíni struktúrák egyedekre ill. fajokra specifikusak [1], kulcsszerepük van a fehérje feltekeredésében (folding-jában) [2] ezáltal az immunológiai folyamatokban. Egyes oligoszacharid struktúrák megváltozása számos betegség ill. kóros elváltozás esetén megfigyelhető. Például a rákos sejtekre nem érvényes a kontaktgátlás mechanizmusa, ami a sejtfelszíni szénhidrátláncok megváltozásával magyarázható [3]. A monoszacharidok, a szénhidrátok építőelemei, polifunkciós vegyületek, melyek eltérő gyűrűtagszám, kötéstípus és anomer konfiguráció következtében sokkal nagyobb mértékben képesek variálódni, mint a polipeptidek vagy polinukleinsavak [4].

A glikokonjugátumok egyik, már említett alcsoportja, a glikoproteinek olyan, az élő szervezet számára alapvető funkciókkal rendelkező összetett fehérje molekulák, amelyek a polipeptid lánchoz kovalens kötéssel kapcsolódó cukor oldalláncokat tartalmaznak. A plazmamembránban található glikoproteinek legalább két doménből állnak: 1) egy főleg hordozó aminosavakból álló peptid, mely a lipid kettős rétegbe mélyed, valamint 2) egy hidrofíli domén, amely a membrán extracelluláris felszínén helyezkedik el. Számos membránfehérjének van egy harmadik, citoplazmatikus doménje is. A glikoproteinek oligoszacharid oldalláncai az extracelluláris polipeptid doménhez kapcsolódnak [5]. A glikoproteineknek alapvetően két fő típusát különböztetjük meg a szénhidrát és a polipeptid rész között létrejött kémiai kötés alapján: N-glikozidos kötés esetén N-, míg O-glikozidos kötés esetén O-glikoproteinekről beszélünk. Beszámoltak még C-típusú kötésről is, de dolgozatomban részletesebben csak az első csoportba tartozó proteinek oligoszacharid láncának szerkezetével foglalkozom.

A glikoproteinekben, a fehérje részhez kapcsolódó N-oligoszacharidok mindegyike tartalmaz egy közös, ún. core pentaszacharidot (1. ábra), melynek összetétele: α -D-Man-

(1→6)-[α-D-Man-(1→3)]β-D-Man-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-D-GlcpNAc, amely β-N-glikozidos kötéssel kapcsolódik a redukáló végi N-acetilglükózaminon (GlcNAc-on) keresztül a peptidlánc olyan L-aszparaginjának aminoszénjéhez, ami az Asn-X-Ser/Thr konszenzus szekvenciában található, ahol X nem lehet szerin, threonin illetve prolin. Az N-glikánoknak három fő csoportját különböztetjük meg a core pentaszacharidhoz kapcsolódó monoszacharid egységek alapján: 1) oligomannóz típus, 2) komplex típus, 3) hibrid típus, amely egyaránt mutatja az oligomannóz típus és az komplex típus jellegzetességeit [4, 6].



1.ábra: Az N-oligoszacharidok core pentaszacharidja [4]

Az N-glikánok szintézise az endoplazmatikus retikulum egy lipidjén, a poliprenol dolichol pirofoszfáton kezdődik. A kezdő N-glikán-szerkezet 14 cukor egységből áll: Glc₃Man₉GlcNAc₂, melyek co-transzlációs módon, egy blokkban szállítódnak és kötődnek az N-acetilglükózaminon (GlcNAc) át az aszparaginhoz a szintetizálódó fehérje specifikus N-glikozilációs konszenzus szekvenciáján belül. Az endoplazmatikus retikulumban, majd a Golgi-készülékben az N-glikán szerkezet a monoszacharid egységek glikozidázos eltávolításával módosul, majd ezt követi a glikozilációs szerkezet felépítése a glikoziltranszferázok által az szénhidrát egységek hozzáadásával, mint például galaktóz, fukóz vagy szíálsav a komplex N-glikoproteinekben, vagy mannóz monomerek hozzáadásával a high mannóz struktúrákban [7].

Sok különböző elmélet alakult ki a glikokonjugátumok oligoszacharid egységeinek biológiai szerepével kapcsolatban. Ezekkel kapcsolatban három általános alapelvet ismerünk: 1) Nehéz meghatározni vizsgálatok nélkül egy adott glikokonjugátum oligoszacharid részének funkcióját vagy a szervezetre gyakorolt hatását; 2) Ugyanazon oligoszacharid különböző feladatokat láthat el a szervezetben különböző élettani helyzetekben vagy fejlődési fázisokban; 3) A specifikus funkciókat gyakran specifikus oligoszacharidok vagy szokatlan módosulásaik határozzák meg. Az ilyen szokatlan oligoszacharid szekvenciák kedvelt célpontjai a patogén toxinoknak és mikroorganizmusoknak. A gazdasejt és a patogén mikroorganizmus között fennálló

interakciók következtében a sejtfelszíni cukroknak sok fajon belüli és fajok közötti variációja alakult ki. Az oligoszacharidok funkcióinak közös jellemzői a specifikus felismerő elemeik és a biológiai folyamatokra gyakorolt modulációs hatásuk [8].

A glikoziláció típusai közül az N-aszparagin kapcsolású cukorláncok enzimatikusan vagy kémiai úton távolíthatók el a glikoziláció természetes variánsainak, valamint a genetikai mutánsok viselkedésének tanulmányozása céljából [9]. A fehérjék glikozilációjának megváltozása különböző hatással lehet a fehérjére: a következmények, a részfunkciók elvesztéséig vagy akár a fehérje teljes megváltozásáig terjedhetnek. Továbbá a hatások különbözhetnek az egyes fehérjéknél *in vivo* és *in vitro* állapotban megfigyelt funkciókban. Például az eritropoietinnél a deszializáció és/vagy a kevésbé elágazó oligoszacharidok megjelenése *in vitro* az aktivitás növekedéséhez, de *in vivo* épp ellenkezőleg, az aktivitás csökkenéséhez vezethetnek [10]. Továbbá például a granulocita/makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) esetében a kisebb mértékű glikoziláció hatására a receptor kötődés és az aktivitás fokozatos növekedése következik be, viszont nő az antigenicitás és a nem glikolizált forma gyorsan kiürül [11].

2.1.2 N-glikánok biológiai funkciói

Célom az N-kötött oligoszacharidok azon funkcióinak összefoglalása, melyeket még csak néhány évtizede ismer a tudomány. A sejthártyába beékelődő fehérjékhez sok esetben szénhidrát láncok kapcsolódnak, melyek a sejtek közötti tér felé eső oldalon helyezkednek el, így aszimmetrikussá teszik a sejthártyát.

2.1.2.1 Immunfunkció

Az N-glikánok fontosságát elsőként a vércsoportok felfedezése tanúsította. Az AB0 vércsoport antigéneket Karl Landsteiner és munkatársai írták le a 20. század elején. Kutatásuk eredményeként az embereket különböző csoportokba osztották a szérumfaktorok jelenlétének vagy hiányának megfelelően, amelyek a más emberektől izolált vörösvérsejteket agglutinálták (irreverzibilisen kicsapták). Ma már tudjuk, hogy ezek a szérumfaktorok antitestek, az antigének pedig glikán epitópok. Az AB0 antigének a vörösvértestek membránjának glikoproteinjein szintetizálódnak és polimorfizmusuknak fontos orvosi következményei vannak. Az újszülött immunrendszere IgM antitesteket termel az AB0 antigének ellen. A 0 vércsoportúak nem szintetizálnak A vagy B antigéneket, viszont a vérben IgM antitestek (izoagglutininek) keringenek az A és B

vércsoport antigének ellen. B vércsoport esetén IgM anti-A izoagglutininek vannak jelen az A vércsoportot meghatározó antigén ellen, de a szervezet nem termel izoagglutint a B antigén ellen. Ezzel szemben az A vércsoportú személytől származó szérumok anti-B antitesteket tartalmaznak. Az AB vércsoporttal rendelkezők viszont nem termelnek anti-A vagy anti-B IgM izoagglutint, mert a vörösvértestek felületén mind az A, mind a B antigén megjelenik [6].

A glikoproteinek oligoszacharid része védelmet nyújthat a polipeptid láncnak proteázok vagy antitestek általi felismerése ellen [12]. Ez a glikokonjugátum burok az egész sejtet beborítja, úgynevezett glikokalixot hozva létre.

Néhány oligoszacharid a mikrobiális és immuntámadások elhárításában vesz részt. Például egy O-acetilészter kapcsolódása a terminális szialsavhoz megakadályozza a patogén influenza A vírus kötődését az oligoszacharidhoz, mintegy álcázva azt [13]. Hasonlóképpen, ha a Tn antigénhez galaktóz vagy szialsav egység kapcsolódik, megszűnik autoimmun reaktivitása [14]. Az oligoszacharid szekvenciák mikroorganizmusok és paraziták elleni védelemben is szerepet játszhatnak. Például, mikor a patogén mikroorganizmusok megkísérelnek áthatolni a mucosa-membránon, először oligoszacharid ligandumaik az oldható mucinokhoz kapcsolódnak. Ebben az esetben úgy lehet őket eltávolítani, hogy a mukozális sejtek érintetlenek maradnak [15]. Így a gazdasejt szerencsésen a maga javára fordította a patogén receptor specifitását. Az állati szervezetek és mikroorganizmusok között létrejövő szimbiotikus kapcsolat kialakításában és fenntartásában nagyon gyakran oligoszacharidok is szerepet játszanak. Néhány kommenzalista bélbaktérium az állatokban [16] és néhány gyökérgümőképző baktérium a növényekben [17], specifikus cukorstruktúrákkal tudja szabályozni kapcsolódását a gazdasejt sejthártyájához. A szimbiózis során az oligoszacharidok által megvalósuló együttműködés előnyös mindkét résztvevő élőlénynek [18].

2.1.2.2 Strukturális funkció

Az oligoszacharid egységek további jól ismert funkciója, hogy részt vesznek a fehérje szintézisben a durva felszínű endoplazmatikus retikulumon (ER), továbbá a fehérje oldhatóságának és konformációjának ezutáni fenntartásában. Így sok fehérje, mely hibásan glikozilálódott, nem megfelelően szintetizálódott és/vagy nem távozott az endoplazmatikus retikulumból, degradálódik [19].

Az extracelluláris mátrix glikokonjugátumai különböző hatással vannak a sejt életére [6]. Ezzel meghatározzák a sejtfelszín és a fehérjék töltését, így befolyásolják a sejt-sejt kölcsönhatásokat és a különböző szekrétrumok viszkozitását. Például a laminin oligoszacharid polilaktózámin láncai és béta-galaktóz egységei egy béta galaktózt specifikusan kötő lektinhez kapcsolódva részt vesznek a mátrix struktúrájának kialakításában [20, 21].

2.1.2.3 Receptor funkció

Az oligoszacharidok receptor funkciót láthatnak el vírusokkal, baktériumokkal és más parazita ágensekkel, továbbá sok növényi és bakteriális toxinnal szemben, valamint antigénként funkcionálnak autoimmun és alloimmun reakciók esetén. Ez utóbbi önvédelmi reakció, mely azonban transzplantáció esetén szövődményt okozhat, mivel vagy a gazda szervezet reagál idegenként a beültetett szervre, vagy a szerv kezd el ellenanyagot termelni a gazdaszervezet ellen. Alloimmun eredetű vetélés jöhet létre, ha az anya szervezete különösen elutasítóan reagál a magzat sejtjeire vagy nem megfelelően működnek az ilyen válaszok gátló mechanizmusai [22]. Általában a kapcsolódó ágens specifikus az oligoszacharid szekvenciájára. Például az influenza virális hemagglutininja felismeri a szialsav egység modifikációit és ,hogymilyen kötéssel kapcsolódik a többi oligoszacharidhoz [13]; míg a kolera toxin nagy specifitással kötődik a GM1 gangliozidhoz [23]. A részlegesen degradálódott vagy nem teljesen szintetizálódott oligoszacharidok, mint a Tn antigén, idegen anyagként viselkedhetnek az emberi szervezetben [14]. A specifikus oligoszacharidokat sikerrel alkalmazzák a cukorláncok expressziójának vizsgálatokor.

A glikoziláció alapjaiban befolyásolhatja a fehérjék kölcsönhatásait ligandumaikkal és receptoraikkal. A növekedési faktorok néhány sejthártya-receptora glikoziláció révén nyeri el funkcióját. Ez azért szükséges, hogy az újonnan szintetizálódott receptor, ne kötődjön a növekedési faktorhoz, míg el nem jut rendeltetési helyére, a sejthártyába. Ezzel a késleltetéssel a szervezet elkerüli az egyazon sejtben termelődő receptor és növekedési faktor idő előtti kötődését [24, 25]. A ligandum glikozilációja is szabályozhatja a működést. Ennek egyik példája a humán β chorion gonadotropin hormon (β -HCG), melynek szekréciójára gátló hatást fejt ki az, ha az α alegység egyik glikozilációs helyét eliminálják [26].

2.1.2.4 Szabályozó funkció

A glikoziláció befolyásolhatja sok növekedési faktor vagy hormon biológiai aktivitását. Például a granulocita/makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) aktívabb nem glikozilált formában, ami rekombináns technológiával állítható elő. Azonban a GM-CSF természetben előforduló glikozilált változata alapvető különbségeket mutat a rekombinánséhoz képest a kötődési affinitásban és a szignáltranszdukcióban [11]. E funkció másik kitűnő példáját szolgáltatják az immunglobulin szupercsaládba tartozó neurális sejtadhéziós molekulák (N-CAM), melyek valójában olyan molekulacsoportok, melyeket öt immunglobulin domén alkot. Ezen domének egyike a membránból extracellulárisan kinyúlik, ennek segítségével az N-CAM molekulák egymáshoz tapadnak homofil kötődést létrehozva (ha más szerkezetű sejtfelszíni fehérjékhez kötődnek, heterofil kötődésről beszélünk). Az N-CAM-ot alkotó fehérjékre poszttranszlációs poliszíálsav láncok (szénhidrátláncok) kerülnek, melyek embrionális korban negatív töltésük miatt csökkentik a homofil kötődés erősségét [27]. Az életkorral a poliszíálsav láncok hossza változik. Felnőtt korban sokkal rövidebbek. Így a felnőtt N-CAM képes hatékonyabb homofil kötődésre, feltételezhetően azért, mert nincs szükség olyan nagymértékű plaszticitásra, mint egy fejlődő idegrendszer esetében, valamint felnőtt korban a stabilabb szöveti szerkezetet biztosító erősebb sejtek közötti kapcsolat az előnyösebb [28].

Bizonyos esetekben a receptor fehérjék funkcióját és a fehérje-ligandum kölcsönhatásokat nem a fehérjék vagy ligandumok oligoszacharidjai állítják be, hanem más szomszédos struktúrák. Például egyes növekedési faktorok receptorait gangliozidok szabályozzák. A gangliozidok a receptor fehérjétől elkülönülve helyezkednek el. Az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor és az inzulin receptor tirozin foszforilációs aktivitását befolyásolja a gangliozid megjelenése a membránban [29, 30]. Fontos megjegyezni, hogy gangliozidok esetén a specifikus oligoszacharid szekvencia lényegesebb, mint a töltés vagy a méret. További példa egy fehérjéhez kötött oligoszacharid szabályozó funkciójára, a heparinmolekula esete. Ez a molekula irányítja a természetes antikoaguláns antitrombin III reakcióját. A rendkívül specifikus heparinszekvencia kötődése az antitrombin III-hoz erős antikoagulánssá alakítja azt [31]. A vérárammal kapcsolatban lévő endothél sejtek felületén található heparinszekvenciáknak feltételezhetően alapvető antitrombogén szerepük van [32].

Az oligoszacharidok befolyásolhatják néhány élettani szempontból jelentős molekula sejtben történő felhasználását. Például néhány növekedési faktor *in vivo* specifikusan kötődik glükózaminoglikán láncokhoz. Ezen glükózaminoglikán láncokat immobilizálva, affinitás kromatográfiával tisztítani lehet az adott növekedési faktort. A specifikus kötődés megakadályozza a faktor sejtközötti térbe történő diffúzióját, mivel ehhez stimulálásra van szükség. Továbbá a kötődés a glükózaminoglikánhoz megvédi a növekedési faktort a nem specifikus proteolízistól, így meghosszabbítva annak aktív életét [33]. Hasonló feladatokat látnak el a szekréciós szemcséken található glükózaminoglikán-láncok is, a védelem mellett a kötődés szabályozza alapvető funkcióikat is [34].

A glikoproteinek oligoszacharid része képes a hormonokéhoz hasonló hatást kifejteni és ezzel befolyásolni különböző szervek működését. A legjobban ismert példák a paradicsomban és burgonyában [35] leírt oligoszacharidok, amelyek specifikus membránfehérjék foszforilációját indukálják. Továbbá *in vitro* a szabad magas mannóztartalmú láncoknak immunszuppresszív hatásuk van az emlősök szervezetre. Viszont a szabad heparin-fragmentek, melyek pl.: simaizom vagy endothél sejtekből szabadulnak ki, a sejtek növekedését gátolják. Ezen hatásukat valószínűleg ma még nem ismert receptorokhoz való kötődés útján fejtik ki [36].

2.1.2.5 Sejtek között kapcsolatban játszott szerep

Az oligoszacharidoknak fontos szerepük van a sejten belüli és a sejtek közötti transzportban is. A legjobban ismert példa a sejten belüli szállító funkcióra a mannóz-6-foszfát egységet tartalmazó oligoszacharidok szerepe a lizoszomális enzimek eljuttatásában a végső rendeltetési helyükre, a lizoszómába. A hibás foszforiláció olyan emberi megbetegedéseket okozhat, mint az I-sejt kór (örökletes anyagcserezavar, mely csontelváltozásokat és mentális retardációt okoz) [37] és a pszeudo-Hurler polidisztrófia (lizoszomához kapcsolódó betegség, amely szorosan összefügg az I-sejtes betegséggel) [38]. Ezek megjelenését a lizoszomális enzim sejtekbe történő eljutásának hiánya jelzi. Viszont néhány alacsonyabbrendű eukariótánál és az emlősök néhány sejtípusánál sem feltétlen szükséges a mannóz foszfát a lizoszomális enzimek forgalmában [39].

A szénhidrát-szénhidrát kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a sejt-sejt interakciókban és az adhézióban. Ezen kölcsönhatások viszont kevés esetben figyelhetők meg jól. A szelektin családba tartozó molekulák receptor-ligandum típusú kapcsolattal

segítik elő különböző sejtek funkcionális kölcsönhatását. A felismeréshez szialilált, fukozilált szénhidrátláncok (szialil Lewis-x és a szialil Lewis-a) szükségesek [40]. A felismerésben szerepet játszó oligoszacharidok meghatározott pontokon helyezkednek el a glikokonjugátumon belül. Nemrégén fedezték fel, hogy az oligoszacharidok, melyek nagyon közel helyezkednek el egymáshoz, a polipeptidláncon klaszteres szacharid-foltot képeznek a specifikus felismeréshez [41]. Ez specifikus felismerő markerként működhet. Továbbá az oligoszacharidok módosításával, mint a szulfatálás, egyedi kötőhelyek hozhatók létre. Korábban már bizonyítást nyert, hogy a spermium kapcsolódása a petesejthez egy, a zona pellucida glikoproteinjén található oligoszacharidon (ZP3) keresztül történik, valószínűleg a hártya β -galaktoziltranszferázzal való kölcsönhatása révén [42]. További példák a sejt-sejt kötődésre az olyan specifikus szénhidrátok, mint a CD44, a makrofág szialoadhezin és a B-sejt lektin (CD22 β) [43].

A glikokonjugátumok szénhidrát struktúráinak expressziója függ attól, hogy milyen szövetben vagy a fejlődés mely időszakában jelenik meg. Ezen túl még az azonos struktúrák is sok különböző funkciót láthatnak el egy adott élőlényben. Például a lizoszomális enzimek mannóz-6-foszfáttartalmú oligoszacharidjai az enzimek lizoszómába juttatásában játszanak szerepet [44]. Azonban más fehérjéken is találhatók mannóz-6-foszfáttartalmú oligoszacharidok, beleértve a proliferint [45], tiroglobulint [46], az EGF receptort [47] és a transzformáló β növekedési faktor (TGF- β) prekurzorát [48]. Ezen megfigyelések alapján lehetséges, hogy ezeknek az oligoszacharidoknak más biológiai szerepeik is legyenek. A szialilált, fukozilált laktózinok pedig kritikus funkciót látnak el a szelektinek általi felismerésben [40], de sok olyan szövettípusban is megtalálhatók, ahol a szelektinek nem jelennek meg. A polisziálsav-láncok, melyek fontos szerepet játszanak az embrionális N-CAM-ban (neutrális sejt adhéziós molekula) [28], több típusú fehérjén is megtalálhatók, a petesejt kocsonyás burkának egyik fehérjétől egy nátrium-csatorna fehérjéig [49].

A glikokonjugátumok fajspecifikus variációi azt eredményezik, hogy néhány oligoszacharid csak bizonyos élőlényekben van jelen. Például különböző emlős fajokban a vörösvértestek glikolipidjei eltérhetnek mind a glikokonjugátumok elsődleges szekvenciájában, mind pedig a szíálsavak típusában [50]. A gamma-glutamil transzpeptidáz N-glikozilációja jelentősen eltér különböző fajok esetén [26]. Nagy valószínűséggel a fehérjék glikozilációjának eltérése is szerepet játszik a fajok között megfigyelt morfológiai és funkcionális szempontból jelen lévő különbség létrejöttében.

Az ilyen eltérések miatt lehetséges, hogy különböző fajokra nézve a patogének eltérő szelekciós nyomást eredményeznek, vagyis a különböző túlélési esélyek és szaporodási képesség miatt a genotípusok nem egyenlő mértékben jelennek meg az utódgenerációban, ennek eredményeképpen pedig megváltozhat a populációk genetikai összetétele az egymást követő nemzedékek során.

A glikozilációnak azonban a fajok közötti variáció mellett vannak fajon belüli eltérései is. A glikoziláció genetikai polimorfizmusait, melyek vércsoportokként ismertek, a vértranszfúzió elterjedésekor fedezték fel [6]. A vörösvérsejtek és májsejtek szíalsavas struktúrái között is megfigyeltek egyedek közötti polimorfizmusokat egér- és kutyatényészetekben [51]. A megfigyelt polimorfizmusok fontosabbak vadon élő egyedeknél, ahol szelekciós előnyt jelenthet a néhány mikroorganizmus vagy más mérgező ágens elleni védelem a populáció azon részének, amelyik termeli a specifikus oligoszacharid struktúrát. Néhány esetben azok a patogének, melyek miatt létrejött az adott polimorfizmus, már eltűntek a környezetből, de a polimorfizmus megmaradt.

Az oligoszacharidok terminális szekvenciái, szokatlan struktúrái és modifikációi valószínűleg specifikus biológiai szerepeket irányítanak. A magas mannóztartalmú oligoszacharid struktúrákat nemcsak a lizoszomális enzimeken azonosították, hanem az emlősök immunoglobulin M-jétől (IgM) a növények lektin szójabab agglutininjáig [52] számtalan fehérjén. Ez alapján feltételezhetnénk, hogy az ilyen általánosan elterjedt struktúra nem valószínű, hogy specifikus biológiai funkciókat szabályoz. Viszont a mannóz egységek foszforilálásával létrejövő foszfomannozil marker irányítja a glikozilált enzim bejutását a lizoszómába. Másik példa a heparin/heparan diszacharid, melynek ismétlődő egységei specifikus ligandumokká alakulnak át epimerizációval és szulfatációval az antitrombin III molekulán vagy a fibroblast növekedési faktoron (bFGF) [53]. Hasonló funkciót látnak el a korábban már említett polisziálsav láncok vagy a szíalsavak O-acetilálása is.

Legtöbb esetben a terminális vagy külső cukroknak és modifikációiknak van fontos szerepe az életfontosságú kölcsönhatásokban. Ezen struktúrák, amelyek specifikus biológiai szerepekben vesznek részt, sok esetben a gazda-patogén kapcsolat hatására változnak. Azonban lehetséges, hogy ugyanazon módosítás a szervezet különböző részein más funkciót tölt be. Például míg a szíalsavak O-acetilációja a mukozális felszíneken

védő szerepet játszik a gazda-mikrobiális kölcsönhatásokban [54], az O-acetiláció az agy fejlődési folyamataiban is fontos szerepet tölt be [28].

Az oligoszacharidok számtalan funkciót betölthetnek az emberi szervezetben: ezen funkciók közös jellemzője, hogy irányítják és szabályozzák a felismerési folyamatokat, ezzel részt vesznek a funkcionális diverzitás létrehozásában, melynek szerepe van a különböző sejtek, szövetek, szervek és fajok fejlődésében és evolúciójában. A genomban mintegy 600 gén hozza létre ezt a diverzitást. A viszonylag kis számból adódik, hogy egy adott gén által kódolt oligoszacharid sokféle funkciót tölthet be különböző szövetekben és a fejlődés különböző szakaszai során. Az oligoszacharidok kutatásának nehézsége, hogy még a teljes struktúra és bioszintézis ismerete mellett is nehéz következtetni az adott szénhidrát specifikus funkcióira.

2.1.3 Az N-glikánok analízise

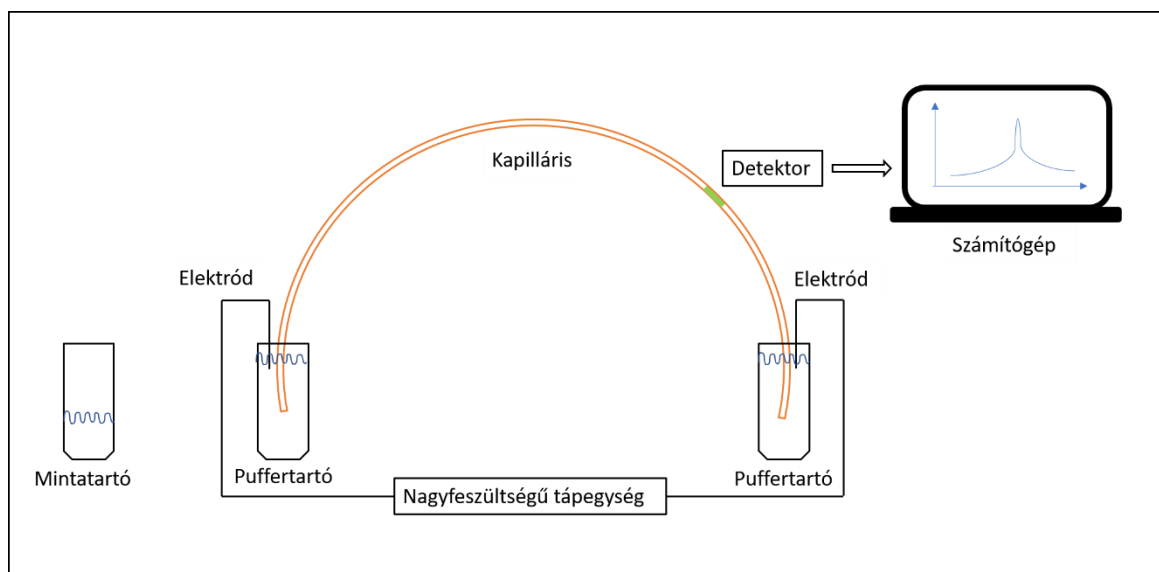
A glikoanalitikai módszer kiválasztása nagyban függ a vizsgálandó karbohidrát mennyiségétől, tisztaságától és a forrástól (pl: szövetminta vagy sejtvonal), amelyből izolálták. A lehetséges elválasztási technikák összefoglalása az 1. táblázatban látható.

A technika megnevezése	Leírása	Használata	Érzékenység	Referencia
FACE: fluorofór asszisztált szénhidrát elektroforézis	Elektromos erőterben a minta komponensei különböző sebességgel haladnak a magas koncentrációjú poliakrilamid gélben.	Jelölt mono- és oligoszacharidok elválasztására, azonosítására és kvantifikálására alkalmas.	alacsony pmol	[55]
GLC vagy GC: gáz (-folyadék) kromatográfia	Gázfázisú kromatográfias technika a minták illékony származékainak elválasztására.	Cukrok felépítő egységeinek és kötéseinek meghatározása. Általában MS-sel összekapcsolva.	<100 pmol	[56]
HPAEC-PAD: magas pH-n anioncserélő kromatográfia pulzáló amperometrikus detektálással	Ioncserélő folyadékkromatográfias eljárás, mely magas pH-n valósul meg, ami a cukroknak töltést biztosít.	Mono- és oligoszacharidok elválasztására, azonosítására és kvantifikálására alkalmas származékképzés nélkül.	alacsony pmol	[57]
HPLC: magas nyomású folyadékkromatográfia	Analitikai vagy preparatív elválasztásokra szolgáló eljárás.	A legtöbb glikán alosztály és glikokonjugátumok elválasztására alkalmas módszer, ha szükséges, MS-sel kapcsolva.	fmol	[58]
SDS-PAGE: Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis	Gélelektroforézis, mely a fehérjéket molekulatömegük alapján választja szét.	Glikoproteinek jellemzésére használható.	fmol	[59]
PAS: időleges sav-Schiff reakció	Cukrok kolorimetriás meghatározására szolgál.	Glikánok általános detektálása	fmol	[60]
NMR: mágneses magrezonancia spektrometria	1D NMR spektroszkópia	Monoszacharidok számának és anomer konfigurációjának detektálására alkalmas.	nmol	[61]
COSY; TOCSY; NOESY; ROESY; HMBC; HSQC	2D NMR spektroszkópiai eljárások	Glikánok anomer konfigurációja és szekvencia analízisére használható.	nmol	[62]
MALDI: mátrix asszisztált lézer deszorpció és ionizáció	MS ionizációs technika.	Glikánok és glikokonjugátumok tömegének feltérképezésére szolgáló módszer.	pmol	[63]
ESI-MS: elektropray ionizációs tömegspektrometria	MS ionizációs technika.	Glikánok és glikokonjugátumok molekulatömegének és szekvenciájának analízisére szolgál.	fmol	[64]
CAD-MS/MS: ütköztetéssel aktivált disszociációs tandemtömegspektrometria	Tandem MS módszer, melynél az ionok inert gázban való ütköztetés során fragmentálódnak.	A glikánok vagy glikokonjugátumok szekvencia analíziséhez használható.	pmol	[65]

1. táblázat: Glikánok és glikokonjugátumok vizsgálatára szolgáló módszerek [6]

Kapilláris elektroforézis (CE) során a töltéssel rendelkező részecskék valamilyen háttér elektrolitban (puffer/gél) elektromos erőter hatására vándorolnak töltés/hidrodinamikuss-térfogatuknak megfelelően egy általában 25-100 μm belső átmérőjű kapillárisban. Az elektroforézis technikáját Arne Tiselius, svéd biokémikus alkalmazta elsőként 1937-ben, melyért 1948-ban Kémiai Nobel-díjat kapott szérums-fehérjéken elektroforézissel végzett kutatásaiért. A kapilláris használatát először azért vezették be, hogy a nagyobb átmérőjű csövekben végzett elektroforézis során kialakuló hőszabályozási problémát, valamint a csúcsok szétválásának mértékét (felbontás) javítsák. A modern elválasztástechnikai módszer kialakulása az 1970-es években gyorsult fel Hjerten munkájának eredményeként, aki 3 mm átmérőjű kapilláris használt kísérleteihez. Mikkers és munkatársai 1979-ben 200 μm -re csökkentették a kapilláris átmérőjét. Jorgenson és Lukacs 100 μm -nél kisebb (75 μm) üvegapillárisai jelentették a modern, nagy teljesítményű CE kezdetét. Az első CE készülékek 1989-től vannak kereskedelmi forgalomban. Napjainkban a kapilláris elektroforézis az egyik legdinamikusabban működő analitikai módszer, melynek legnagyobb előnyei, hogy kis mintamennyiséget igényel (nl) és viszonylag könnyen automatizálható (Sciex, Agilent, stb.). Alkalmazásainak köre rendkívül széles: királis vegyületek, peszticidek, szerves ionok, szerves savak, vitaminok, aminosavak, fehérjék, szénhidrátok, oligonukleotidok, DNS sőt egész sejtek ill. vírusok elválaszthatók és azonosíthatók vele. A kapilláris elektroforézis lézer indukált fluorescent detektálással különösen hatékony eszköznek bizonyult a fluoreszcensen jelölt glikánok elválasztására és azonosítására [66]. A fentebb említett előnyök mellett a CE készülék felépítése igen egyszerű (2. ábra). A fő komponensek: mintatartó edények, puffertartó edények, elválasztó kapilláris, elektródok, nagyfeszültségű tápegység, detektor és a vezérlésre valamint az adatok tárolására, megjelenítésére szolgáló számítógép. Végezhetünk töltet nélküli vagy töltött kapillárisban is szeparálást. A CE legfontosabb altípusai: a cukrok elválasztásához leggyakrabban használt kapilláris zónaelektroforézis (CZE), mely a minta komponenseket hidrodinamikai térfogat/töltés arányuk alapján választja el; a kapilláris gélelektroforézis (CGE), mely méret alapján választja el az anyagokat; a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC), melynél az elválasztás alapját a micellákkal történő hidrofób vagy ionos kölcsönhatás adja; a kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF), mely az izoelektromos pont alapján választ el; valamint a kapilláris izotachoforézis (CITP), mely esetén az elválasztás alapja, hogy a mintát egy, a minta

komponenseinél kisebb mozgékonyaságú ill. a minta komponenseinél nagyobb mozgékonyaságú elektrolit közé injektáljuk.



2. ábra: A kapilláris elektroforézis készülék felépítése

A mérés során az előzőleg géllel/pufferrel feltöltött 30-100 cm-es kapilláris végei az elválasztó puffer oldatokba merülnek. A mérésre szánt minta bejuttatása (injektálás) a kapillárisba általában a detektortól távolabb eső kapillárisvégnél történik mintatartóba való áthelyezéssel nyomás, elektromos tér vagy vákuum alkalmazásával. A puffertartó edénybe való visszahelyezés után általában néhány száz V/cm nagyságú elektromos térerősséget alkalmazva a mintakomponensek az elektromos térben töltés/hidrodinamikusan függvényében vándorolni kezdenek. A kapilláris zóna elektroforézis (CZE) esetében a hidrodinamikusan töltés arányára szuperponálódik az elektroosmotikus áramlás sebessége. Az elektroosmotikus áramlás (EOF, electroosmotic flow) minden olyan esetben tapasztalható, ahol töltött felülettel találkozó folyadékot feszültség alá helyezünk és a kapillárisban nincs antikonvektív töltet, pl. gél. Az EOF nagyságát befolyásolja a kapilláris belső átmérője és a benne lévő oldat jellege (pH, ionerősség). Amennyiben jelen van, az EOF stabilitása eszenciális a migrációs idők vagyis az elektroferogram csúcsainak reprodukálhatósága érdekében. Az általam végzett mérések során az EOF mértéke és ennek megfelelően hatása is a pufferoldat pH-ja miatt, valamint az antikonvektív gél jelenléte miatt elhanyagolható volt. A kis injektálási- (1-10 nl) és detektortérfogat (1-5 nl) biztosította az elválasztás magas hatékonyságát. A minta kapillárison való gyors áthaladása miatt csökkent a kapilláris falának adszorbeáló hatása. CZE esetén az injektált minta komponensei a kapillárisra kapcsolt elektromos

potenciálkülönbség hatására a töltésükkel ellentétes töltésű elektród felé vándorolnak. Megfelelő pH megválasztásával elérhető, hogy a minta összes komponense egy irányba vándoroljon töltésétől függetlenül az EOF hatására.

A detektálás általában a kapillárisnak az injektálással ellentétes végéhez közelebb történik. Erre a célra a kapillárisról néhány mm hosszon eltávolítják a külső poliimid védőréteget, majd az így kapott átlátszó ablak optikai detektorcellaként funkcionál. Leggyakrabban az UV vagy fluoreszcens detektálás használatos, de más típusú detektálási módokra is van lehetőség, úgymint elektrokémiai vagy tömegspektrometriás detektorok. A megfelelő detektor kiválasztásánál figyelembe kell venni a szükséges érzékenységet, a kimutatási határt, az alacsony zajszintet, az elegendően nagy lineáris tartományt és a kis válaszüjt. A detektor által előállított jel a számítógép segítségével feldolgozásra kerül, ahol egy elektroferogramot kapunk melynek csúcsaihoz az elválasztott molekulák hozzárendelhetők [67].

A glikán mikroarray módszer, melyben a glikánok egy aktivált felszínhez kötve kölcsönhatásba lépnek a vizsgált mintával, legyen az sejtlizátum, fehérje, különböző patogének, stb, jól hasznosítható eszköz a tudományterület szempontjából [68]. A DNS/RNS és a fehérje mikroarray technológiák fejlődése lehetővé tette a fehérje-glikán kölcsönhatások olyan vizsgálatát, mely képes egyidejűleg minták százait vagy akár ezreit analizálni. A mikroarray módszer használható a potenciális glikánkötő fehérjék kötési specifikációinak tesztelésére is. A fehérjék és glikánok közötti kölcsönhatás detektálására fluoreszcens módszereket alkalmaznak lektinek, antitestek vírusok és receptorok használatával [69]. A mikroarray technika lehetővé teszi nagyszámú minta egyidőben történő elemzését és a megfelelő képalkotó módszer használatával a jövőben akár egyénre szabott, a mindennapi rutinban használatos diagnosztikai eljárás létrejöttét is [70-72].

A glikán mikroarray-ek új generációja oligoszacharid struktúra-specifikus lektinek használata a cukrok élettani szerepének vizsgálatára. A lektinek olyan szénhidrátfelismerő fehérjék, melyek specifikus cukorkötő helyekkel rendelkeznek. Megkülönböztetünk állati és növényi lektinek. Számos növényi lektin glikán ligandumok felismerésére alkalmas [73]. Ez utóbbiakat széles körben alkalmazzák speciális cukorstruktúrák azonosítására és jellemzésére. A 2. táblázat a leggyakrabban alkalmazott lektinek specificitását mutatja.

Cukorstruktúra	Lektin
Fukóz	AAL, LTL, UEA I
Galaktóz	ACL, ECL, EEL, GSL I, GSL I-B ₄ , Jacalin, MAL I, PNA, RCA I, RCA II, SBA
Glükóz	Con A, LCA, PSA
Mannóz	Con A, GNL, HHL, LCA, NPA, PSA
N- acetilgalaktózamin	BPL, DBA, GSL I, MPL, PTL, RCA I, RCA II, SJA, SBA, VVA, WFA
N-acetilglükózamin	DSL, GSL II, LEL, STL, WGA
Sziálsav	MAL II, SNA
Komplex struktúrák	PHA-E, PHA-L

2. táblázat: Lektinek specifikációja. AAL: Aleuria Aurantia Lectin; LTL: Lotus Tetragonolobus Lectin; UEA I: Ulex Europaeus Agglutinin I; ACL: Amaranthus Caudatus Lectin; ECL: Erythrina Cristagalli Lectin; EEL: Euonymus Europaeus Lectin; GSL I: Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I; MAL I: Maackia Amurensis Lectin I; PNA: Peanut Agglutinin; RCA I: Ricinus Communis Agglutinin I; RCA II: Ricinus Communis Agglutinin II; SBA: Soybean Agglutinin; ConA: Concanavalin A; LCA: Lens Culinaris Agglutinin; PSA: Pisum Sativum Agglutinin; GNL: Galanthus Nivalis Lectin; HHL: Hippeastrum Hybrid Lectin; NPL: Narcissus Pseudonarcissus Lectin; BPL: Bauhinia Purpurea Lectin; DBA: Dolichos Biflorus Agglutinin; MPL: Maclura Pomifera Lectin; PTL: Psophocarpus Tetragonolobus Lectin; SJA: Sophora Japonica Agglutinin; VVA: Vicia Villosa Lectin; WFA: Wisteria Floribunda Lectin; DSL: Datura Stramonium Lectin; GSL II: Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin II; LEL: Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin; STL: Solanum Tuberosum (Potato) Lectin; WGA: Wheat Germ Agglutinin; MAL II: Maackia Amurensis Lectin II; SNA: Sambucus Nigra Lectin; PHA-E: Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin; PHA-L: Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin <https://vectorlabs.com/> [74].

Számos lehetőség létezik a glikánok elválasztására és azonosítására. A glikán profil feltérképezéséhez általában el kell távolítani a glikoproteinek polipeptid részét, majd az így szabaddá tett cukorrészt valamilyen UV aktív vagy fluorofór jelöléssel kell ellátni. A legegyszerűbb módszer a spektrofotometriás vizsgálat, mely esetben kolorimetriás méréssel meghatározható pl. a hexózok teljes mennyisége a mintában. A cukrok kvantitatív mérésére gáz- és folyadékkromatográfiás (GLC) módszereket is

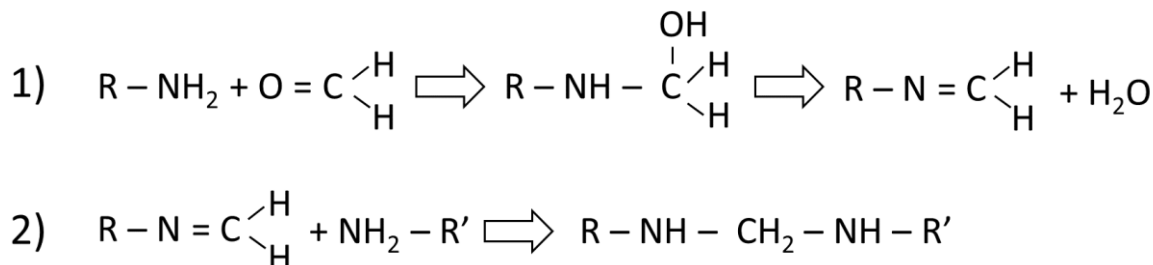
alkalmazhatunk gyakran tömegspektrometriával (MS) kombinálva. Ezen technikákhoz a cukrok kémiai módosítása szükséges hidroxil- vagy aldehid-csoportjukon. Tömegspektrometriás vizsgálatok alkalmazhatók intakt glikokonjugátumokra ill. azok fragmenseire is ionizálás után. A gyors atom bombázásos ionizációs tömegspektrometria (FAB-MS) fontos szerepet játszott a glikánok strukturális elemzésében, azonban ezt mára felváltotta az elektropray ionizáció (ESI) és a mátrix asszisztált lézer deszorpció és ionizáció (MALDI). A cukor egységek derivatizálása a magas nyomású folyadékkromatográfia (HPLC) esetén is szükséges, viszont a nagy teljesítményű anioncserélő kromatográfia pulzáló amperometriás detektálással (HPAEC-PAD) nem igényel módosítást. A fentebb említett MS módszerek nem minden esetben alkalmasak a kötési és a pozicionális izomerek elválasztására. A kötések anomerkonfigurációjának meghatározására mágneses magrezonancia spektrometriát (NMR) használnak. Teljes strukturális meghatározást a különböző kétdimenziós NMR módszerek, mint a korrelációs spektroszkópia (COZY) és a teljes korrelációs spektroszkópia (TOCSY), kombinációjával lehet elérni [6].

2.2 Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminták

2.2.1 Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminták készítése és felhasználása

A formaldehidet elsőként az orosz kémikus Alexander M. Butlerov írta le 1859-ben, de a német Ferdinand Blum használta először szövetek preparálására/tartósítására 1893-ban és erre vonatkozó kutatásait 1910-ben foglalta össze [75]. Az ő megfigyelései alapján más szövettannal foglalkozó kutatók is megerősítették, hogy a formalin fixálóként használva megóvjá a szöveteket a zsugorodástól és degradálódástól. Mivel a hagyományos és széles körben használt szövettani metszetek festésére alkalmazott vegyületek, mint a hematoxilin és az eozin, kompatibilisek a formalin fixálással, a technika a szövetfixálás terén nagyon elterjedté vált a patológiában. További előnye a módszernek, hogy a szöveti struktúrát és a sejthalakot is megfelelően stabilizálja. Érdekes azonban, hogy annak ellenére, hogy a formalin fixálás a világon mindenhol elterjedt, a fixálási időtartam, az inkubálás hőmérséklete vagy az oldat pH-ja laboronként változik [76].

A fixálási folyamat során a formalin reakcióba lép a fehérjék lizin, arginin, cisztein, glutamin, triptofán, hisztidin, aszparagin vagy tirozin aminosavaival és metilén hidakat hoz létre a fehérjék vagy egységeik között [77] (3. ábra).

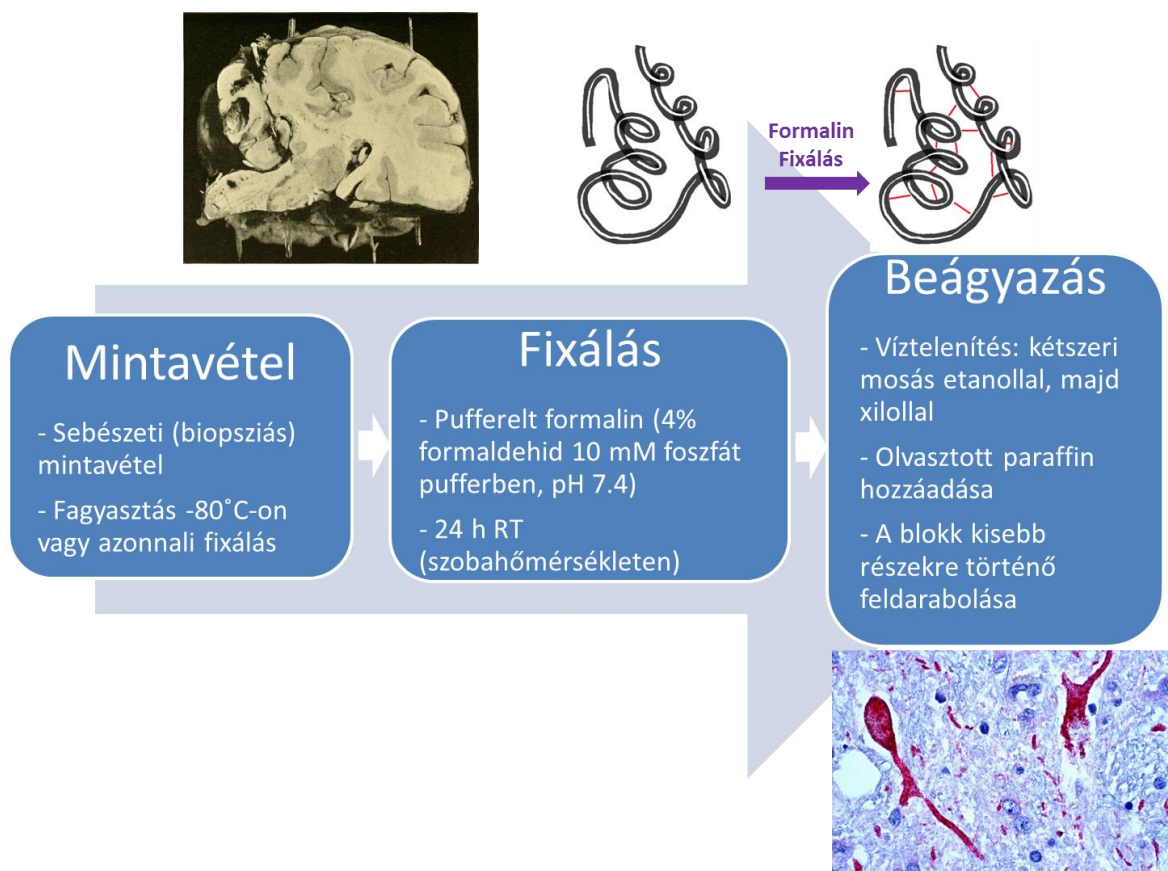


3. ábra: A formaldehid és a fehérjék között lejátszódó reakció [78]

A formaldehiddel lejátszódó reakció két lépésből áll (3. ábra). Az első, amikor a fehérjemolekulán belül a primer amin-csoport (nukleofil-csoport; R) és az aldehid létrehozza a hidroximetil formát. Vízkilépés mellett Schiff bázis keletkezik a metilol-csoport reverzibilis reakciója által. A második lépésben, a stabilizáció során más fehérjék is bekapcsolódnak a reakcióba és amid formán keresztül metilén-diamin hidakat hoznak létre.

A fixáló oldatok általában 37-40 m/m %-os formaldehid vizes oldatai. A szöveteket 24-48 órán át fixálják 10 V/V %-os formalin oldattal, mely 3,7-4 % formaldehidet tartalmaz foszfát-pufferben (pH: 7.4). A fixálásnak ezen módja lehetővé teszi, hogy klinikai mintákat változatlan minőségben akár évtizedekig is tároljanak. Paraffinba ágyazással kombinálva (ahogy később kifejtem) a keletkező formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintákat használják a szövettani és patológiai laborok. A 4. ábra mutatja a szövetek fixálásának főbb lépéseit. Az első lépés a mintavétel, mely általában valamilyen sebészeti beavatkozással történik, ezután vagy fagyasztják vagy azonnal fixálják a mintát. A fixálás 10%-os pufferelt formalin oldatban történik 24-48 órán át. A mintákat feldarabolják, hogy a formalin minél jobban tudjon a szövet belsejébe penetrálni. A beágyazáshoz először víztelenítik a mintát kétszeri etanolos, majd xilolos mosással. A víztelenített mintához olvasztott paraffint adnak a minta inkubálása közben, majd szobahőmérsékleten hagyják megszilárdulni. A kész blokkot ezután kisebb részekre vágják a további vizsgálatokhoz. Az FFPE minták előnye, hogy szobahőmérsékleten hosszú ideig tárolhatók, ez sokkal egyszerűbb, mint a friss/fagyasztott minták tárolása, melyekhez -80°C-os hűtőkapacitás vagy folyékony nitrogén szükséges. Az FFPE minták

klinikai-patológiai jelentősége, hogy a beteg szövetminták archiválásával lehetőséget biztosít a kutatóknak, hogy kihasználva a rendelkezésre álló hatalmas mintakollekciót, biomarker kutatást végezzenek a már diagnosztizált betegek mintáiból [77].



4. ábra: Formalin fixálás és paraffinba ágyazás folyamata

Az FFPE metszeteket festési eljárás után eddig különböző diagnosztikai vizsgálatokhoz például az osztódó sejtek számának meghatározásához vagy a betegség stádiumainak megállapításához használták, melyek az onkológiai szakvéleményhez és a kezelési javaslatához szükségesek. A klinikai gyakorlatban a formalin fixálást a műtétek során eltávolított és kötelezően elraktározott natív minták hosszú távú tartósítására alkalmazzák [79].

A formalin fixálást gyakran más, kiegészítő eljárásokkal együtt alkalmazzák, hogy elkerüljék a formaldehid olyan nem kívánt hatását, mint például a nukleinsavak degradálódása. Kiegészítő eljárás lehet a mikrohullámú (300 MHz és 300 GHz közötti frekvencián) besugárzás, az alkoholos (metanolos vagy etanolos) előkezelés vagy a fixáló anyagok keverékével történő kezelés, például a HOPE és a Methacarn oldatok. Néhány

esetben alternatív fixálókkal helyettesítik a formaldehydet. A leggyakrabban alkalmazott fixáló anyagokat és eljárásokat a 3. táblázatban foglalom össze.

Leírásának éve	Szerző	Fixáló	A reakció típusa	Cél extraktum	Referencia
1893	Blum	Formalin	Keresztkötő	Fehérje, DNS	[75]
1908	Golgi	Etanol/Metanol	Nem keresztkötő	DNS, lipid	[80]
1963	Sabatini	Glutáraldehyd	Keresztkötő	Nukleinsav/ amino-csoport	[81]
1968	Puchtler	Carnoy fixáló	Nem keresztkötő	RNS	[82]
1970	Puchtler	Methacarn	Nem keresztkötő	RNS	[83]
1970	Mayers	Mikrohullámú besugárzás (MW)	Stabilizáló	Fehérje	[84]
1992	Sato	AmeX	Nem keresztkötő + tartósító	RNS, DNS	[85]
1994	Boon	Formalin + MW	Keresztkötő + stabilizáló	Fehérje	[86]
2000	Sung	Genipin	Keresztkötő	Aminosav	[87]
2001	Olert	HOPE	Nem keresztkötő	DNS,RNS	[88]

3. táblázat: A leggyakrabban alkalmazott szövetfixáló anyagok és eljárások

A patológiai intézetek, osztályok, kórházi laboratóriumok és intézetek rutinszerűen hoznak létre nagy mennyiségű FFPE mintát, mely óriási kihasználatlan forrást jelent a hosszú távú követés szempontjából, továbbá a transzlációs klinikai kutatásnak, különösen a modern omikák eszközeivel. A genetika és a proteomika mellett a glikomikának, a lipidomikának és a metabolomikának is fontos mintaforrást jelentenek a kórházakban tárolt FFPE metszetek.

2.2.2 Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták analízise

2.2.2.1 Genomika

A genetikai vizsgálatok szempontjából a formalin fixálás paraméterei, időtartama és hőmérséklete, kritikusak lehetnek a DNS és RNS integritásának meghatározásakor [89]. Az FFPE blokkokból izolált DNS fragmentumok, még ha igen kisméretűek is (~250 bp), jól használhatóak PCR amplifikációra [90]. Továbbá a DNS fragmentumok alkalmazhatók szekvencia specifikus oligonukleotid (SSO) próbákkal való analízishez PCR módszerrel kombinálva. A DNS nagyon stabil makromolekulának számít, mégis gyakran veszít a minőségéből, ami az olyan nagy áteresztőképességű analitikai módszereknél, mint a mikroarray vagy a szekvenálás hátrányt jelenthet. A szövetekből való kinyerés javításának érdekében számos módszert fejlesztettek ki például rázatták etanolos mosás közben, Proteináz K emésztést végeztek, valamint fenol, kloroform és izoamil alkohol elegyével tisztították ún. Phase Lock Gel segítségével [91].

Az FFPE mintákban lévő RNS vélhetően az idő múlásával kisebb fragmentumokra esik szét a friss/fagyasztott szövetmintákkal ellentétben, viszont így is sikeresen alkalmazható génexpressziós analízisekhez [92], mivel egy gén expressziós profiljának feltérképezéséhez csak kis mRNS fragmentumokra van szükség, [93]. Az RNS jelentős mértékben degradálódhat vagy keresztköthet a fehérjékkel a formalinos fixálás során. Ezen kívül az RNS gyakran kovalensen is módosul a formaldehid hatására monometilol-csoportokon keresztül. Ez nehézséget jelent az izolálásnál, amplifikációnál és a mennyiségi meghatározásnál is. Ennek kiküszöbölésére Specht és munkatársai olyan technikát mutattak be, melyben kombinálták az LCM (lézeres mikrokimetszés) és a QRT-PCR (mennyiségi valós idejű polimeráz láncreakció) módszereket valamint proteináz K enzimet használtak az RNS emésztéséhez. Ezzel lehetővé tették a kvantitatív génexpressziós analízist fixált szövetekből [94].

2.2.2.2 Proteomika

Az FFPE minták proteomikai vizsgálatával potenciális biomarkerek találhatók, melyek felhasználhatóak terápiás eljárások nyomon követésénél [95-99]. Azonban ezt a lehetőséget még nem tudták kiaknázni az FFPE kémia ismeretlen területei, az antigén visszanyerés hiányosságai, valamint a korlátozott mintavételi eljárások miatt, különösen azért, mert a formaldehiddel történő fixálás a fehérjék szerkezetét több szinten is módosítja. Aminosav módosulásokat okoz beleértve a lizint, arginint, szerint tirozint,

aszparagint, hisztidint és a glutamint melyeknél a keresztkötés valósul meg metilén hidak formájában. Azonban a keresztkötés létrejöhet az aminometilol csoportok és fenol vagy indol imidazol oldalláncok között is Mannich-reakció által (a lazított hidrogént tartalmazó vegyületek aldehidek vagy aminok jelenlétében aminoalkilezési reakcióban ún. Mannich-bázissá alakulnak) [100]. A másodlagos szerkezetben a keresztkötés módosítja az alfa-hélix és béta-redő formákat, amivel változásokat okozhat a harmadlagos szerkezetben is azzal, hogy több fehérjét összekapcsol. A fizikai-kémiai változások megnehezíthetik vagy gátolhatják a fehérjék azonosítását például MS analízis során [77].

Néhány, a közelmúltban közölt kutatás arra irányult, hogy mekkora hatékonysággal lehet fehérjéket azonosítani hosszú ideig tárolt FFPE szövetmintákból. Azt találták, hogy a kisebb gyakoriságú fehérjéket nehezebb volt kinyerni a 10 évnél régebbi szövetmintákból [101]. Magdeldin és munkatársai az archiválás időtartamát vizsgálták a proteomra nézve 9-21 éves FFPE mintákon. Azt tapasztalták, hogy a 21 éves mintákból nehezebb volt a fehérjéket azonosítani, mint a 9 évesekből [77].

Az FFPE blokkokból izolált fehérjék sikeresen alkalmazhatók Western-blotting analízisre, fordított fázisú fehérje array-re és SELDI (felület erősített lézer deszorpció/ionizáció - surface-enhanced laser desorption/ionization) tömegspektrometriára [102]. A fordított fázisú fehérje array specifikus elsődleges antitesteket vagy fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesteket használ az analízishez, a Western-blottinghoz hasonlóan, valamint a különböző fehérjék szimultán vizsgálhatók a relatív fluoreszcens értékük összehasonlításával [103]. A teljes proteomikai analízis során gyakran kétértelmű eredményeket kapni, mivel az FFPE mintákból azonosított fehérjék nem egyeznek meg a meglévő adatbázisokban (pl.: EBI – European Bioinformatics Institute, Proteome Analysis, InterPro és CluStr) szereplőkkel [104]. A módosítások és a térhálósodás mértékétől függően a peptidek azonosításának lehetősége magas, közepes vagy alacsony kategóriába sorolható. Az első kategóriába elsősorban azok a nem módosított molekulák tartoznak, melyek nagy valószínűséggel sikeresen azonosíthatók és jellemzően megfelelnek az adott fehérje adatbázisban szereplőknek. A második kategóriába tartozók nagy valószínűséggel azonosíthatók és olyan módosított, de nem keresztkötött fehérjék, melyek ismert modifikációkkal rendelkeznek. E csoport azonosítása azon múlik, hogy az adatbázisban mennyi módosításról található adat. Ez viszont megköveteli a fehérje modifikáció pontos ismeretét a formalin fixálás során. Az utolsó csoportba azok a peptidek tartoznak, melyek kiterjedt keresztkötéseket

tartalmaznak, így fizikai-kémiai tulajdonságaik olyan mértékben eltérnek a natív formáktól, hogy nehéz őket azonosítani. A proteomikai analízis pontossága nagyban függ a kinyeréstől, a denaturálástól, az emésztéstől valamint a peptid modifikációk ismeretétől.

Napjainkban rendkívül sokféle eszköz áll a kutatók rendelkezésére a mintavételre és –elemzésre. A MALDI MS képalkotással lehetőség van egy szövetmintából több száz alkotórész elkülönítésére, ez jól illusztrálja a klasszikus és a molekuláris szövettan kapcsolatát [105]. A MALDI képalkotó tömegspektrometria a MALDI-TOF és MALDI FTICR IMS nagy felbontású platformokkal együtt alkalmasak az FFPE minták fehérjéinek analizisére. Spraggins és munkatársai [106] MALDI-TOF technikát alkalmaztak egérből származó agyszövet és cisztás fibrózisos tüdőszövet fehérjéinek vizsgálatára 25 pixel/s adatgyűjtéssel. Ezzel megfigyelték a gazdasejt immunválaszában résztvevő fehérjéket a cisztás fibrózis esetében. Yin kutatócsoportja [107] különböző stádiumban lévő kolorektális karcinóma FFPE szövetmintákat vizsgált tömegspektrometriával. Vizsgálatuk eredményeképpen számszerűsítették az expresszált fehérjéket a rák kialakulása során a korai stádiumtól a IIIC stádiumig. A detektált fehérjék kétharmadát mennyiségileg is meghatározták különböző módszerek segítségével (pl.: iTRAQ - intact proteins using isobaric tag for relative and absolute quantitation) [108].

2.2.2.3 Glikomika

A glikomika egy viszonylag új, de felívelőben lévő ága az omikáknak. Fontosságát az is aláhúzza, hogy a szénhidrátok létfontosságú feladatokat látnak el a biológiai folyamatokban. Szerepet játszanak pl. a sejtosztódásban, sejt-sejt és sejt-extracelluláris folyadék kölcsönhatásokban, a fehérjék lebontásában, a fertőzésben, valamint az immunfolyamatokban. A glikozilációs változások szerepet játszanak a daganatos, kardiovaszkuláris és az autoimmun neurodegeneratív betegségek kialakulásában, valamint az immunrendszer zavaraiiban is [109].

A glikán mikroarray-ekkel kapcsolatban már említettem, hogy az oligoszacharidok élettani szerepének vizsgálatakor gyakran alkalmaznak specifikus lektineket. Ennek a módszernek egy változatát használják hisztokémiai eljárások során, hogy láthatóvá tegyék az FFPE blokkokból származó különböző glikokonjugátumokat. A leggyakrabban alkalmazott lektinek a Concanavalin A (ConA) és az Aleuria Aurantia Lektin (AAL), előbbi az oligomannóz típusú, utóbbi a fukozilált glikánok kimutatására alkalmas [110]. Azonban annak ellenére, hogy a lektin affinitás vizsgálatokkal számos

betegségből származó mintát lehet analizálni, néhány korlátozó tényezőt is meg kell említeni. Az egyik ilyen tényező az, hogy lektinek révén csak minimális információt kaphatunk az epitópokról. Például a ConA kötődhet a belső, nem redukáló terminális α -mannózhoz is [111], így különböző struktúrák is megjelenhetnek az eluátumban. Továbbá a lektinek nem különböztetik meg a glikoprotein alcsoportokat. Az AAL lektinek kötődhetnek mind az N- mind az O-glikoproteinek fukóz egységeihez.

Az MSI (mass spectrometry imaging) előnye, hogy nagy érzékenységgű és specifikus, de nem igényel előzetes ismereteket a glikánokról ellentétben az affinitás-alapú detektálási módszerekkel. Valamint ezzel a módszerrel egyszerre akár több száz struktúrát is azonosítani lehet. Ha pedig kvantitatív vagy félkvantitatív spektrometriás módszerekkel kombináljuk, mennyiségi adatokat is nyerhetünk közvetlenül a szövetmintából [112]. Bár a tömegspektrometriás technikák és az adatok kiértékelésére szolgáló módszerek fejlődése jelentősen megnövelte a glikomikai vizsgálatok sikerességét, a natív glikánok proteinekhez vagy lipidekhez viszonyított kisebb mértékű ionizálhatósága miatt komplex mintákban való tanulmányozásuk meglehetősen bonyolult [113]. Ezért a glikánokat először izolálják a biológiai mintából és kémiai módon módosítják, pl.: permetilációval a tömegspektrométeres analízis előtt [114]. Azonban ennél a módszernél a cukorstruktúrák térszerkezeti információi elvesznek a homogenizálás következtében. Yang és munkatársai [115] bemutatták, hogy a glikoproteinekből kinyert glikánok szilárd fázishoz rögzítve közvetlenül vizsgálhatók voltak tömegspektrometriával. A módszer előnye, hogy a glikánokat nem kellett további tisztításnak alávetni.

A glikomika egyik fő kihívása egy olyan platform kifejlesztése, mellyel lehetőség nyílik a nagy biológiai komplexitással rendelkező minták (pl.: FFPE) cukorprofiljának vizsgálatára. Everest-Dass és Briggs [116] kifejlesztettek egy új MALDI-MSI módszert, mellyel FFPE mintákból szövetspecifikus cukormarkereket mutattak ki. Petefészekből származó daganatos szövetmintát vizsgáltak PGC-LC-ESI-MS/MS és MALDI-MSI technikákkal, hogy a glikánprofilból szerkezeti információhoz jussanak. Az enzimatisz emésztés után 40 N-glikán struktúrát tudtak elkülöníteni a mintából, melyek magas mannóztartalmú, hibrid és komplex (neutrális és szialilált), valamint core fukozilált típusba tartoztak. A glikán struktúrákat a PGC-LC (porous graphitized carbon liquid chromatography) mellett MALDI-MS módszerrel is vizsgálták. A különböző N-glikán szerkezetek előfordulása jellemző volt a petefészekrákos minta egyes régióira: a magas

mannóztartalmú szénhidrátok általában a tumoros területen fordultak elő, míg a komplex vagy a hibrid típusúak gyakoriak voltak a sztrómában. Ezek alapján a tumoros és nem tumoros minták világosan elkülöníthetők egymástól az N-glikán profiljuk alapján [116].

2.2.2.4 Metabolomika

A metabolomika átfogó tudománya a sejtekben található kis molekulatömegű anyagokkal (metabolitokkal) foglalkozik [117]. A molekuláris útvonalak és kölcsönhatások általában a metabolitok analíziséen keresztül tanulmányozhatók [118]. Ezen molekulák biokémiai folyamatok prekursorai vagy közti- vagy végtermékei, így a teljes metabolikus profil információt adhat a sejt állapotáról egy adott időpillanatban. A metabolomika tulajdonképpen az omikák legalsó szintje, mivel kapcsolatban van a genomikával, transzkriptomikával, proteomikával, glikomikával és a lipidomikával is [119]. Azonban a metabolikus profil olyan további tényezőktől függ, mint a daganatos mikrokörnyezet a fixált mintában vagy a gyakran megfigyelt poliklonalitás. Mindazonáltal az intakt szövetminták metabolikus profilozása egyre népszerűbb a klinikai kutatásokban, mivel ezzel képesek potenciálisan új prognosztikai vagy prediktív metabolikus biomarkereket azonosítani, vagy felfedezni a kóros biokémiai aktivitást, melynek célja új terápiás megközelítések azonosítása [120].

Az N-glikánok szintézisekor fontos szerepük van a prekursor metabolitoknak. A glikán prekursor a dolichol-foszfát molekulán szintetizálódik, amely az endoplazmatikus retikulum citoplazmatikus felszínén helyezkedik el [6]. A mannoziltranszferázokkal és glükoziltranszferázokkal katalizált reakció eredményeként $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ jön létre. Ezzel szemben egyes egyszerűbb eukariótáknál (protocisztáknál) a glikán prekursor hossza különböző lehet: például $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (*Acanthamoeba*), $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (*Trypanosoma*), $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (*Toxoplasma*), $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (*Entamoeba*, *Trichomonas*, és *Eimeria*) vagy GlcNAc_2 (*Plasmodium* and *Giardia*). Samuelson és kutatócsoportja arra a megállapításra jutott, hogy a prekursorok különböző hossza az ún. ALG gének másodlagos elvesztése miatt jelenhet meg, melyek azon enzimeket kódolják, amelyek a glikán egységek prekursorhoz való hozzáadásáért felelősek [121].

A többi "omics" területhez hasonlóan a metabolomika nagymértékben kihasználja a rutin orvosi ellátás során szerzett FFPE szövetmintákat, széleskörű elérhetőségük és hosszú távú stabilitásuk miatt a minták alkalmasak metabolomikai vizsgálatokra és

metabolit tartalmuk feltérképezése felgyorsíthatja a klinikailag hasznos metabolomikus biomarkerek felfedezésének sebességét. Kelly és munkatársai [117] voltak az elsők, akik leírták metabolitok analízisét az FFPE mintákból LC/MS-sel, és különbséget tudtak tenni a rosszindulatú és nem rosszindulatú szövetminták között 106 kimutatott metabolit alapján. Richter kutatócsoportja [122] ugyanazt az analitikai megközelítést alkalmazta a szukcinát-fumarát arány meghatározására friss fagyasztott és FFPE mintákban. Azt tapasztalták, hogy a szukcinát-fumarát egyensúly megmutatja, hogy van-e szukcinát dehidrogenáz gén (SDHx) mutáció a mintában vagyis a mintaadó szervezetében. Kutatásaikból kideül, hogy a szukcinát szint nőtt, a fumaráté pedig csökkent tumoros állapotban az SDHx mutációval rendelkező egyéneknél. Wojakowska és csoportja [123] kifejlesztett és validált egy módszert az elsődleges metabolitok FFPE szövetmintákból való kivonására GC/MS technikával. Csaknem 70 vegyületet detektáltak a mintákból, beleértve a glükózt, galaktózt, eritrózt és xilózt.

2.2.2.5 Lipidomika

A lipidomika az élettudományok egyik gyorsan fejlődő ága, mely a lipidek és alkotórészeik leírására jött létre. Mivel a lipidek teszik ki a metabolom egy jelentős részét, a lipidomika tulajdonképpen a metabolomika egy területét képviseli és fő fogalmaiban, valamint módszereiben megegyezik vele [124]. A glikolipidek biomarkerként is funkcionálhatnak bizonyos rákos megbetegedések esetén [125]. Manapság a tömegspektrometria a domináns analitikai technika a glikolipidek vizsgálatának területén és a két leggyakrabban alkalmazott MS alapú megközelítés: 1) a kombinált elválasztási módszerek, mint a GC/MS vagy az LC/MS, melyeket komplex minták elemzésére használnak; 2) az ún. shotgun módszer, mellyel a mintát közvetlenül a tömegspektrométerbe juttatják. Az LC/MS ideális technikának mondható, mivel az izomerek nem választhatók el kizárólag tömegspektrométerrel. Li és kutatócsoportja úgy találta, hogy tüdőrák esetén a glikoziláció számos módon megváltozik, többek között a glikolipidek nagyobb mértékben szialiláltak, mint egészséges szervezetben. A minták glikolipid tartalmát relatív ioneloszlással határozták meg UP-HILIC oszlop segítségével. A betegeknél a vizsgált lipidek nagyobb mennyiségben fordultak elő a tumoros szövetben, mint az épben [125]. A legújabb biokémiai vizsgálatok során FFPE mintákat elemeztek deparaffinizáló és lizáló eljárásokat követően. Gaudin és munkatársai [126] azt mérték fel, mennyire megbízhatóan alkalmazhatóak az emberi agyminták lipidomikai analízishez. Vizsgálatuk során kimutatták, hogy teljes biomolekulák izolálása is

megoldható a fixált szövetmintákból. Számos koszorúér-betegség a lipid anyagcsere rendellenességeire vezethető vissza. Fujiwaki [127] kutatásaiból kiderül, hogy a szfingolipidek és a glikolipidek aránya eltér a Gaucher betegség (nagyon ritka lipidraktározási betegség, mely recesszíve öröklődik) és a Fabry betegség (alfa-galaktozidáz hiánya vagy csökkent szintje, ami a ceramid felhalmozódását okozza, mely károsítja a szívet, a veséket és az agyat) között. Taketomi és kutatócsoportja [128] már korábban leírta, hogy MALDI-val megfelelően vizsgálhatók az emberi agyból származó glikoszfingolipidek. Arafah és munkatársai [129] pedig kifejlesztettek egy új módszert a lipidek közvetlen analízisére szövetekből MALDI képalkotással. Az egyes lipidek jelenléte utalhat bizonyos betegségekre, így azonosításuk hasznos lehet a biomarker kutatásban.

Az első nagy kihívás az omikák számára az FFPE szövetmintákkal kapcsolatban az volt, hogy speciális protokollokat dolgozzanak ki a szövetminta archiválására és vizsgálatára. A következő kihívás az lesz, hogy feltárjuk az FFPE minták biológiai információit, és naponta használjuk őket a rutin klinikai gyakorlatban, mivel a fixált szövetminták felhasználhatók a tumoros betegségek korai felismerésében.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Reagensok

A későbbiekben leírt glikoproteinek, a humán szérum valamint az egérből származó szövetminták fixálásához pufferelt formalint használtam, mely 3,7% formaldehidet tartalmazott 10 mM foszfát pufferben (pH 7,4), valamint paraffint (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) a beágyazáshoz. A fehérjekinyeréshez alkalmazott RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) puffer, xilol és etanol, a standardként használt maltóz és maltooligoszacharid létra, valamint a nátrium-cianoborohidrid (1M THF-ben) és az acetonitril a Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) cégtől került beszerzésre. Az enzimek: PNGase F (peptid N-glikozidáz F enzim), *Arthrobacter ureafaciens* szialidáz (ABS), borjú vese fukozidáz (BKF), kardbab galaktozidáz (JBG), kávébab α -galaktozidáz és kardbab hexózaminidáz (JBH) a ProZyme (Hayward, CA, Egyesült Államok) cégtől származtak. A fluorescens jelöléshez alkalmazott 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonát (APTS) festéket és a bracketing standardként használt APTS jelölt maltopentadekaózt a SCIEX (Brea, Kalifornia, Egyesült Államok) cégtől szereztük be.

3.2 Minták

A glikoprotein standardok: immunglobulin G ($\geq 95\%$ tisztaságú), fetuin ($\geq 99\%$ tisztaságú) és ribonukleáz B ($\geq 80\%$ tisztaságú), a humán szérum a Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) cégtől származtak. Az SCID hím egereket az Országos Onkológiai Intézet (Budapest, Magyarország) bocsátotta rendelkezésemre. A módszerek megfeleltek az Országos Etikai Bizottság által elfogadott állatkísérletekre vonatkozó irányelveknek (engedélyszám: 22.1/722/3/2010).

3.3 Módszerek

3.3.1 Fixálás formalinnal és beágyazás paraffinba

A fehérje standardok előkészítése során minden esetben 10 mg/ml-es törzsoldatból indultam ki a vizsgálatoknál. Ez 10 μ l mintamennyiség esetén 100 μ g fehérjét jelentett.

A humán szérumnál 10 μ l folyadékot használtam. A mintákat tízszeres mennyiségű pufferelt formalinnal legalább 24 órán keresztül fixáltam szobahőmérsékleten. A víztelenítést beszárítással végeztem, majd olvasztott paraffint adtam hozzá és hagytam, hogy megszilárduljon. A kontroll mintákat nem vettem alá formalinos kezelésnek. Az egérből származó szöveteket az operáció után 40 mg-os részekre aliquótolták, majd a víztelenítéshez először kétszer 96%-os etanollal mostam 20 percen át szobahőmérsékleten, majd centrifugáltam 5000 x g fordulaton 10 percig, ezután kétszeri mosás következett xilollal (20 perc, szobahőmérséklet) és centrifugálás 5000 x g fordulaton 10 percig. A víz eltávolítása után olvasztott paraffin hozzáadása következett az előzőekben leírt módon.

3.3.2 Deparaffinizálás és mintaelőkészítés

A paraffin eltávolításához az FFPE mintákat (5 mikronos szeletek, összesen 40 mg) kétszer mostam xilollal szobahőmérsékleten 20 percig és centrifugáltam 5000 $\times$ g fordulaton 10 percig. Ezt követte az etanolos mosás szintén kétszer 20 percig majd a centrifugálás 5000 $\times$ g fordulaton 10 percen át. A glikoproteinek kinyeréséhez minden mintát eldolgoztam egy 1 mL-es szövethomogenizátorral (VWR, Radnor, PA, Egyesült Államok) és 100 μ L RIPA pufferben (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% nátrium-dezoxikolat, 0.1% SDS, pH 7.6) feloldottam majd 10 μ L 50 mM DTT (ditiotreitol) oldatot adtam hozzá. A reakcióelegyet először 100°C-on 20 percig, majd 65°C-on 60 percig inkubáltam a fehérjék kinyerése érdekében. A következő lépésben 10 μ L 50 mM jodoacetamidot adtam hozzá és a minta 37°C-on 30 percig sötétben inkubálódott, hogy a denaturálással kialakított szulfhidril csoportok alkilálódjanak. A puffercseréhez 10 kDa spinfiltereket (VWR, Radnor, PA, Egyesült Államok) használtam 5000 $\times$ g fordulaton 10 percig. A mosást kétszer megismételtem vízzel mielőtt a glikánok kinyeréséhez használható 1 μ L endoglikozidáz enzimet, PNGase F Ultra enzimet (2.5 mU, Prozyme, Hayward, CA, Egyesült Államok) és a reakcióhoz szükséges 49 μ L 20 mM NaHCO₃ puffert (pH 7.0) hozzáadtam a filteren és egy órán át inkubáltam 50°C-on. A fehérjéről lehasított N-glikánokat centrifugálással gyűjtöttem és vittem vizes oldatba 5000 $\times$ g fordulatszámra 10 perc alatt majd beszárítottam. Fluoreszens jelöléshez 6 μ L 20 mM APTS festéket alkalmaztam 2 μ L 1 M NaCNBH₃ (THF-ben) redukálószerrel, melyeket a száraz mintához adtam és inkubáltam egész éjszakán át (12-14 óra) 37°C-on. A jelölt mintákat mágneses gyönggyel tisztítottam (CleanSeq, Beckman Coulter,

Indianapolis, IN, Egyesült Államok) a felesleges festékmennyiség eltávolításához. A mintához acetonitrilt adtam, hogy elérjem az oldatban a 87,5%-os végkoncentrációt, ami a cukrok gyöngyhöz kötéséhez az ideális koncentráció. A mosások után vízzel eluáltam a glikánokat, amiket vagy azonnal felhasználtam a kapilláris elektroforetikus analízishez, vagy -20°C-on tároltam a későbbi méréshez.

3.3.3 Glikánok szekvenálása

Az oligoszacharidok pontos, strukturális meghatározásához szekvenálásra van szükség, ami csak a láncvégekről kiindulva lehetséges a struktúrák enzimatisz emésztése után, a felépítésre ezek alapján tudunk következtetni. A módszerhez a monoszacharidokra ill. a kötésekre 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 $\alpha(1-2,3,4,6)$ fukózok; kardbab (*Canavalia ensiformis*) galaktozidáz (JBG) a $\beta(1-4,6)$ kötött galaktózok; kávébab (*Coffea arabica*) α -galaktozidáz az $\alpha(1-3,4,6)$ galaktóz egységek valamint kardbab hexóaminidáz (JBH) a $\beta(1-2,3,4,6)$ kötéssel rendelkező N-acetilglükózamin lehasításához (mindegyik 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 β -galaktozidázt, a negyedikhez szialidázt, fukozidázt, β -galaktozidázt és α -galaktozidázt és végül az ötödikhez szialidázt, fukozidázt, β - és α -galaktozidázt valamint hexóaminidázt adtam. Az APTS-jelölt minták szimultán emésztődtek az enzim elegyekkel 37°C-on egy éjszakán át 50 mM ammonium-acetát pufferben (pH 5.5). A reakcióelegyeket másnap beszárítottam (speedvac), majd vízben visszavéve kapilláris elektroforézis készülékkel analizáltam.

3.3.4 Egérből származó szövetminták glikánprofil-változásának vizsgálata a halál beállta után az idő függvényében

A kísérlet során egér agy ill. tüdő minták totál glikán profilját vizsgáltam 3-3 egérben. Az egerek halála után (cervicalis dislocatio) az agyat és a tüdőt eltávolítottuk. Az első mintát 3 egyenlő részre osztottam a párhuzamos vizsgálatok elvégzése miatt, majd elvégeztem a fehérjekinyerést és az N-glikánok mintaelőkészítését a 3.3.2 fejezetben leírtak szerint.

A második minta analízisét egy órával a halál beállta után kezdtem el, a harmadikét pedig két órával később. A mintákat a vizsgálat kezdetéig szobahőmérsékleten tároltam, a glikánok kinyerése pedig minden esetben azonos módon történt.

3.4 Készülékek

3.4.1 CE-LIF

A elválasztásokhoz PA800 Plus (SCIEX, Brea, CA, Egyesült Államok) kapilláris elektroforézis rendszert használtam lézer indukált fluoreszcens detektálással. A gerjesztési hullámhosszt (488nm) egy félvezető alapú lézer adta, az emittáló hullámhossztartományt pedig egy 520nm-es sávszűrő biztosította a PMT detektor (fotoelektronsokszorozó) előtt. N-glikánok elválasztására szolgáló (NCHO) kapillárist használtam (effektív hossza: 50 cm, teljes hossza: 60 cm, belső átmérője: 50 μ m) N-glikán elválasztó gél rendszerrel (NCHO gel buffer system) töltve (mindkettő a SCIEX gyártótól). Az elválasztás fordított polaritással (a katód volt az injektálási oldalon) 30 kV-on történt. A mintákat nyomással injektáltam: 1 psi, 5 s.

3.5 Az adatok kiértékelése

Minden mintával együtt injektáltam APTS-jelölt nyitó és záró standardokat (maltóz és maltopentadekaóz). A cukorstruktúrák hozzárendelhetők kapilláris elektroforetikus elválasztással kapott elektroferogramok csúcsaihoz a programba épített adatbázis segítségével. A maltooligoszacharid létrához viszonyított relatív migrációs időkből a csúcsokhoz tartozó GU (glükóz egység) értékeket GUcal szoftver (www.GUcal.hu) [130] segítségével számoltam ki ($\pm 0.05 - 0.1$ GU pontossággal), az eredmények a szoftverbe épített valamint a <https://glycobase.nibrt.ie/> adatbázisokkal lettek összevetve.

4. Eredmények

4.1 A formalin fixálás cukorprofilra gyakorolt hatásának vizsgálata

A formalin fixálás paraffinba ágyazással kombinálva mára a legelterjedtebb szövet tartósítási forma. Kutatásom végső célja, hogy ez a nagyszámú minta a glikomikai kutatások számára is hasznosíthatóvá váljon. Ehhez elsőként azt kellett bebizonyítanom, hogy a formalin fixálás nem változtatja meg a minta N-glikánok szerkezetét, valamint profilját. A kísérleteket standard glikoproteineken: immunglobulin G-n, fetuinon, Ribonukleáz B-n, továbbá humán szérumon majd egérből származó tumoros szöveten végeztem.

4.1.1 Standard glikoproteinek

A standard glikoproteinek azért képezhették a kutatásom alapját, mert N-glikán struktúráik ismertek és CE-LIF módszerrel történő elválasztásuk is megoldott. Az előzőekben felsorolt glikoproteinek az N-glikoziláció fontos alcsoportjait képviselik: főleg neutrális, szialilált ill. magas mannóztartalmú cukorstruktúrákat tartalmaznak.

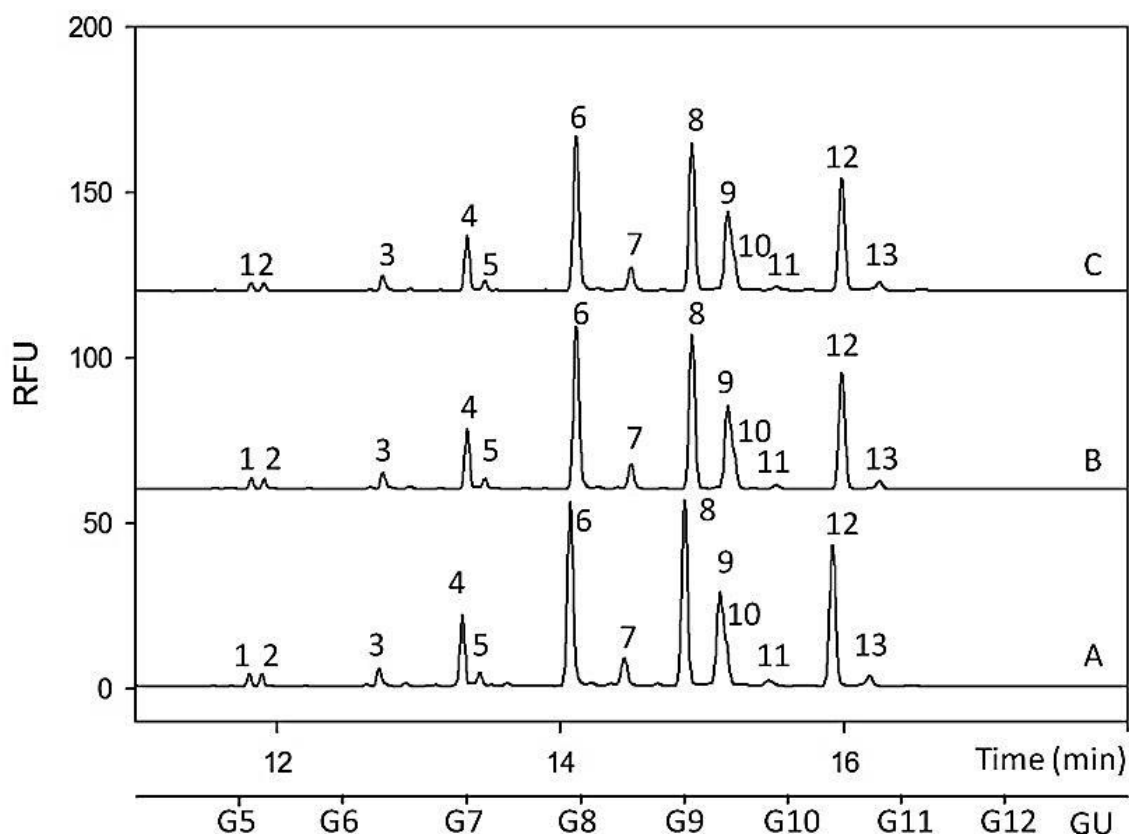
Az Immunglobulin G az immunglobulinok leggyakoribb altípusa. Két könnyű és két nehéz lánc vesz rész három régiójának kialakításában. Ezek közül a Fab fragmentumok antigénkötőhelyekkel rendelkeznek, az Fc régió pedig antitest effektor funkciókkal bír. Az Fc régió dimer, mindkét doménjének 297-es pozícióban lévő aszparagin aminosavához (Asn297) kétantennás komplex típusú N-glikánok kapcsolódnak. Főleg neutrális cukorstruktúrákat tartalmaz. [131].

A fetuin két N- valamint három O-glikozilációs hellyel rendelkezik. Az előbbieket magas szialsavtartalmú oligoszacharidokat tartalmaznak [132].

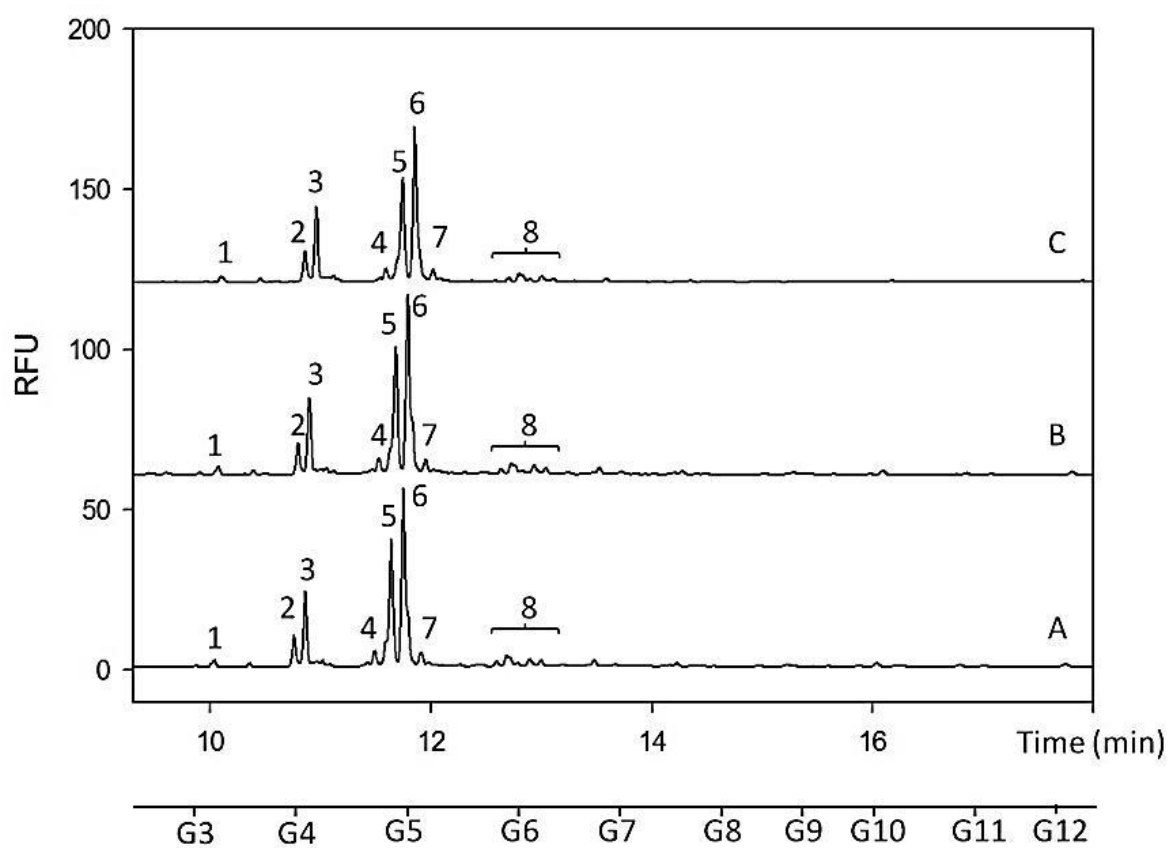
A Ribonukleáz B glikoprotein magas mannóztartalmú N-glikánokat tartalmaz egyetlen glikozilációs helyén (Asn34). Két fő része a Ribonukleáz A és a Ribonukleáz B. A B-alegység az A glikozilált változata [133].

A három glikoproteint (Immunglobulin G, fetuin és Ribonukleáz B) nem fixált (kontroll), formalinnal fixált ill. formalinnal fixált paraffinba ágyazott formában vizsgáltam. A glikoproteineket 10 mg/ml koncentrációjú oldatban használtam,

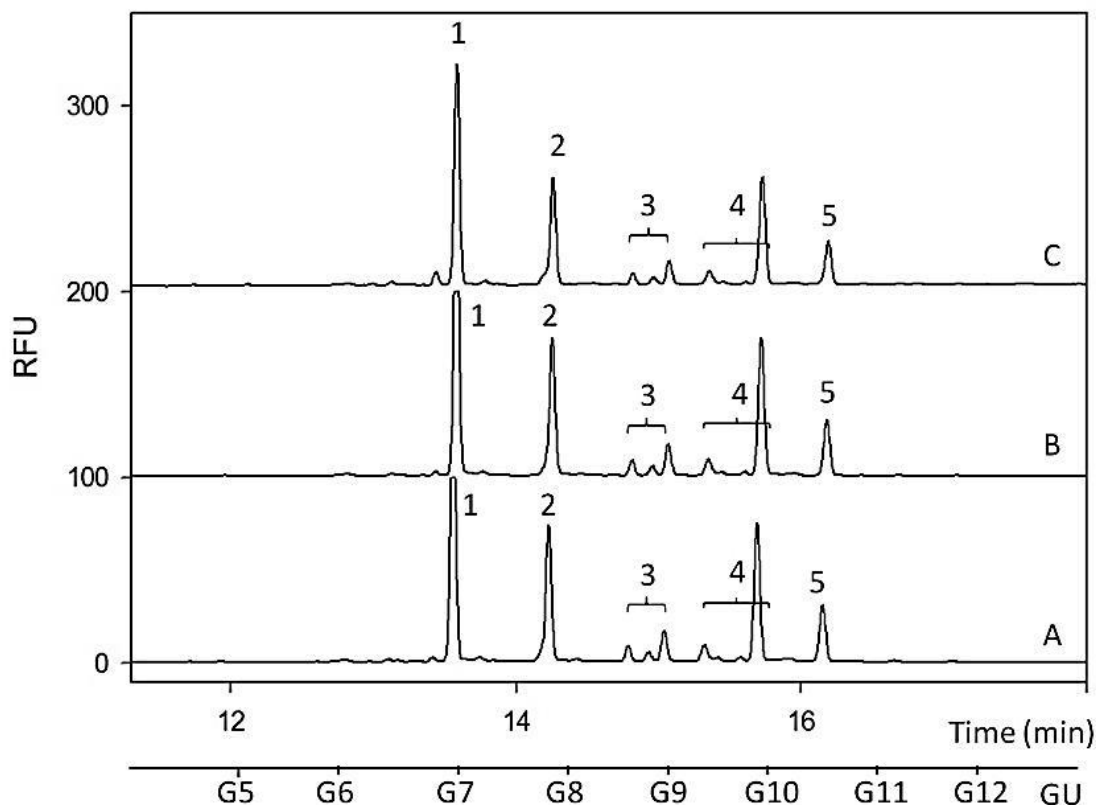
mintánként 100 µg mennyiségben. A kísérleteket 3 párhuzamos mintával 3 ismétléssel végeztem. A mintaeltávolítás során minden mintát kétszer injektáltam. A fixálás és a paraffinba való beágyazás az „Anyagok és módszerek” részben leírtaknak megfelelően történt (3.3.1 bekezdés). A következő három ábrán (5-7. ábra) ezen fontos glikoproteinek N-glikán profiljainak CE-LIF elválasztása látható.



5. ábra: Immunglobulin G APTS-el jelölt N-glikánjainak CE-LIF elektroferogramja. A) kontroll, nem fixált; B) formalinnal fixált; C) formalinnal fixált paraffinba ágyazott minta (FFPE). Az Y tengelyen a relatív fluoreszcens egységet (RFU), a felső X tengelyen a migrációs időt ábrázoltam percekben, az alsó X tengelyen pedig a megfelelő GU (glükóz unit) egységeket. Az elválasztás körülményei: NCHO bevont falú kapilláris, 50 cm effektív (60 cm teljes) hosszúság, NCHO elválasztó puffer, $E=500\text{V/cm}$, elválasztási hőmérséklet: 25°C , injektálás: 1 psi, 5 sec. (Előzetes vizsgálataim alapján előbbieket ideális injektálási és elválasztási paramétert jelentettek a vizsgálataimhoz.)



6. ábra: Fetuin APTS-el jelölt N-glikánjainak CE-LIF elektroferogramja. A) kontroll, nem fixált; B) formalinnal fixált; C) FFPE. Az elválasztási körülmények az 5. ábrán leírtakkal megegyeznek.



7. ábra: Ribonukleáz B glikoprotein APTS-el jelölt N-glikánjainak CE-LIF elektroferogramja. A) kontroll, nem fixált; B) formalinnal fixált; C) FFPE. Az elválasztási körülmények az 5. ábrán leírtakkal megegyeznek.

Az ábrákon az elektroferogramok sorrendje alulról felfelé: kontroll (A), formalinnal fixált (B) és formalinnal fixált paraffinba ágyazott (C) glikoproteinből származó N-glikánok APTS festékkel jelölve. Minden esetben APTS jelölt maltózt, valamint maltopentadekaózt használtam nyitó és záró standardként. A felső X tengelyen a migrációs időt ábrázoltam percekben, az alsó X tengelyen pedig a megfelelő GU (glükóz unit) egységeket, amelyek megfelelnek a standardként és rendszeralkalmassági oldatként használt maltooligoszacharid létra alkotó egyes glükóz oligomerek migrációs idejének, ezért a létra nincs megjelenítve az ábrákon. Ezt a létrát minden vizsgálati csoport esetén injektáltam a mérőssor elején és végén.

Az 5. ábrán, az Immunglobulin G esetén nem látható sem a csúcsok számában, sem a csúcsarányban megjelenő eltérés a három mérés között. A jelölt csúcsok migrációs idejének valamint a maltooligoszacharid létra glükóz oligomerei migrációs idejének ismeretében kiszámítható az adott csúcsnak megfelelő glikánstruktúra GU értéke, mely alapján nyilvános adatbázisokból azonosítható az oligoszacharid. Ezek alapján

elmondható, hogy 1-3-ig és az 5-ös csúcs a szíálsavas struktúráknak felel meg, míg a 4, valamint 6-13-ig a különböző nagyságú neutrális IgG glikánokat jelöli.

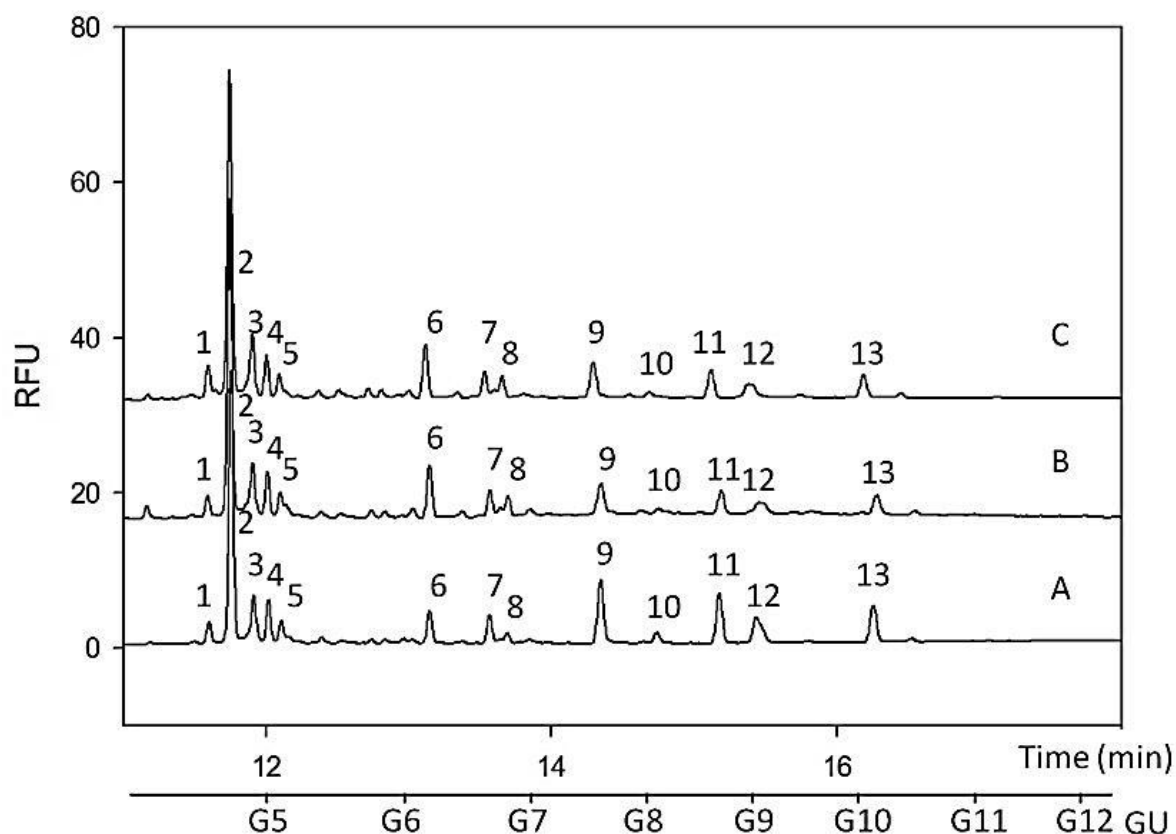
A 6. ábrán a fetuin APTS jelölt N-glikánjai láthatók. Hasonlóan az IgG-hez, a három elektroferogram között nincs detektálható különbség. Az ábra számai a különböző mértékben szialilált glikánstruktúrákat jelölik. 1-3-ig tetraszialo (4 szíálsavat tartalmazó), 4-7-ig triszialo (3 szíálsavat tartalmazó) és a kapcsos zárójel alatt szereplő 8-as struktúra csoport di- és monoszialo (2 ill. 1 szíálsavat tartalmazó) struktúrákat reprezentáljak.

A 7. ábrán szereplő Ribonukleáz B magas mannóztartalmú struktúrákat tartalmaz Man5-től Man9-ig. Ezen struktúrák fluoreszcensen jelölt változatait reprezentálják az elektroferogramok számai 1-5-ig. A Man7 és Man8 izomerei a 3-as és 4-es csoport elemeiként jelennek meg az elektroferogramokon. A kontroll, a formalinnal fixált ill. a formalinnal fixált és paraffinba ágyazott Rnsae B-ből származó jelölt cukrok struktúrái között nem tapasztaltam eltérést.

4.1.2 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 vérszérum fibrinogénmentes vérplazma, vagyis a vér azon része, melyből hiányoznak az alakos elemek (vörösvértest, fehérvérsejt ill. vérlemezke) valamint a véralvadási faktorok. Általában albumin depletált formában használják, mivel ez a fehérje a többihez képest aránytalanul nagy mennyiségben található meg benne, így bizonyos esetekben torzíthatja a méréseket, bár a mi esetünkben ennek nincs jelentősége, mert az albumin nem glikoprotein.

A vizsgálatok a fentebb tárgyalt glikoproteinekéhez hasonlóan zajlottak, a nem fixált (A), a formalinnal fixált (B) és a formalinnal fixált paraffinba ágyazott (C) mintákat hasonlítottam össze. Az eredmények a 8. ábrán láthatóak.



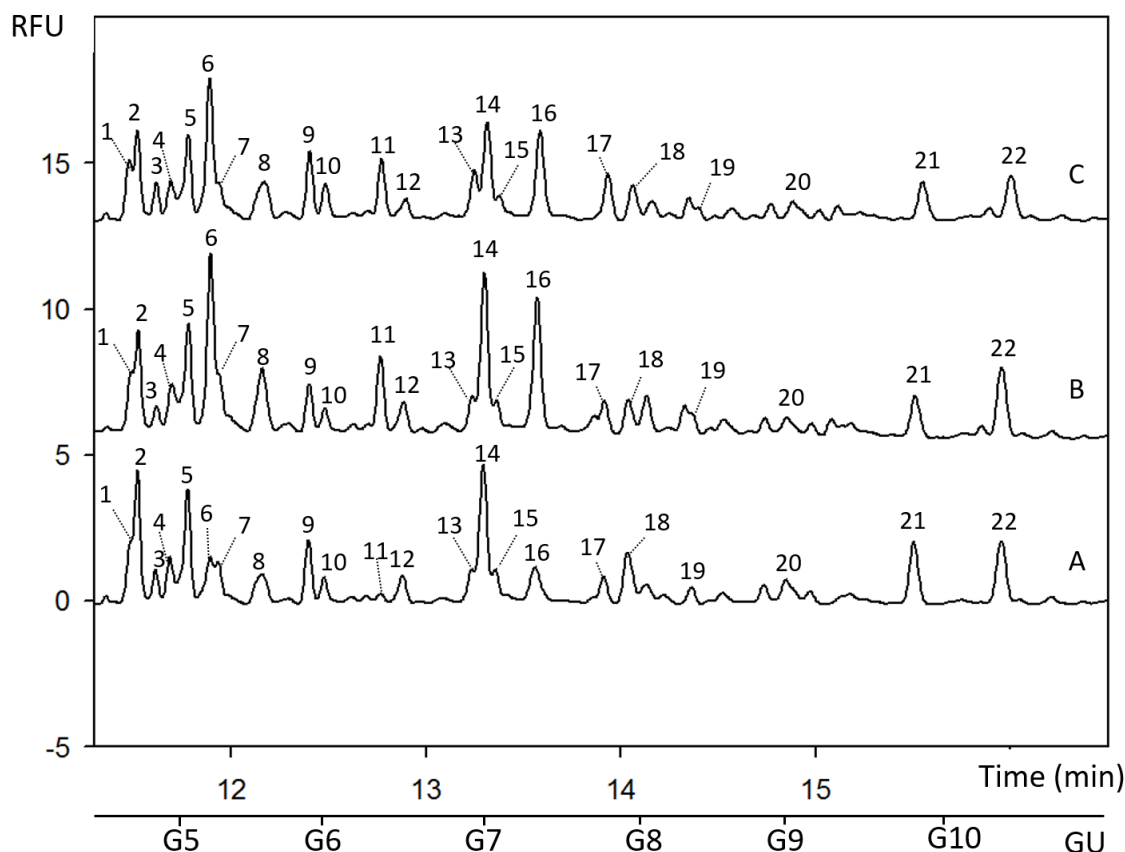
8. ábra: Humán szérumból származó APTS-el jelölt N-glikánok CE-LIF elektroferogramja. A) kontroll, nem fixált; B) formalinnal fixált; C) FFPE. Az elválasztási körülmények az 5. ábránál leírtakkal megegyeznek.

A 8. ábra elektroferogramjain 13 fő csúcsot jelöltem, melyek esetleges eltéréseit vizsgáltam. GU 4-6 között több szíálsavat tartalmazó oligoszacharid struktúra található, GU 6-8-ig kevesebb szíálsavat tartalmazó (mono- és diszialo) valamint kis méretű neutrális struktúrák jelennek meg, GU 8-12 pedig a neutrális cukorstruktúrák régiója. Ennél a komplex mintánál némi eltérést tapasztaltam a három különbözően előkészített minta N-glikánjai között. A 6-os és 8-as csúcsok kis mértékben magasabbak viszont 9-13-ig valamivel alacsonyabbak a fixált és a beágyazott minták elektroferogramjain. 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>), nem tulajdonítottam biológiai jelentőséget.

4.1.3 Egérből származó tumoros szövetminta

Az eddigi 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 mutáció miatt nem képesek immunválaszra általában a hiányzó vagy atipikus T és B limfociták miatt. Az egerek bőre alá HT-1975 tüdőrákos sejteket injekcióztak be (mindegyikbe 2 millió sejtet) laterálisan. A biopsziát akkor készítették, mikor a tumor átmérője elérte a 0,5-0,8 cm-t. A mintát elhalt állatból vették. A kontroll mintát azonnal folyékony nitrogénben tartósították, a másik két mintát (formalinnal fixált ill. FFPE) az „Anyagok és módszerek” részben leírtaknak megfelelően állítottam elő (3.3.1). A mintaelőkészítés megegyezett a glikoproteineknél és a humán szérumnál alkalmazottal. A 9. ábra mutatja az intakt (A), a formalinnal fixált (B), és a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) (C) szövetből származó jelölt, tisztított kapilláris elektroforézissel elválasztott APTS-el jelölt N-glikánok elektroferogramjait.

A 9. ábrán GU 4-6-ig a magas szíálsavtartalmú, GU 6-8-ig az alacsony szíálsavtartalmú és kis méretű neutrális, míg GU 8 fölött a neutrális régióban elhelyezkedő struktúrák találhatók. A formalinnal történő fixálás hatására az A és B, valamint C elektroferogramok között csak a 6, 11 és 16-os számmal jelölt struktúrák esetén tapasztaltam változást, ezek aránya megnőtt (3x) a formalinnal fixált, valamint FFPE szövetből származó glikánprofilokban a kontrollhoz (A) képest. A kísérletet a többihez hasonlóan 3 párhuzamos mintával és 3 ismétléssel végeztem. A párhuzamos minták relatív standard deviációja a kérdéses három csúcs esetén 12,91-16,22 RSD % volt.



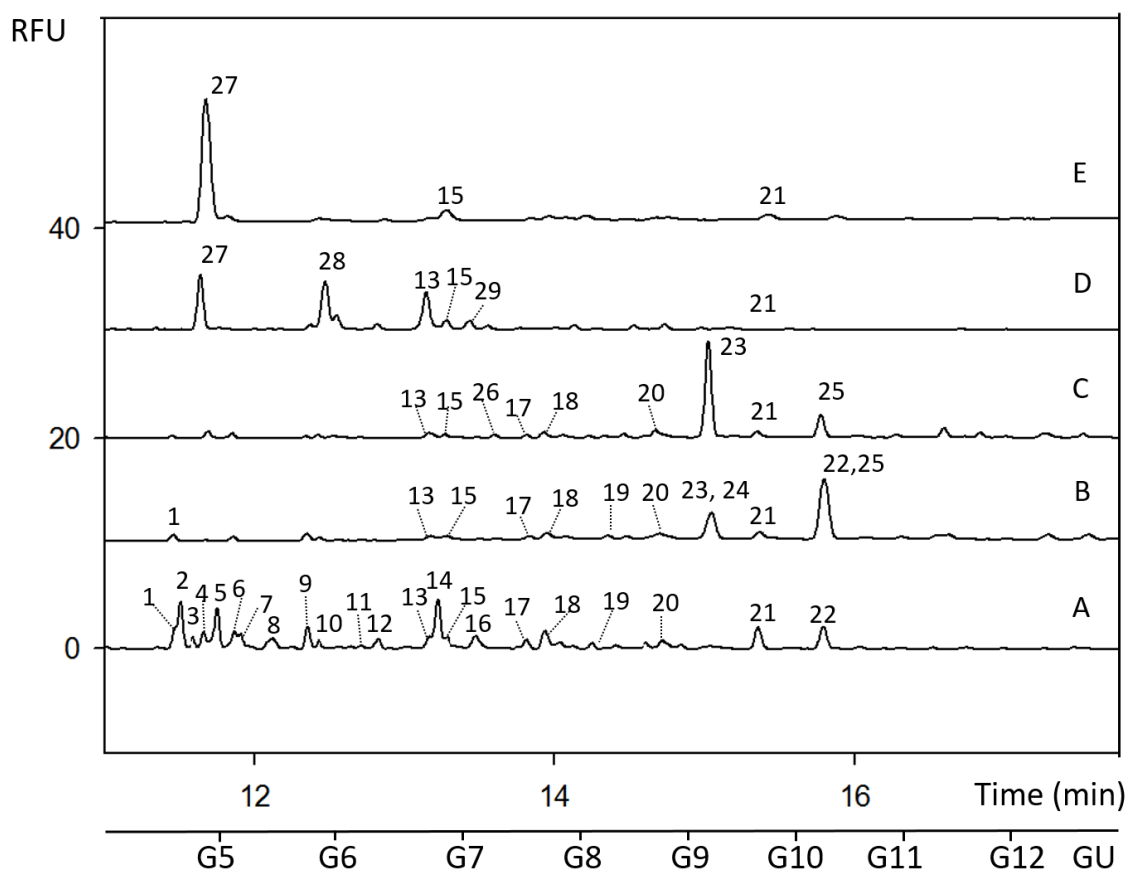
9. ábra: Egérből származó HT-1975 sejtekkel indukált tumoros szövetminta APTS-el jelölt N-glikánjainak CE-LIF elektroferogramja. A) kontroll, nem fixált; B) formalinnal fixált; C) FFPE. Az elválasztási körülmények az 5. ábránál leírtakkal megegyeznek.

Ahhoz, hogy pontosabb képet kapjak arról, hogy milyen struktúrák fordulnak elő az egérből származó tumoros szövetmintában, karbohidrát szekvenálást kellett végeznem. Ez szénhidrátok esetén nem egyszerű, amennyiben meg akarjuk állapítani, milyen elemek építenek fel egy komplex cukorstruktúrát, figyelembe véve a kötési és a pozicionális izomereket is. A szerkezetmegállapításnál cukrok esetén top-down (fentről lefelé) emésztést és bottom up (lentől fölfelé) kalkulációs módszert alkalmaztam. Pontosabban, megfelelő cukor és kötés specifikus exoglikozidáz enzimekkel az alkotóelemeket a struktúra kapcsolódási helyétől (aszparaginhoz vagy a fluorofór- csoporthoz) legtávolabbi ponton kezdtem lehasítani addig, míg el nem jutottam az N-glikánokra jellemző core-pentaszacharidhoz. Ezután az enzimatis emésztések utáni CE-LIF analízissel megállapított struktúrákból tudtam következtetni az eredeti mintában megjelenő glikánok pontos szerkezetére. Az enzimeket az „Anyagok és módszerek” részben leírtaknak megfelelően (3.3.3) adtam hozzá a jelölt glikánok vizes oldatához. Az

enzimek kombinációi a 4. táblázatban láthatóak. A-E a reakcióelegyeket jelöli a 10. ábrával azonos betűjelzéssel. Az eredmények a 10. ábrán láthatók.

Exoglikozidáz enzimek nevei → specifikációja	A	B	C	D	E
Szialidáz A → $\alpha(2-3,6,8,9)$ szialsav	-	+	+	+	+
Fukozidáz → $\alpha(1-2,3,4,6)$ fukóz	-	-	+	+	+
Béta-galaktozidáz → $\beta(1-4,6)$ galaktóz	-	-	-	+	+
Hexóزامинидáz → $\beta(1-2,3,4,6)$ N-acetilglükózamin	-	-	-	-	+

4.táblázat: Exoglikozidáz enzimek nevei, specifikációi és jelenlete a szekvenáló reakcióelegyekben.



10. ábra: Egérből származó HT-1975 sejtekkel indukált tumoros szövetminta APTS-el jelölt N-glikánjainak szekvenálása exoglikozidáz enzim mátrixsal. Elektroferogramok: A) kontroll, enzimekkel nem kezelt; B) szialidáz enzimmal kezelt; C) szialidáz és fukozidáz enzimekkel kezelt; D) szialidáz, fukozidáz és béta-galaktozidáz enzimekkel kezelt; E) szialidáz, fukozidáz, béta-galaktozidáz és hexóзаминидáz enzimekkel kezelt. Az elválasztási körülmények az 5. ábránál leírtakkal megegyeznek.

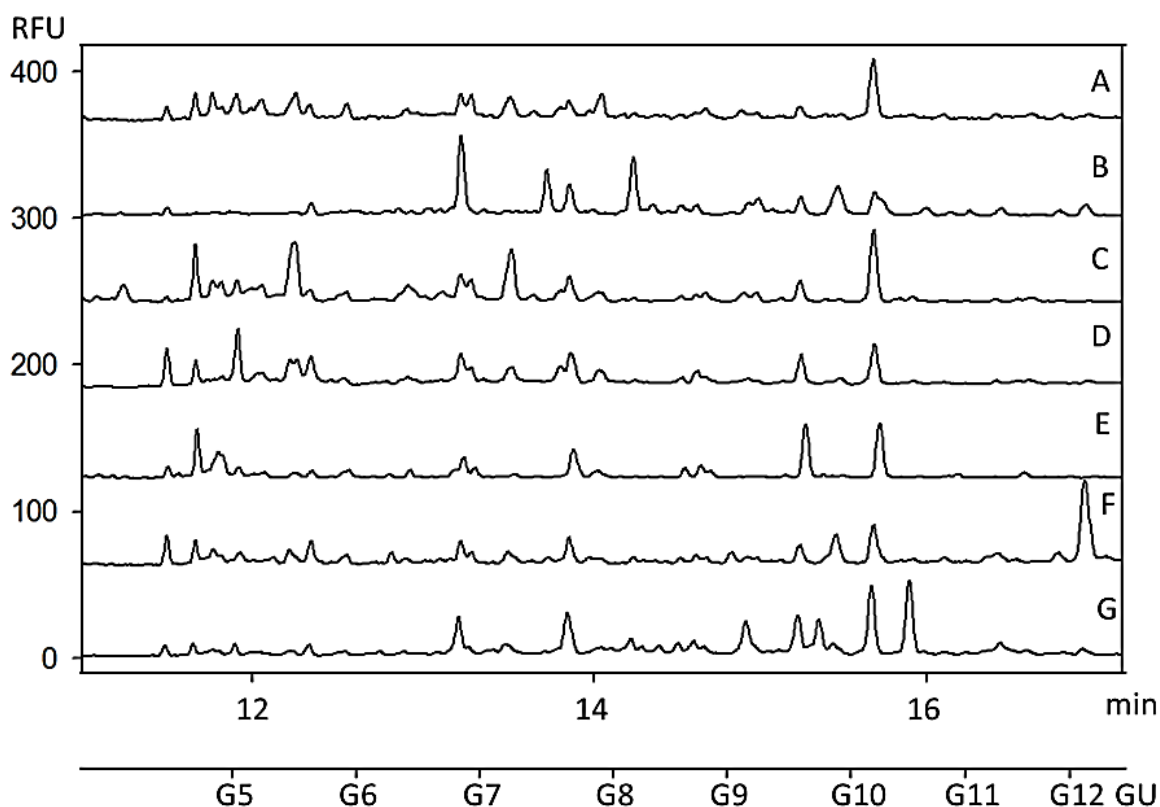
Az A elektroferogramon az intakt egér tumor szövetből származó, fluorescensen jelölt N-glikánok láthatók. A következő (B) a szialidáz enzim kezelés utáni állapotot mutatja. A C esetén szialidáz és fukozidáz enzim kezelés történt. A D-nél szialidáz, fukozidáz és galaktozidáz emésztés történt. Az E esetében pedig szialidázt, fukozidázt, galaktozidázt és hexóزامинidázt is tartalmazott a reakcióelegy. Az A és a B elektroferogram összehasonlításából megállapítható, hogy $\alpha(2-3,6,8)$ szialidáz enzim hatására 2-12, valamint 14 és 16-os csúcsok a magas ill. alacsony szíálsavtartalmú régiókból a GU 6-8 (kis méretű neutrális struktúrák) valamint a GU 8-12 (neutrális struktúrák) régiójába csúsztak. Ez azért történt, mert a szíálsavak által képviselt extra töltés elvesztése miatt az oligoszacharidoknak kisebb lett az elektroforetikus mobilitásuk, így migrációs idejük megnőtt. A szíálsavak levágásával a 17, 19, 20, valamint a 22-25 csúcsok megjelenése ill. méretének növekedése volt tapasztalható. Az $\alpha(1-2,3,4,6)$ fukozidáz enzim kezelését követően, a fukóz eltávolítása miatt minden eredetileg core fukózt tartalmazó struktúra migrációs ideje egy GU egységgel csökkent. Mivel ezek mindegyikének azonos töltést adott a flouorofór csoport, így vándorlásukat már csak hidrodinamikus térfogatuk határozta meg. A 19, 22 és 24-es csúcsok, a fukóz levágása után a 26, 23 és 17-es csúcsokat növelték meg a C jelű elektroferogramon, az 1-es jelű csúcs pedig eltűnt. $\beta(1-4,6)$ galaktozidáz enzim hatására a 26-os csúcs a 28-asba, a 17, 18, 20 és 23-as csúcsok a 13-asba, a 25-ös csúcs pedig a 29-esbe mozdult el. Végül a $\beta(1-2,4,6)$ hexóзаминidáz enzimmel történő emésztés eredményeképp a legtöbb csúcs a 27-es számmal jelölt, az „Irodalmi áttekintésben” részletesen leírt (2.1.1), core pentaszacharidként jelent meg. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy a galaktozidáz enzimnek vélhetően volt hexóзаминidáz aktivitása is, mivel a 27-es csúcs már a galaktozidáz enzim kezelését követően megjelent. A 15-ös és a 21-es csúcsok valószínűleg olyan magas mannóztartalmú glikánstruktúrák, melyekre nem voltak hatással a kísérletben felhasznált exoglikozidáz enzimek.

4.2 Egérből származó FFPE minták glikánjainak analízise

Mivel sem a formalinos fixálás sem a formalinos fixálás paraffinba ágyazással kombinálva nem okozott a glikánprofilban számottevő változásokat a vizsgált mintákban, kutatásomat SCID hím egerekből származó FFPE szövetminták analízisével folytattam. Tüdő, agy, szív, lép, máj, vese és bél mintákból kinyert N-kötött cukrokat vizsgáltam kapilláris elektroforézissel. A paraffin eltávolítás és az oldatba vitel után a szövetekből származó glikoproteineket enzimatikusan hasítottam az N-glikánok kinyerése céljából, majd ezeket fluorofór jelöléssel láttam el az „Anyagok és módszerek” részben leírtaknak megfelelően (3.3.2). Exoglikozidáz mátrix emésztéssel oligoszacharid szekvenálást végeztem a szövetminták N-glikán struktúráinak meghatározásához. Célom az volt, hogy feltérképezsem a különböző egér szövetek totál N-glikán profilját, majd az ezekben megjelenő cukorstruktúrákat azonosítsam.

4.2.1 Egér szervek glikánprofiljának vizsgálata

A 11. ábrán látható az egérből származó különböző szövetminták teljes N-glikán profilja. Ez alapján össze tudtam hasonlítani a tüdőből (A), agyból (B), szívből (C), lépből (D), májból (E), veséből (F) ill. bélből (G) származó, jelölt, tisztított N-glikánokat. A minták ép szövetekből származtak. APTS jelölt maltózt és maltopentadekaózt használtam nyitó és záró standardként, melyeket minden mintával együtt injektáltam. Ezek, valamint a maltooligoszacharid létra, melyet a mérés sorozat elején és végén injektáltam, tették lehetővé a GU értékek pontos kiszámítását, ami a struktúrák adatbázisból történő azonosításához volt szükséges. A méréseket 3 párhuzamos mintával és két injektálással végeztem. A glikánprofilok relatív standard deviációja 8,72 RSD % volt az azonos napon mért minták esetén.



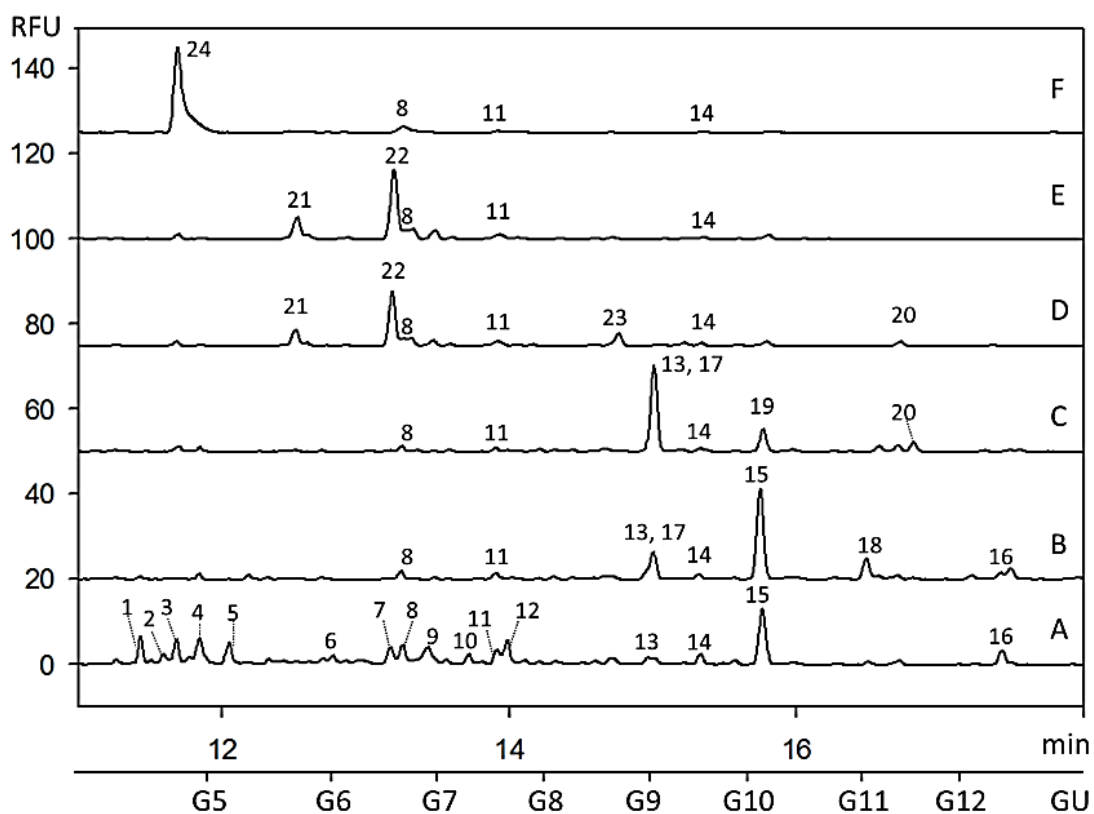
11. ábra: Egérből származó FFPE szervek APTS-el jelölt N-glikánjainak CE-LIF profilja. A) tüdő; B) agy; C) szív; D) lép; E) máj; F) vese; G) bél. Az elválasztás körülményei az 5. ábránál leírtakkal megegyeztek.

A 11. ábra A elektroferogramjából, amely a tüdő szövetre specifikus N-oligoszacharidokat reprezentálja, kiderül, hogy ebben a szövettípusban főleg di- és monoszialo struktúrák fordulnak elő (GU 4-9) néhány neutrális oligoszachariddal (GU 9-13). A B elektroferogramon ábrázolt egér agy N-glikomjában kevésbé jellemzőek a diszialo struktúrák, viszont több a monoszialo (GU 7-9) ill. a neutrális (GU 9-12) glikán. A C elektroferogramon a szívből származó szövetminta N-glikánjai láthatók. Itt mind a di- és monoszialo, mind a neutrális glikánstruktúrák megtalálhatók, megközelítőleg azonos arányban (GU 4-13). A D elektroferogramon megjelenített lép glikánprofil a szívhez hasonló eloszlást mutat a szialsavas és a neutrális struktúrák egymáshoz viszonyított arányára nézve (GU 4-13). A májból származó oligoszacharidokat az E elektroferogram szemlélteti. Ennél a szövettípusnál a diszialo struktúrák egyértelmű túlsúlya jellemző (GU 4-6) néhány monoszialo (GU 7-9) oligoszachariddal és nagyobb mennyiségben neutrális struktúrával (GU 10-11) együtt. Az F elektroferogramon a veséből származó N-glikánok láthatók. Ebben a fixált szövetben a di- és monoszialo

struktúrák mellett jelentős arányban képviseltetik magukat neutrális oligoszacharidok is (GU 4-13). Végül a G elektroferogram mutatja a bél minta N-glikozilációs profilját, melyen az látszik, hogy főleg monoszialo (GU 7-8) ill. neutrális struktúrák (GU 9-13) alkotják a glikánprofil.

4.2.2 Oligoszacharid szekvenálás exoglikozidáz enzimes kezeléssel

Elsőként az egerből származó tüdő szövetminta APTS-el jelölt, tisztított N-glikánjainak szekvenálását végeztem el. Az exoglikozidáz enzimeket mátrixszerűen adtam hozzá a glikánok vizes oldatához az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint (3.3.3).



12. ábra: Eger tüdő N-glikánjainak szekvenálása exoglikozidáz mátrixsal. Elektroferogramok: A) kontroll, enzimekkel nem kezelt; B) szialidáz enzimmal kezelt; C) szialidáz és fukozidáz enzimekkel kezelt; D) szialidáz, fukozidáz és béta-galaktozidáz enzimekkel kezelt; E) szialidáz, fukozidáz, béta-galaktozidáz és alfa-galaktozidáz enzimekkel kezelt; F) szialidáz, fukozidáz, béta-galaktozidáz, alfa-galaktozidáz és hexózaminidáz enzimekkel kezelt. Az elválasztás körülményei az 5. ábránál leírtakkal megegyeztek.

A 12. ábrán az oligoszacharid szekvenálás eredménye látható a 4. táblázatban specifikált enzimatisz emésztések után. A 4. táblázatban leírtakhoz képes módosítottam a szekvenáláshoz használt exoglikozidáz enzimek kombinációin E és F esetben (11. ábra). Az E reakcióelegy alfa-galaktozidáz enzimet is tartalmazott, az $\alpha(1-3,4,6)$ galaktóz egységek levágására. Az F elegy pedig a szialidáz, fukozidáz és béta-galaktozidáz enzimek mellett alfa-galaktozidáz és hexóزامинidáz enzimeket foglalt magában. Az A elektroferogram mutatja a kontroll, exoglikozidáz enzimés kezelés nélküli FFPE egér tüdőszövet N-glikán profilját. B-F-ig az emésztések eredményei láthatók: szialidáz enzimés kezelés után (B), szialidáz és fukozidáz enzimek után (C), szialidáz, fukozidáz és béta-galaktozidáz enzimek után (D), szialidáz, fukozidáz, béta-galaktozidáz és alfa-galaktozidáz enzimek után (E) valamint szialidáz, fukozidáz, béta-galaktozidáz, alfa-galaktozidáz és hexóزامинidáz enzimés emésztés után (F).

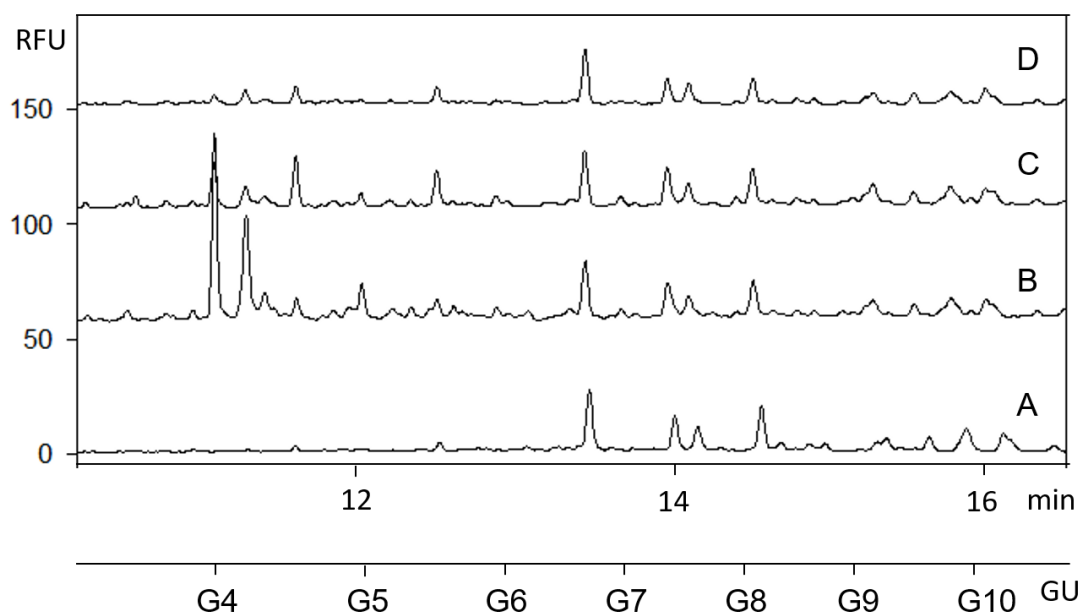
Szialidáz emésztés után, mely enzim levágta az $\alpha(2-3,6,8,9)$ szialsavakat, látható, hogy az 1-7, 9, 10 és 12-es csúcsok a szialsavas régióból a neutrális tartományba mozdultak el (13, 15, 17 és 18-as csúcsok megjelenése). A C reakcióelegyben, a szialidáz és fukozidáz enzimek együttes hozzáadásával, az $\alpha(2-3,6,8,9)$ szialsavak ill. a $\alpha(1-2,3,4,6)$ fukózok levágásával a 15, 18 és 16-os csúcsokból a 13, 19 és 20-as csúcsok keletkeztek egy fukóz egység elvesztésével. A 8, 11, 13 és 14-es csúcsokat nem érintette ez az emésztés ezért valószínűsíthető, hogy nem tartalmaztak fukóz egységet. A D reakcióelegy szialidáz, fukozidáz és béta-galaktozidáz enzimet is tartalmazott, így a D elektroferogramon már csak azok a struktúrák láthatóak, melyek nem tartalmaznak sem $\alpha(2-3,6,8,9)$ szialsavat, sem $\alpha(1-2,3,4,6)$ fukózt, sem $\beta(1-4,6)$ galaktózt. Ez után az emésztés után a 13 és 19-es csúcs a 22 és 23-as csúcsokba mozdult el két ill. egy béta-galaktoz egységet elvesztve. A 8, 11 és 14-es csúcsok intaktak maradtak galaktozidáz kezelés hatására. Az E reakcióelegyben alfa galaktozidázt is alkalmaztam, mivel az egér szervezet glikoproteinjei alfa-galaktoziláltak is lehetnek. Ebben az esetben az enzimkeverék eltávolította nemcsak a $\beta(1-4,6)$, hanem az $\alpha(1-3,4,6)$ galaktóz egységeket is. Így a 23-as csúcs a 22-es be mozdult el miközben egy alfa és egy béta galaktóz egységet veszített el, a 20-as csúcsból pedig szintén 22-es lett két béta és két alfa galaktóz eltávolításával. Végül az F elektroferogramon azon cukrokat láthatjuk, melyek átestek a hexóزامинidázos kezelésen is (3. táblázat F oszlopa). Ezek nem tartalmaznak $\alpha(2-3,6,8,9)$ szialsavat, $\alpha(1-2,3,4,6)$ fukózt, $\beta(1-4,6)$ és $\alpha(1-3,4,6)$ galaktózt valamint $\beta(1-2,3,4,6)$ N-acetilglükóзамин egységeket sem. Az F elektroferogramon szereplő 24-es csúcs a 22-es

csúcsból keletkezett két N-acetilglükózamin levágásával. A korábbi reakcióhoz hasonlóan a 8, 11 és 14-es csúcsok nem mozdultak, ebből arra következtettem, hogy ezek nem tartalmaztak olyan egységeket, melyekre az általam használt enzimek specifikusak voltak. A 17-es struktúra valószínűleg két béta-galaktóz egység elvesztése után vált a 21-es csúccsá, amiből a hexóزامинидáz emésztés után keletkezett a már említett 24-es csúcs. A „Megbeszélés” 6. táblázata összefoglalja a tüdő szövetminta N-glikánjainak szekvenálása során kapott struktúrákat.

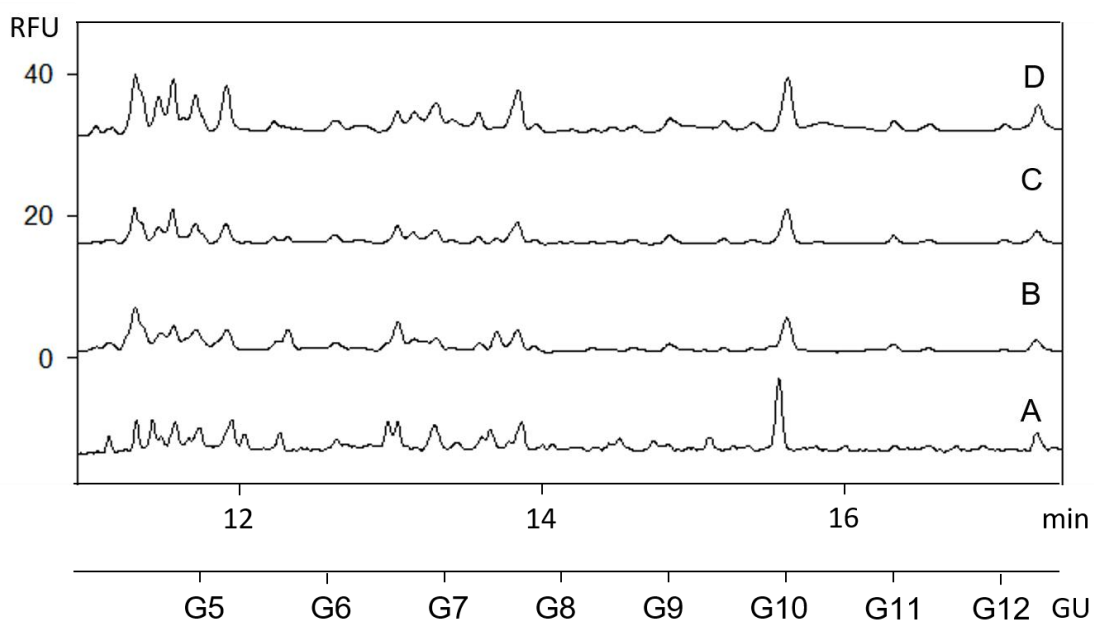
Az egér tüdő N-glikán struktúráinak meghatározása után a többi rendelkezésemre álló FFPE egér szövetet vizsgáltam meg. Az oligoszacharidok azonosítására a 4. táblázatban bemutatott exoglikozidáz mátrix emésztést alkalmaztam a tüdő szövetminta esetén már leírt módosítással. A totál glikánprofil alkotó struktúrákat táblázatos formában foglaltam össze (Megbeszélés 7. táblázat).

4.3 A cukorprofil változása a halál beálltától a fixálásig

Azután, hogy megvizsgáltam, vajon a formalin fixálás és a paraffinba ágyazás lehet-e hatással a glikánstruktúrákra, azt is lényegesnek véltem megtudni, van-e jelentősége annak, hogy a halál beálltától számítva mennyi idő alatt kerül a minta a fixáló oldatba. Ez a kísérlet arra is választ adhat, hogy a néhány eltérést, mely a kontroll (nem fixált), formalinnal fixált ill. formalinnal fixált és paraffinba ágyazott szövetminták között fennállhat, eredményezheti-e a mintavételtől a fixálásig eltelt idő alatti szöveti változás, pl. degradálódás. A vizsgálathoz 3 db SCID egér agyát és tüdejét használtam fel. A mintavétel az „Anyagok és módszerek” 3.3.4 fejezete alapján, a mintaelőkészítés, pedig a 3.3.2 fejezet alapján készült. A 13. ábra mutatja a mérések eredményeit.



13/1. ábra: Egérből származó agy szövetminta glikánprofiljának változása a halál beálltától a fixálásig. A) FFPE agy szövetminta (Országos Onkológiai Intézet); B) azonnal előkészített; C) egy óra múlva előkészített; D) két óra múlva előkészített. Az elválasztás körülményei az 5. ábránál leírtakkal megegyeztek.



13/2. ábra: Egérből származó tüdő szövetminta glikánprofiljának változása a halál beálltától a fixálásig. A) FFPE agy szövetminta (Országos Onkológiai Intézet); B) azonnal előkészített; C) egy óra múlva előkészített; D) két óra múlva előkészített. Az elválasztás körülményei az 5. ábránál leírtakkal megegyeztek.

A 13/1 és 13/2 ábrákon jelentős különbségek tapasztalhatók mind a tüdő és az agy szövetmintái, mind az agy esetén a különböző időben fixált minták N-glikozilációs mintázatai között. Az ábrák A elektroferogramjai a korábban már bemutatott, Országos Onkológiai Intézet által rendelkezésemre bocsátott FFPE szövetminták APTS jelölt, tisztított N-glikánjainak CE-LIF profiljait ábrázolják. A B-D minták 3-3 egérből származnak. A B esetén az eltávolított agyból és tüdőből azonnal elvégeztem a fehérjekinyerést és az N-glikánok mintaelőkészítését. A C mintát egy órás, a D-t pedig kétórás szobahőmérsékleten történő tárolás után vizsgáltam.

Az agyból származó szövetminták esetén különbséget figyelhetünk meg az A valamint B-D elektroferogramok között. Az A elektroferogramon sokkal kevesebb szíálsavas, különösen magas szíálsavtartalmú (GU 4-6) struktúra látható, mint a felette lévőkön. Legnagyobb arányban ezen oligoszacharidok a B elektroferogramon megfigyelhetők. C, D-n arányuk kisebb, közelít az FFPE mintában megfigyelthez. Az alacsony szíálsavtartalmú (GU 7-9) és a neutrális (GU 9<) régióban a csúcsok száma és területe között nem látható jelentős különbség.

A tüdőből származó mintáknál nem figyelhető meg az előbbieken leírt tendencia. A-D elektroferogramokon GU 4-12-ig nincs jelentős változás a különböző időben előkészített minták N-glikán profiljában.

5. Megbeszélés

5.1 Intakt, formalinnal fixált valamint formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták N-glikán profilbeli különbségei

Kísérleteim első szakaszában arra a kérdésre kerestem a választ, hogy okoz-e a fehérjékéhez hasonló változást a formalinos fixálás a szénhidrátszerkezetekben. Kísérleteimet standard glikoproteinek vizsgálatával kezdtem: a nagyrészt neutrális N-glikánokat tartalmazó Immunglobulin G-vel, a nagy szíálsav tartalmú fetuinnal és a magas mannóztartalmú Ribonukleáz B-vel. Ahogyan az az „Eredmények” rész 5-7. ábráin is látható (4.1.1) semmilyen változást nem tapasztaltam sem a formalinnal történő fixálás, sem a paraffinba történő ágyazás hatására a totál N-glikán profilon. Mivel ezeken a modell glikoproteineken, melyek a három leggyakoribb N-glikozilációs alcsoportot képviselik, nem okozott sem a fixálás sem a beágyazás olyan változást, ami érintette volna az oligoszacharidokat. Megállapítottam, hogy a glikoproteinek szénhidrát részére nincs hatással a formaldehides kezelés.

A humán szérumon végzett munkám során is kontroll (nem fixált), formalinnal fixált, valamint formalinnal fixált és paraffinba ágyazott mintákat vizsgáltam. A humán szérum komplexebb mivolta miatt ez a kísérlet a következő lépést jelentette a szöveti szintű vizsgálatok előtt. A kísérletek eredményeképp a kapilláris elektroforetikus elválasztással kapott elektroferogramokon tapasztaltam ugyan némi csúcsarányváltozást (4.1.2), de ezek relatív standard deviációja nem haladta meg az ICH által meghatározott nemzetközi határértéket. A humán szérumra jellemző glikánprofil felismerhető volt és a szérumban előforduló N-glikán struktúrák hiánytalanul megtalálhatók voltak a formalin fixált és az FFPE mintában is.

Az egérből származó tumoros szövetminta vizsgálatánál (4.1.3) három glikánstruktúra esetén tapasztaltam változást a kontroll és a formalinnal fixált állapot között: a 9. ábra 6, 11 ill. 16-os számmal jelölt csúcsai megnöttek a B elektroferogramon (FF). Wuhler és munkatársainak 2017-ben közölt eredményeiből kiderül, hogy az $\alpha(2,3)$ kötésű szíálsav egységek érzékenyebben reagálhatnak a mintaelőkészítés körülményeire, mint az $\alpha(2,6)$ kötéssel kapcsolódók [134]. Az $\alpha(2,3)$ kötés térállása miatt (https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/Chem%20and%20Society/Influenza/Influenze_overview.htm) könnyebben hasad. Az előbbieken említett három struktúra

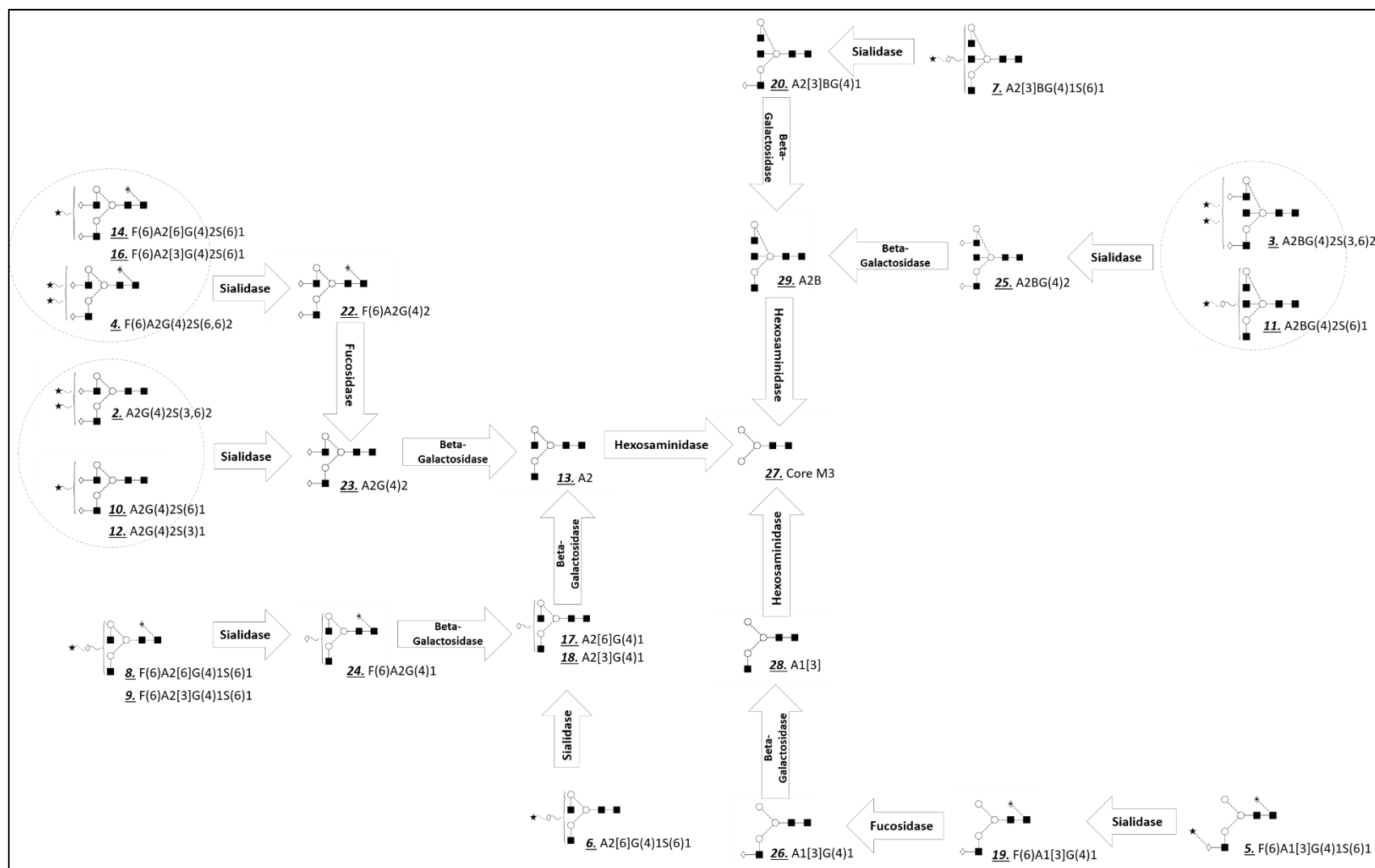
valószínűleg olyan monoszialo oligoszacharid, melyben a szíálsav egységek $\alpha(2,6)$ kötéssel kapcsolódnak, és három olyan diszialo struktúrából származnak, melyek a fixálás során elvesztették az $\alpha(2,3)$ kötött szíálsav egységeiket. Az oligoszacharidok azonosításához karbohidrát szekvenálást végeztem.

Ezen egér minta szekvenálásakor az exoglikozidáz enzimeket mátrixszerűen hozzáadva (Am. 3.3.3) az intakt tumorszövet vízben oldott jelölt glikánjaihoz, olyan reakcióelegyet kaptam, melyekben már csak olyan struktúrák jelentek meg, melyek nem rendelkeztek az enzim specifikálásának megfelelő alkotórésszel. Pl.: a szialidáz tartalmazó reakcióelegyben csak olyan struktúrák vannak, melyeken nincs szíálsav vagy a szialidáz, fukozidáz, galaktozidáz és hexózaminidáz is tartalmazó reakcióelegyben csak olyan struktúrák lehetnek, melyeken sem szíálsav, sem fukóz, sem galaktóz, sem N-acetilglükózamin nincs, ez a struktúra általában a trimannozil core pentaszacharid vagy más mannóztartalmú struktúra. A szekvenálás eredményeképpen azonosított N-glikánokat az 5. táblázatban foglaltam össze.

Csúcs	Struktúra	GU
1	F(6)M2	4.68
2	A2G(4)2S(3,6)2	4.68
3	A2BG(4)2S(3,6)2	4.87
4	F(6)A2G(4)2S(3,6)2	5.06
5	F(6)A1[3]G(4)1S(6)1	5.17
6	A2[6]G(4)1S(6)1	5.32
7	A2[3]BG(4)1S(6)1	5.58
8	F(6)A2[6]G(4)1S(6)1	5.73
9	F(6)A2[3]G(4)1S(6)1	5.95
10	A2G(4)2S(6)1	6.20
11	A2BG(4)2S(6)1	6.41
12	A2G(4)2S(3)1	6.50
13	A2	6.80
14	F(6)A2[6]G(4)2S(6)1	6.90
15	M5	6.90
16	F(6)A2[3]G(4)2S(6)1	7.31
17	A2[6]G(4)1	7.83
18	A2[3]G(4)1	8.07
19	F(6)A1[3]G(4)1	8.13
20	A2[3]BG(4)1	8.60
21	M8	9.78
22	F(6)A2G(4)2	10.10
23	A2G(4)2	9.10
24	F(6)A2G(4)1	9.20
25	A2BG(4)2	9.90
26	A1[3]G(4)1	7.32
27	Core M3	4.90
28	A1[3]	6.10
29	A2B	7.20

5. táblázat: Egérből származó HT-1975 sejtekkel indukált tumoros szövetminta N-glikánjai

A 14. ábra az egérből származó HT-1975 sejtekkel indukált tumoros szövetminta N-glikánjainak exoglikozidáz emésztéses reakció útvonalát foglalja össze. Az szialidáz enzim es emésztés után megállapítható, hogy a 2, 10 és 12-es számmal jelölt diszialo, afukozilált struktúrákból a 23-as jelű A2G(4)2 struktúra lesz. A 3 és 11-es biszekting struktúrák a szialsav egységek levágása után a 25-ös csúccsá válnak. A 4, 14 és 16-os core fukozilált glikánok az F(6)A2G(4)2 oligoszacharidnak megfelelő 22-es csúcsban olvadnak össze, míg az 5-ös csúcsból a 19-es, a 6-osból a 17-es, a 7-esből pedig a 20-as csúcsba vándorolnak a glikánok. A 8 és 9-es számú core fukozilált, egykarú oligoszacharidokból a szialidáz emésztéssel a 24-es F(6)A2G(4)1 struktúra jön létre. Fukozidázos emésztés után az 1-essel jelölt F(6)M2 glikánból maltóz (M2) lesz, ami nem látszik az ábrán, mivel GU 2-nél helyezkedik el. A 19-es struktúrából 26-os keletkezik, A 22-es F(6)A2G(4)2-ből A2G(4)2 lesz (23), míg a 24-es számú a 18-as csúcsba csúszik el. A C elektroferogram csúcsai a β -galaktozidáz hatására a következő módon mozdulnak el: a 26-os (A1[3]G(4)1) a 28-asba (A1[3]) egy galaktóz egység levágásával, a 17, 18 és 23-as csúcsok a 13-asba (A2) egy ill. két galaktóz egység levágásával, a 20 (A2BG(4)1) és 25-ös (A2BG(4)2) pedig a 29-esbe (A2B) egy ill. két galaktóz egység levágásával. Hexózaminidáz enzim hozzáadásával a D elektroferogram 28, 13 ill 29-es csúcsa az N-acetilglükózamin egységek eltávolításával a 27-es csúcs növekedését hozza létre. (Az „Eredmények” részben említettem, hogy a galaktozidáz enzim hexozaaminidáz aktivitása miatt jelenhetett meg ez a csúcs a galaktozidáz emésztés után a D elektroferogramon.) A 15-ös M5 és a 21-es M8 struktúrák magas mannóztartalmúak, csak mannóz egységeket tartalmaznak a core-struktúrához kapcsoltan, így az általam használt enzimek nem voltak hatással rájuk. A korábban említett 6, 11 és 16-os monoszialo struktúrákat jelentő csúcsok mérete a 9. ábra B elektroferogramján azért nőhetett meg, mert a 2, 3 és 4-es jelű diszialo struktúrák elvesztették $\alpha(2,3)$ kötésű szialsav egységeiket.



14. ábra: Egérből származó HT-1975 sejtekkel indukált tumoros szövetmintából származó N-glikán struktúrák exoglikozidáz útvonala. Harvey és munkatársai [135] jelöléseit használtam.

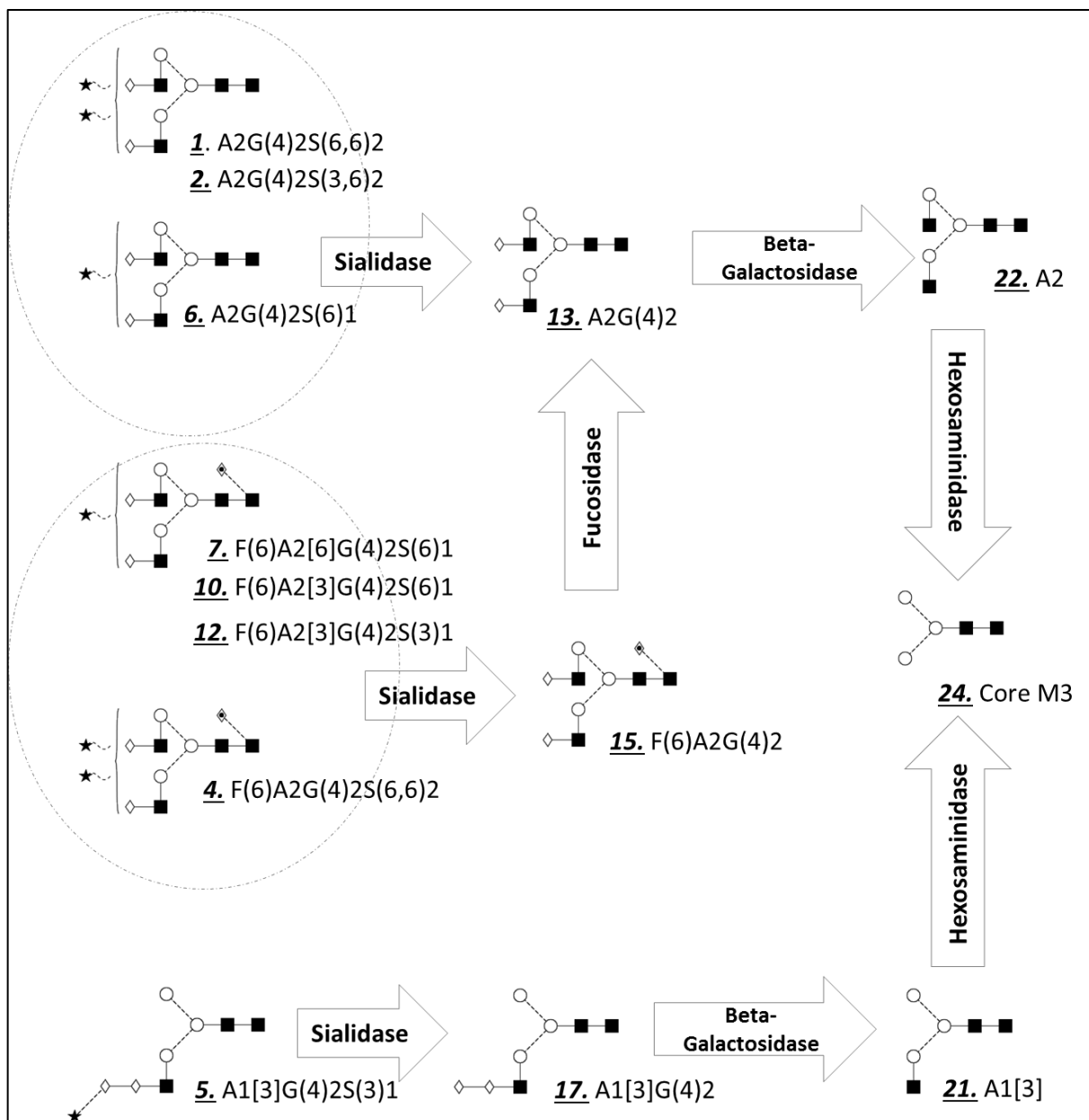
Eredményeim azt mutatták, hogy az N-glikán mintázatok gyakorlatilag azonosak a formalinos kezelés, valamint a paraffinba ágyazás előtt és után az általam vizsgált minta típusokban. Ezek alapján javasolható, hogy a kórházakban több évtizede felhalmozott FFPE mintákat fel lehet használni a közismeretben lévő betegségekhez kapcsolódó N-glikozilációs változások (gliko-biomarkerek) felderítésére.

5.2 Glikánstruktúrák azonosítása különböző egér szervekből

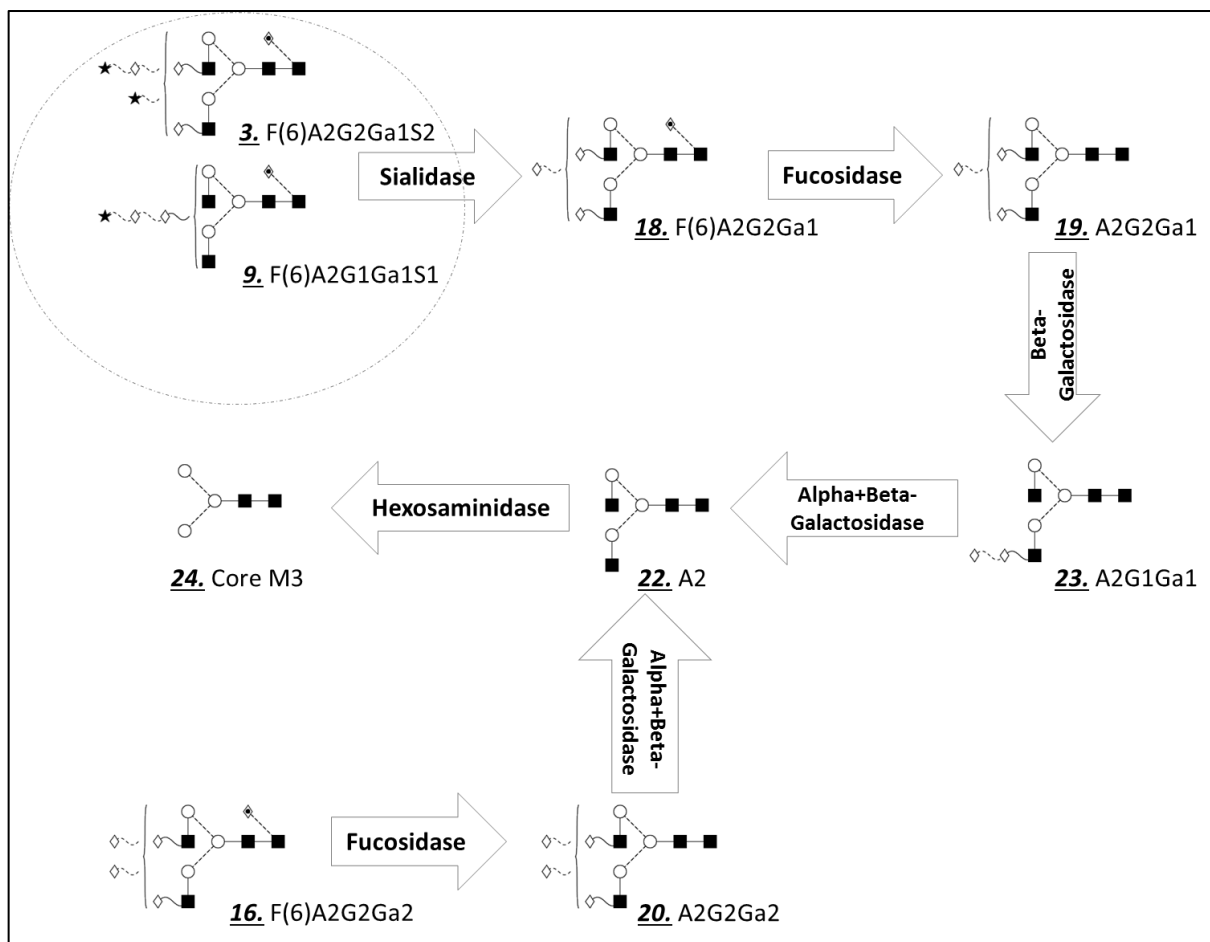
Mivel előző vizsgálataim eredményei azt sugallták, hogy a formalin fixálás és a paraffinba ágyazás nincs hatással a glikoproteinek karbohidrát részére, a következőkben kiterjesztettem a teljes N-glikán profil meghatározását az FFPE szövetmintákra és az azokban talált struktúrák pontos azonosítására. Ezen kísérleteimhez különböző formalin fixált és paraffinba ágyazott egér szerveket használtam, nevezetesen tüdőt, agyat, szívet, lépét, májat, vesét ill. belet. A 10. ábrán jól megfigyelhető, hogy a különböző típusú szövetminták eltérő N-glikán profilt mutatnak, ami ennek megfelelően specifikusnak tekinthető az adott szövetre nézve. Jól látható, hogy az egyes szervek szövetei különböző arányban tartalmazzak magas, valamint alacsony szíálsav tartalmú, ill. különböző mérettartományba eső neutrális struktúrákat.

Ahhoz, hogy teljes biztonsággal meggyőződjünk arról, mely struktúrák adják az egyes szövetek N-glikán profilját oligoszacharid szekvenálás volt szükséges a glikánok cukor építőelemeinek és azok kötés típusának meghatározásához. A vizsgálatot exoglikozidáz mátrix emésztéssel végeztem el az „Anyagok és módszerek” megfelelő fejezetében leírtak szerint (3.3.3).

A 12. ábrán látható a karbohidrát szekvenálás eredménye és a meghatározott csúcsok 1-24-ig. A 24-es csúcsot az N-glikánok core pentaszacharidjaként azonosítottam GU értéke alapján (4,829), valamint azért mert nem tartalmaz már szíálsav, fukóz, alfa- vagy béta-galaktoz, sem antennáris N-acetilglükózamin egységeket. Látható volt, hogy a 8, 11 és 14-es struktúrák nem változtak meg az alkalmazott enzimek hatására. Ebből arra következtettem, hogy ezen oligoszacharidok valószínűleg olyan magas mannóztartalmú struktúrák, melyek 5, 6 ill. 8 mannóz egységet tartalmaznak. Ezt a feltételezést megerősítette GU értékük, melyet online elérhető szoftver és adatbázis segítségével határoztam meg (www.gucal.hu). A reakciók lépéseit és a javasolt struktúrákat a 15. és 16. ábra szemlélteti.



15. ábra: Béta-galaktóz tartalmú egér tüdő eredetű N-glikán struktúrák exoglikozidáz reakció útvonala. Harvey és munkatársai [135] jelöléseit használtam.



16. ábra: Alfa- és béta-galaktózt is tartalmazó egér tüdő eredetű N-glikán struktúrák exoglikozidáz reakció útvonala. Harvey és munkatársai [135] jelöléseit használtam (Ga: alfa-galaktóz).

A 15. ábra a béta-galaktóz tartalmú oligoszacharid struktúrák exoglikozidáz reakció útvonalát foglalja össze (ezekben nincs alfa-galaktóz egység). Szialidáz hozzáadása után az afukozilált (1, 2, 6) és a core fukozilált (4, 7, 10, 12) struktúrák a 13 és 15-ös csúcsokba csúsztak át. Fukozidáz enzim hatására a 15-ös csúcs a 13-asba mozdult el. Béta-galaktozidáz enzim hatására jött létre az előbbiből (13) a 22-es struktúra, mely a két antennás A2 oligoszacharidot jelöl. A hexózaminidázzal történő emésztés az N-acetilglükózamin egységek levágásával hozta létre a trimannozil core (24) struktúrát. Ezen az ábrán látható még az 5-ös számmal jelzett szialilált, fukóz egységet nem tartalmazó, egyantennás struktúra, melyből szialidáz kezelés hatására a korábban Hoja-Lukovicz által leírt [136] egyantennás komplex oligoszacharid keletkezett, mely két galaktóz egységet tartalmazott $\beta 1 \rightarrow 4$ kötéssel. Ebből a béta-galaktozidáz tartalmú

reakcióelegy az A1[3] struktúrát hozta létre, mely hexózaminidáz emésztés után a 24-es csúcsot eredményezte.

A 16. ábra az alfa-galaktozilált N-oligoszacharidok reakcióútvonalát mutatja. Itt a core fukozilált 3 és 9-es struktúrák szialidáz hatására a 18-as csúcsba csúsznak át, majd fukozidáz hatására a 19-es csúcsot növelték meg. Amikor ezt a glikánt béta-galaktozidázzal kezeltem, egy béta-galaktóz egység elvesztésével a 23-as jelent meg. Az E reakcióelegy, mely alfa- és béta-galaktozidázt is tartalmazott, ebből a csúcsból hozta létre a 22-essel jelölt kétantennás A2 struktúrát egy alfa- és egy béta-galaktóz egység levágásával. A2 -ből hexózaminidáz enzim emésztés eredményezte a core pentaszacharidot. A 16-os struktúra fukozidáz emésztés hatására a 20-as csúcsot adta, majd két alfa- és két béta-galaktóz egységet veszített az alfa- és béta-galaktozidáz enzimek együttes hozzáadásával. Az így létrejött A2 oligoszacharid a már említett hexózaminidáz kezelés után a 24-es, core struktúrát eredményezte. Az azonosított struktúrákat a 6. táblázatban foglaltam össze [137].

Csúcs	MT [min]	GU	Struktúra
1	11.429	4.549	A2G(4)2S(6,6)2
2	11.588	4.721	A2G(4)2S(3,6)2
3	11.679	4.819	F(6)A2G(4)2S(6,6)2
4	11.842	4.996	F(6)A2G(4)2S(3,6)2
5	12.05	5.240	A1[3]G(4)2S(3)1
6	12.771	6.096	A2G(4)2S(6)1
7	13.171	6.607	F(6)A2[6]G(4)2S(6)1
8	13.254	6.713	M5
9	13.429	6.936	F(6)A2G1Ga1S1
10	13.727	7.326	F(6)A2[3]G(4)2S(6)1
11	13.913	7.595	M6
12	13.983	7.691	F(6)A2[3]G(4)2S(3)1
13	14.967	9.039	A2G(4)2
14	15.333	9.530	M8
15	15.762	10.106	F(6)A2G(4)2
16	17.433	12.366	FA2G2Ga2
17	14.967	9.039	A1[3]G(4)2
18	16.496	11.096	F(6)A2G2Ga1
19	15.762	10.106	A2G2Ga1
20	16.817	11.531	A2G2Ga2
21	12.508	5.779	A1[3]
22	13.183	6.622	A2
23	14.762	8.759	A2G1Ga1
24	11.688	4.829	Core M3

6. táblázat: Egér tüdőből származó N-glikánok összefoglaló táblázata publikus adatbázisból származó adatokkal.

A fentiekhez hasonlóan elvégzett kísérletek alapján a 11. ábrán bemutatott FFPE egér szervekből származó APTS-el jelölt, tisztított N-glikán profilok egyes oligoszacharidjainak azonosítását exoglikozidáz enzimes szekvenálással és online adatbázis igénybevételel végeztem el. Az eredményeket a 7. táblázatban foglaltam össze.

Csúcs	Struktúra	GU	Tüdő	Agy	Szív	Lép	Máj	Vese	Bél
1	A2G(4)2S(6,6)2	4.549	x		x	x	x	x	x
2	A2G(4)2S(3,6)2	4.721	x		x		x	x	
3	F(6)A2G(4)2S(6,6)2	4.819	x		x	x	x	x	x
4	F(6)A2G(4)2S(3,6)2	4.996	x		x	x			
5	A1[3]G(4)2S(3)1	5.24	x		x	x		x	
	A2[6]BG(4)S(6)1	5.612			x	x		x	
	A2[3]BG(4)S(6)1	5.995			x	x		x	
6	A2G(4)2S(6)1	6.096	x		x	x	x	x	
7	F(6)A2[6]G(4)2S(6)1	6.607	x	x	x	x	x	x	x
8	M5	6.713	x		x	x	x	x	
9	F(6)A2G1Ga1S1	6.936	x		x	x	x	x	x
	F(6)A2	7.639		x					
10	F(6)A2[3]G(4)2S(6)1	7.326	x	x	x	x	x	x	x
11	M6	7.595	x		x	x	x	x	x
12	F(6)A2[3]G(4)2S(3)1	7.691	x						
	A2[6]BG(4)1	8.381		x					
13	A2G(4)2	9.039	x	x	x			x	x
14	M8	9.53	x	x	x	x	x	x	x
	A2BG(4)2	9.77							x
	F(6)A2BG(4)1	9.95		x				x	x
15	F(6)A2G(4)2	10.106	x	x	x	x	x	x	x
	F(6)A2BG(4)2	10.713							x
16	FA2G2Ga2	12.366	x	x				x	

7. táblázat: Egérből származó FFPE szövetek totál N-glikán profiljait alkotó oligoszacharidok összefoglaló táblázata. (A számok a tüdő szövetminta már megismert csúcsait jelölik. Kékkel a kizárólag a többi szövettípusban megtalált struktúrákat jelöltem)

Eredményeim alapján megállapítottam, hogy az FFPE szövetminták alkalmasak CE-LIF módszerrel történő N-glikánok azonosításra. A GU értékek és a csúcs elmozdulások alapján kiszámítható, hogy az exoglikozidáz enzimátikus emésztés milyen oligoszacharidokat eredményezett és ezek alapján lépésről lépésre felépíthető volt az eredeti N-glikánstruktúra.

5.3 Időfüggés vizsgálata fixáláskor

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 kísérletekbe egérből származó agy és tüdő szövetmintát alkalmaztam. A 13/1. ábrán egyértelműen megfigyelhető egy olyan tendencia, miszerint a szíálsavas struktúrák érzékenyen reagálnak arra, ha sokáig szobahőmérsékleten állnak a fixálás előtt. A szíálsav egységek minden esetben az oligoszacharidok fehérjéhez való kapcsolódásától (vagy a fluorofór csoporttól) legtávolabb helyezkednek el és gyakran a hőmérséklet növelésekor enzimátikus emésztés nélkül is lehasadnak. Ezzel magyarázható lenne az, hogy a halál beálltakor közvetlenül feldolgozott szövetminta őrizte meg ezen struktúrákat a legnagyobb arányban.

Az is megfigyelhető, hogy a tüdő szövetmintánál (13/2. ábra) nem tudjuk ezt a szabályosságot egyértelműen bizonyítani. Magyarázható ez azzal a ténnyel, hogy nem azonos struktúrák alkotják a két szövet N-glikánprofilját. Az mindenesetre kijelenthető, hogy általában a mintavétel után 0.5-1 órával a szövetek fixáló oldatba kerülnek. Ezzel a lehetőségek szerint nagyon sok N-oligoszacharidot őriznek meg a kórházakban és kutatóintézetekben tárolt minták, melyek fontos információt rejthetnek a glikobiomarkerek felfedezése szempontjából.

6. Összefoglalás/Summary

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 formalinos fixálást paraffinba ágyazással kombináló módszer 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 kísérleteimmal sikerült bizonyítanom, hogy a fixálás és a fixálás paraffinba ágyazással, speciális szíálsavas 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.

The surface of the living cells is richly decorated with various carbohydrate chains that play important roles in the body and cell life as part of the glycoconjugates. Glycan structures of glycoproteins influence the conformation, determine lifetime of the associated protein, participate in cell-cell interactions, and could be receptors for different lectins or antibodies. The growing field of glycomics explores the structure to function relationship of carbohydrates. As oligosaccharides can change due to diseases, they can be used as biomarkers. FFPE samples represent a good alternative to fresh/frozen samples because of their easier storage and longer shelf-life. So far, FFPE samples have been used to isolate nucleic acids for gene expression analysis in genomics, for reverse phase array Western blotting and mass spectrometry experiments in the proteomics field. In the glycomics field, MSI (mass spectrometry imaging) techniques have only been used to investigate the glycosylation of proteins from FFPE samples. However, despite the fact that it is capable of detecting and determining a large number of different materials at the same time, this technique cannot distinguish between the individual binding and positioning isomers that have an important physiological role and, consequently, biomarker significance. In addition, it requires large amount of sample, as it has relatively low sensitivity. Based on my studies, I have found that carbohydrates are not effected by formalin fixation, so they can be used in glycomic research. Capillary electrophoresis is a high-resolution technique, which enables the separation of isomers and anomers. Using laser-induced fluorescence, high sensitivity can be achieved.

In my thesis, I wanted to answer the following questions: 1) whether the oligosaccharide chain of glycoproteins was altered by formalin fixation and paraffin embedding, and 2) would it be possible to determine the complete N-glycan profile of FFPE tissue samples and identify each oligosaccharide structure. During my research, using standard glycoproteins, human sera and mouse tumor tissue samples I confirmed that formalin fixation and paraffin embedding did not change the number of N-glycan peaks detected and only slightly changed their distribution. In the glycomic analysis of FFPE mouse tissue samples, N-linked glycans extracted from different tissues produced distinct glycosylation profile of the tissue types. The exact structure of the oligosaccharides from the individual tissue samples was released by exoglycosidase matrix digestion. In summary, I have determined that FFPE samples are suitable for comprehensive N-glycan analysis. In the future, it would be possible to identify the sugar

structures from smaller amounts of materials with the development of sample preparation methods, and to carry out an analytical validation of the method with larger sample number.

7. Irodalomjegyzék

7.1 Dolgozat megírásához felhasznált irodalmak jegyzéke

- [1] P. Gagneux, A. Varki, Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function, *Glycobiology* 9(8) (1999) 747-55.
- [2] M.R. Wormald, R.A. Dwek, Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability, *Structure* 7(7) (1999) R155-60.
- [3] B.N. Vajaria, K.R. Patel, R. Begum, P.S. Patel, Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells, *Pathology oncology research : POR* 22(3) (2016) 443-7.
- [4] B. Donczo, Az oligoszacharidok szerepe a biológiai rendszerekben, *Szakedolgozat* (2009).
- [5] R. Tauber, W. Gerok, [Role of glycoproteins in the pathogenesis of peptic ulcer], *Z Gastroenterol* 25 Suppl 3 (1987) 88-96.
- [6] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G.W. Hart, M. Etzler, *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 2009.
- [7] E. Bieberich, Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins, *Adv Neurobiol* 9 (2014) 47-70.
- [8] A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology* 3(2) (1993) 97-130.
- [9] D.M. Ratner, E.W. Adams, M.D. Disney, P.H. Seeberger, Tools for glycomics: mapping interactions of carbohydrates in biological systems, *Chembiochem* 5(10) (2004) 1375-83.
- [10] M. Fukuda, H. Sasaki, M.N. Fukuda, Structure and role of carbohydrate in human erythropoietin, *Adv Exp Med Biol* 271 (1989) 53-67.
- [11] P. Moonen, J.J. Mermoud, J.F. Ernst, M. Hirschi, J.F. DeLamarter, Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage

colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(13) (1987) 4428-31.

[12] J.F. Caro, F. Cecchin, M.K. Sinha, Is glycosylation in the liver needed for insulin binding, processing, and action? Evidence for heterogeneity, *J Biol Chem* 259(20) (1984) 12810-6.

[13] C.C. Wang, J.R. Chen, Y.C. Tseng, C.H. Hsu, Y.F. Hung, S.W. Chen, C.M. Chen, K.H. Khoo, T.J. Cheng, Y.S. Cheng, J.T. Jan, C.Y. Wu, C. Ma, C.H. Wong, Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(43) (2009) 18137-42.

[14] K. Akita, S. Yoshida, Y. Ikehara, S. Shirakawa, M. Toda, M. Inoue, J. Kitawaki, H. Nakanishi, H. Narimatsu, H. Nakada, Different levels of sialyl-Tn antigen expressed on MUC16 in patients with endometriosis and ovarian cancer, *Int J Gynecol Cancer* 22(4) (2012) 531-8.

[15] M.C. Rose, J.A. Voynow, Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease, *Physiol Rev* 86(1) (2006) 245-78.

[16] J.L. Sonnenburg, J. Xu, D.D. Leip, C.H. Chen, B.P. Westover, J. Weatherford, J.D. Buhler, J.I. Gordon, Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont, *Science* 307(5717) (2005) 1955-9.

[17] C. Gough, J. Cullimore, Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions, *Mol Plant Microbe Interact* 24(8) (2011) 867-78.

[18] S.K. Mazmanian, C.H. Liu, A.O. Tzianabos, D.L. Kasper, An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system, *Cell* 122(1) (2005) 107-18.

[19] S. Grunewald, T. Imbach, K. Huijben, M.E. Rubio-Gozalbo, A. Verrips, J.B. de Klerk, H. Stroink, J.F. de Rijk-van Andel, J.L. Van Hove, U. Wendel, G. Matthijs, T. Hennek, J. Jaeken, R.A. Wevers, Clinical and biochemical characteristics of congenital disorder of glycosylation type Ic, the first recognized endoplasmic reticulum defect in N-glycan synthesis, *Ann Neurol* 47(6) (2000) 776-81.

- [20] M.A. Hynes, L.B. Buck, M. Gitt, S. Barondes, J. Dodd, T.M. Jessell, Carbohydrate recognition in neuronal development: structure and expression of surface oligosaccharides and beta-galactoside-binding lectins, *Ciba Found Symp* 145 (1989) 189-210; discussion 210-8.
- [21] D.S. Kim, Y.K. Hayashi, H. Matsumoto, M. Ogawa, S. Noguchi, N. Murakami, R. Sakuta, M. Mochizuki, D.E. Michele, K.P. Campbell, I. Nonaka, I. Nishino, POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG, *Neurology* 62(6) (2004) 1009-11.
- [22] A.S. Erdei, G; Prechl, J., *Immunológia, Medicina Könyvkiadó Zrt.* (2012).
- [23] J. Holmgren, I. Lonnroth, J. Mansson, L. Svennerholm, Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine, *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(7) (1975) 2520-4.
- [24] N. Hanai, G.A. Nores, C. MacLeod, C.R. Torres-Mendez, S. Hakomori, Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 and lyso-GM3 in tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor, *J Biol Chem* 263(22) (1988) 10915-21.
- [25] S.J. Yoon, K. Nakayama, T. Hikita, K. Handa, S.I. Hakomori, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50) (2006) 18987-91.
- [26] A. Kobata, M. Takeuchi, Structure, pathology and function of the N-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin, *Biochim Biophys Acta* 1455(2-3) (1999) 315-26.
- [27] A.R. Atkins, W.J. Gallin, G.C. Owens, G.M. Edelman, B.A. Cunningham, Neural cell adhesion molecule (N-CAM) homophilic binding mediated by the two N-terminal Ig domains is influenced by intramolecular domain-domain interactions, *J Biol Chem* 279(48) (2004) 49633-43.
- [28] H. Cremer, R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff, et al., Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning, *Nature* 367(6462) (1994) 455-9.

- [29] A. Rebbaa, J. Hurh, H. Yamamoto, D.S. Kersey, E.G. Bremer, Ganglioside GM3 inhibition of EGF receptor mediated signal transduction, *Glycobiology* 6(4) (1996) 399-406.
- [30] U. Coskun, M. Grzybek, D. Drechsel, K. Simons, Regulation of human EGF receptor by lipids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(22) (2011) 9044-8.
- [31] U. Lindahl, G. Backstrom, M. Hook, L. Thunberg, L.A. Fransson, A. Linker, Structure of the antithrombin-binding site in heparin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7) (1979) 3198-202.
- [32] N.M. Matsui, A. Varki, S.H. Embury, Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin, *Blood* 100(10) (2002) 3790-6.
- [33] R.D. Rosenberg, L. Lam, Correlation between structure and function of heparin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3) (1979) 1218-22.
- [34] R.L. Stevens, M.M. Kamada, W.E. Serafin, Structure and function of the family of proteoglycans that reside in the secretory granules of natural killer cells and other effector cells of the immune response, *Curr Top Microbiol Immunol* 140 (1989) 93-108.
- [35] S.D. Simpson, D.A. Ashford, D.J. Harvey, D.J. Bowles, Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants, *Glycobiology* 8(6) (1998) 579-83.
- [36] N.M. Varki, A. Varki, Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans, *Semin Thromb Hemost* 28(1) (2002) 53-66.
- [37] A. d'Azzo, D.J. Halley, A. Hoogeveen, H. Galjaard, Correction of I-cell defect by hybridization with lysosomal enzyme deficient human fibroblasts, *Am J Hum Genet* 32(4) (1980) 519-28.
- [38] A.P. Varki, M.L. Reitman, S. Kornfeld, Identification of a variant of mucopolidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12) (1981) 7773-7.

- [39] S. Kornfeld, Trafficking of lysosomal enzymes, *FASEB J* 1(6) (1987) 462-8.
- [40] R.D. Cummings, D.F. Smith, The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion, *Bioessays* 14(12) (1992) 849-56.
- [41] M. Cohen, A. Varki, Modulation of glycan recognition by clustered saccharide patches, *Int Rev Cell Mol Biol* 308 (2014) 75-125.
- [42] A.B. Diekman, Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg?, *Cell Mol Life Sci* 60(2) (2003) 298-308.
- [43] I. Schwab, M. Seeling, M. Biburger, S. Aschermann, L. Nitschke, F. Nimmerjahn, B cells and CD22 are dispensable for the immediate antiinflammatory activity of intravenous immunoglobulins in vivo, *Eur J Immunol* 42(12) (2012) 3302-9.
- [44] M.G. Rosenfeld, G. Kreibich, D. Popov, K. Kato, D.D. Sabatini, Biosynthesis of lysosomal hydrolases: their synthesis in bound polysomes and the role of co- and post-translational processing in determining their subcellular distribution, *The Journal of cell biology* 93(1) (1982) 135-43.
- [45] S.J. Lee, D. Nathans, Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors, *J Biol Chem* 263(7) (1988) 3521-7.
- [46] F.A. Baumeister, V. Herzog, Sulfation of thyroglobulin: a ubiquitous modification in vertebrates, *Cell Tissue Res* 252(2) (1988) 349-58.
- [47] G. Todderud, G. Carpenter, Presence of mannose phosphate on the epidermal growth factor receptor in A-431 cells, *J Biol Chem* 263(34) (1988) 17893-6.
- [48] P.A. Dennis, D.B. Rifkin, Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(2) (1991) 580-4.
- [49] A. Varki, Biological roles of glycans, *Glycobiology* 27(1) (2017) 3-49.
- [50] J. Wilson, A review of serologic problems caused by polyagglutinable red cells, *Am J Med Technol* 43(2) (1977) 147-55.

- [51] P.H. Schlesinger, T.W. Doebber, B.F. Mandell, R. White, C. DeSchryver, J.S. Rodman, M.J. Miller, P. Stahl, Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells. Studies with beta-glucuronidase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, ribonuclease B and agalactosomucoid, *Biochem J* 176(1) (1978) 103-9.
- [52] C.A. Gabel, D.E. Goldberg, S. Kornfeld, Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(3) (1983) 775-9.
- [53] A. Yaron, M. Klagsbrun, J.D. Esko, P. Leder, D.M. Ornitz, Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor, *Cell* 64(4) (1991) 841-8.
- [54] B. Schultze, H.J. Gross, H.D. Klenk, R. Brossmer, G. Herrler, Differential reactivity of bovine coronavirus (BCV) and influenza C virus with N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid (Neu5,9Ac2)-containing receptors, *Adv Exp Med Biol* 276 (1990) 115-9.
- [55] H.P. Kumar, C. Hague, T. Haley, C.M. Starr, M.J. Besman, R.L. Lundblad, D. Baker, Elucidation of N-linked oligosaccharide structures of recombinant human factor VIII using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, *Biotechnology and applied biochemistry* 24 (Pt 3) (1996) 207-16.
- [56] M.F. Chaplin, A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography, *Analytical biochemistry* 123(2) (1982) 336-41.
- [57] R.R. Townsend, M.R. Hardy, Analysis of glycoprotein oligosaccharides using high-pH anion exchange chromatography, *Glycobiology* 1(2) (1991) 139-47.
- [58] B.D. Prater, H.M. Connelly, Q. Qin, S.L. Cockrill, High-throughput immunoglobulin G N-glycan characterization using rapid resolution reverse-phase chromatography tandem mass spectrometry, *Analytical biochemistry* 385(1) (2009) 69-79.
- [59] H. Kawasaki, Y. Emori, K. Suzuki, Production and separation of peptides from proteins stained with Coomassie brilliant blue R-250 after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical biochemistry* 191(2) (1990) 332-6.

- [60] C. Hart, B. Schulenberg, T.H. Steinberg, W.Y. Leung, W.F. Patton, Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain, *Electrophoresis* 24(4) (2003) 588-98.
- [61] M. Fellenberg, A. Coksezen, B. Meyer, Characterization of picomole amounts of oligosaccharides from glycoproteins by ¹H NMR spectroscopy, *Angewandte Chemie* 49(14) (2010) 2630-3.
- [62] L. Lerner, A. Bax, Application of new, high-sensitivity, ¹H-¹³C-n.m.r.-spectral techniques to the study of oligosaccharides, *Carbohydrate research* 166(1) (1987) 35-46.
- [63] W. Gao, H. Li, Y. Liu, Y. Liu, X. Feng, B.F. Liu, X. Liu, Rapid and sensitive analysis of N-glycans by MALDI-MS using permanent charge derivatization and methylation, *Talanta* 161 (2016) 554-559.
- [64] A. Dell, H.R. Morris, Glycoprotein structure determination by mass spectrometry, *Science* 291(5512) (2001) 2351-6.
- [65] G.O. Staples, J. Zaia, Analysis of Glycosaminoglycans Using Mass Spectrometry, *Current proteomics* 8(4) (2011) 325-336.
- [66] A. Guttman, High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis, *Nature* 380(6573) (1996) 461-2.
- [67] R.H.-K. Kuhn, S., Capillary electrophoresis, (1993).
- [68] X. Song, B. Xia, S.R. Stowell, Y. Lasanajak, D.F. Smith, R.D. Cummings, Novel fluorescent glycan microarray strategy reveals ligands for galectins, *Chem Biol* 16(1) (2009) 36-47.
- [69] X. Song, J. Heimbürg-Molinaro, N.M. Dahms, D.F. Smith, R.D. Cummings, Preparation of a mannose-6-phosphate glycan microarray through fluorescent derivatization, phosphorylation, and immobilization of natural high-mannose N-glycans and application in ligand identification of P-type lectins, *Methods Mol Biol* 808 (2012) 137-48.
- [70] L.V. Hooper, J.I. Gordon, Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity, *Glycobiology* 11(2) (2001) 1R-10R.

- [71] T. Pochechueva, A. Chinarev, M. Spengler, E. Korchagina, V. Heinzelmann-Schwarz, N. Bovin, R. Rieben, Multiplex suspension array for human anti-carbohydrate antibody profiling, *Analyst* 136(3) (2011) 560-9.
- [72] T. Pochechueva, F. Jacob, D.R. Goldstein, M.E. Huflejt, A. Chinarev, R. Caduff, D. Fink, N. Hacker, N.V. Bovin, V. Heinzelmann-Schwarz, Comparison of printed glycan array, suspension array and ELISA in the detection of human anti-glycan antibodies, *Glycoconj J* 28(8-9) (2011) 507-17.
- [73] N. Razi, A. Varki, Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation, *Glycobiology* 9(11) (1999) 1225-34.
- [74] B. Donczo, J. Kerekgyarto, Z. Szurmai, A. Guttman, Glycan microarrays: new angles and new strategies, *Analyst* 139(11) (2014) 2650-7.
- [75] F. Blum, Formaldehyde, *Enzyklopadie d. mikroskop. Technik*, Urban & Schwarzenberg vol 1.(1) (1910) pp 478-492.
- [76] D. Chafin, A. Theiss, E. Roberts, G. Borlee, M. Otter, G.S. Baird, Rapid two-temperature formalin fixation, *PLoS One* 8(1) (2013) e54138.
- [77] S. Magdeldin, T. Yamamoto, Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues, *Proteomics* 12(7) (2012) 1045-58.
- [78] S. Barker, M. Weinfeld, D. Murray, DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences, *Mutat Res* 589(2) (2005) 111-35.
- [79] G. Mehes, L. Beke, [Tissue fixation in clinical practice: the 120-year-old formalin], *Orv Hetil* 155(14) (2014) 550-3.
- [80] C. Golgi, Une méthode pour la prompte et facile démonstration de l'appareil réticulaire interne des cellules nerveuses, *Arch. ital. Biol.* 49 (1908) 269-274.
- [81] D.D. Sabatini, K. Bensch, R.J. Barnett, Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation, *The Journal of cell biology* 17 (1963) 19-58.

- [82] H. Puchtler, F.S. Waldrop, H.M. Conner, M.S. Terry, Carnoy fixation: practical and theoretical considerations, *Histochemie. Histochemistry. Histochimie* 16(4) (1968) 361-71.
- [83] H. Puchtler, F.S. Waldrop, S.N. Meloan, M.S. Terry, H.M. Conner, Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations, *Histochemie. Histochemistry. Histochimie* 21(2) (1970) 97-116.
- [84] C.P. Mayers, Histological fixation by microwave heating, *J Clin Pathol* 23(3) (1970) 273-5.
- [85] Y. Sato, K. Mukai, S. Furuya, T. Kameya, S. Hirohashi, The AMeX method: a multipurpose tissue-processing and paraffin-embedding method. Extraction of protein and application to immunoblotting, *Am J Pathol* 140(4) (1992) 775-9.
- [86] M.E. Boon, L.P. Kok, Microwaves for immunohistochemistry, *Micron* 25(2) (1994) 151-70.
- [87] H.W. Sung, Y. Chang, I.L. Liang, W.H. Chang, Y.C. Chen, Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration, *J Biomed Mater Res* 52(1) (2000) 77-87.
- [88] J. Olert, K.H. Wiedorn, T. Goldmann, H. Kuhl, Y. Mehraein, H. Scherthan, F. Niketeghad, E. Vollmer, A.M. Muller, J. Muller-Navia, HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues, *Pathol Res Pract* 197(12) (2001) 823-6.
- [89] T.E. Godfrey, S.H. Kim, M. Chavira, D.W. Ruff, R.S. Warren, J.W. Gray, R.H. Jensen, Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, *J Mol Diagn* 2(2) (2000) 84-91.
- [90] P. Dedhia, S. Tarale, G. Dhongde, R. Khadapkar, B. Das, Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues, *Asian Pac J Cancer Prev* 8(1) (2007) 55-9.

- [91] S. Aviel-Ronen, C. Qi Zhu, B.P. Coe, N. Liu, S.K. Watson, W.L. Lam, M.S. Tsao, Large fragment Bst DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, *BMC Genomics* 7 (2006) 312.
- [92] A. Ribeiro-Silva, H. Zhang, S.S. Jeffrey, RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies, *BMC Mol Biol* 8 (2007) 118.
- [93] C. Dani, J.M. Blanchard, M. Piechaczyk, S. El Sabouty, L. Marty, P. Jeanteur, Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22) (1984) 7046-50.
- [94] K. Specht, T. Richter, U. Muller, A. Walch, M. Werner, H. Hofler, Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue, *Am J Pathol* 158(2) (2001) 419-29.
- [95] B. Zhang, J. Wang, X. Wang, J. Zhu, Q. Liu, Z. Shi, M.C. Chambers, L.J. Zimmerman, K.F. Shaddox, S. Kim, S.R. Davies, S. Wang, P. Wang, C.R. Kinsinger, R.C. Rivers, H. Rodriguez, R.R. Townsend, M.J. Ellis, S.A. Carr, D.L. Tabb, R.J. Coffey, R.J. Slebos, D.C. Liebler, C. Nci, Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer, *Nature* 513(7518) (2014) 382-7.
- [96] P. Mertins, D.R. Mani, K.V. Ruggles, M.A. Gillette, K.R. Clauser, P. Wang, X. Wang, J.W. Qiao, S. Cao, F. Petralia, E. Kawaler, F. Mundt, K. Krug, Z. Tu, J.T. Lei, M.L. Gatza, M. Wilkerson, C.M. Perou, V. Yellapantula, K.L. Huang, C. Lin, M.D. McLellan, P. Yan, S.R. Davies, R.R. Townsend, S.J. Skates, J. Wang, B. Zhang, C.R. Kinsinger, M. Mesri, H. Rodriguez, L. Ding, A.G. Paulovich, D. Fenyo, M.J. Ellis, S.A. Carr, C. Nci, Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer, *Nature* 534(7605) (2016) 55-62.
- [97] H. Zhang, T. Liu, Z. Zhang, S.H. Payne, B. Zhang, J.E. McDermott, J.Y. Zhou, V.A. Petyuk, L. Chen, D. Ray, S. Sun, F. Yang, L. Chen, J. Wang, P. Shah, S.W. Cha, P. Aiyetan, S. Woo, Y. Tian, M.A. Gritsenko, T.R. Clauss, C. Choi, M.E. Monroe, S. Thomas, S. Nie, C. Wu, R.J. Moore, K.H. Yu, D.L. Tabb, D. Fenyo, V. Bafna, Y. Wang, H. Rodriguez, E.S. Boja, T. Hiltke, R.C. Rivers, L. Sokoll, H. Zhu, I.M. Shih, L. Cope, A. Pandey, B. Zhang, M.P. Snyder, D.A. Levine, R.D. Smith, D.W. Chan, K.D. Rodland,

C. Investigators, Integrated Proteogenomic Characterization of Human High-Grade Serous Ovarian Cancer, *Cell* 166(3) (2016) 755-765.

[98] S. Tyanova, R. Albrechtsen, P. Kronqvist, J. Cox, M. Mann, T. Geiger, Proteomic maps of breast cancer subtypes, *Nature communications* 7 (2016) 10259.

[99] Y. Pozniak, N. Balint-Lahat, J.D. Rudolph, C. Lindskog, R. Katzir, C. Avivi, F. Ponten, E. Ruppin, I. Barshack, T. Geiger, System-wide Clinical Proteomics of Breast Cancer Reveals Global Remodeling of Tissue Homeostasis, *Cell systems* 2(3) (2016) 172-84.

[100] F.C. Thomas, J.; Reid-Shelton, Mannich reaction mechanisms, *J. Org. Chem.* 25(3) (1960) 419–423.

[101] B.M. Balgley, T. Guo, K. Zhao, X. Fang, F.A. Tavassoli, C.S. Lee, Evaluation of archival time on shotgun proteomics of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues, *J Proteome Res* 8(2) (2009) 917-25.

[102] M.S. Scicchitano, D.A. Dalmas, R.W. Boyce, H.C. Thomas, K.S. Frazier, Protein extraction of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue enables robust proteomic profiles by mass spectrometry, *J Histochem Cytochem* 57(9) (2009) 849-60.

[103] F.C. O'Mahony, J. Nanda, A. Laird, P. Mullen, H. Caldwell, I.M. Overton, L. Eory, M. O'Donnell, D. Faratian, T. Powles, D.J. Harrison, G.D. Stewart, The use of reverse phase protein arrays (RPPA) to explore protein expression variation within individual renal cell cancers, *J Vis Exp* (71) (2013).

[104] M. Pruess, W. Fleischmann, A. Kanapin, Y. Karavidopoulou, P. Kersey, E. Kriventseva, V. Mittard, N. Mulder, I. Phan, F. Servant, R. Apweiler, The Proteome Analysis database: a tool for the in silico analysis of whole proteomes, *Nucleic Acids Res* 31(1) (2003) 414-7.

[105] R. Longuespee, M. Fleron, C. Pottier, F. Quesada-Calvo, M.A. Meuwis, D. Baiwir, N. Smargiasso, G. Mazzucchelli, M.C. De Pauw-Gillet, P. Delvenne, E. De Pauw, Tissue proteomics for the next decade? Towards a molecular dimension in histology, *OMICS* 18(9) (2014) 539-52.

- [106] J.M. Spraggins, D.G. Rizzo, J.L. Moore, M.J. Noto, E.P. Skaar, R.M. Caprioli, Next-generation technologies for spatial proteomics: Integrating ultra-high speed MALDI-TOF and high mass resolution MALDI FTICR imaging mass spectrometry for protein analysis, *Proteomics* 16(11-12) (2016) 1678-89.
- [107] X. Yin, Y. Zhang, S. Guo, H. Jin, W. Wang, P. Yang, Large scale systematic proteomic quantification from non-metastatic to metastatic colorectal cancer, *Sci Rep* 5 (2015) 12120.
- [108] S. Wiese, K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, B. Warscheid, Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research, *Proteomics* 7(3) (2007) 340-50.
- [109] P. Stanley, H. Schachter, N. Taniguchi, N-Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [110] S. Toghi Eshghi, S. Yang, X. Wang, P. Shah, X. Li, H. Zhang, Imaging of N-linked glycans from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using MALDI mass spectrometry, *ACS Chem Biol* 9(9) (2014) 2149-56.
- [111] H. Debray, D. Decout, G. Strecker, G. Spik, J. Montreuil, Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins, *Eur J Biochem* 117(1) (1981) 41-55.
- [112] M.R. Groseclose, P.P. Massion, P. Chaurand, R.M. Caprioli, High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry, *Proteomics* 8(18) (2008) 3715-24.
- [113] J. Zaia, Mass spectrometry and the emerging field of glycomics, *Chem Biol* 15(9) (2008) 881-92.
- [114] A. Dell, A.J. Reason, K.H. Khoo, M. Panico, R.A. McDowell, H.R. Morris, Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers, *Methods Enzymol* 230 (1994) 108-32.

- [115] S. Yang, S. Toghi Eshghi, H. Chiu, D.L. DeVoe, H. Zhang, Glycomic analysis by glycoprotein immobilization for glycan extraction and liquid chromatography on microfluidic chip, *Anal Chem* 85(21) (2013) 10117-25.
- [116] A.V. Everest-Dass, M.T. Briggs, G. Kaur, M.K. Oehler, P. Hoffmann, N.H. Packer, N-Glycan MALDI Imaging Mass Spectrometry on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Enables the Delineation of Ovarian Cancer Tissues, *Mol Cell Proteomics* (2016).
- [117] A.D. Kelly, S.B. Breitkopf, M. Yuan, J. Goldsmith, D. Spentzos, J.M. Asara, Metabolomic profiling from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using targeted LC/MS/MS: application in sarcoma, *PLoS One* 6(10) (2011) e25357.
- [118] S. Patel, S. Ahmed, Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery, *J Pharm Biomed Anal* 107 (2015) 63-74.
- [119] A.H. Zhang, H. Sun, S. Qiu, X.J. Wang, Metabolomics in noninvasive breast cancer, *Clin Chim Acta* 424 (2013) 3-7.
- [120] T.H. Haukaas, S.A. Moestue, R. Vettukattil, B. Sitter, S. Lamichhane, R. Segura, G.F. Giskeodegard, T.F. Bathen, Impact of Freezing Delay Time on Tissue Samples for Metabolomic Studies, *Front Oncol* 6 (2016) 17.
- [121] J. Samuelson, P.W. Robbins, Effects of N-glycan precursor length diversity on quality control of protein folding and on protein glycosylation, *Semin Cell Dev Biol* 41 (2015) 121-8.
- [122] S. Richter, M. Peitzsch, E. Rapizzi, J.W. Lenders, N. Qin, A.A. de Cubas, F. Schiavi, J.U. Rao, F. Beuschlein, M. Quinkler, H.J. Timmers, G. Opocher, M. Mannelli, K. Pacak, M. Robledo, G. Eisenhofer, Krebs cycle metabolite profiling for identification and stratification of pheochromocytomas/paragangliomas due to succinate dehydrogenase deficiency, *J Clin Endocrinol Metab* 99(10) (2014) 3903-11.
- [123] A. Wojakowska, L. Marczak, K. Jelonek, K. Polanski, P. Widlak, M. Pietrowska, An Optimized Method of Metabolite Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for GC/MS Analysis, *PLoS One* 10(9) (2015) e0136902.
- [124] M.R. Wenk, The emerging field of lipidomics, *Nat Rev Drug Discov* 4(7) (2005) 594-610.

- [125] G. Li, L. Li, E.J. Joo, J.W. Son, Y.J. Kim, J.K. Kang, K.B. Lee, F. Zhang, R.J. Linhardt, Glycosaminoglycans and glycolipids as potential biomarkers in lung cancer, *Glycoconj J* (2017).
- [126] M. Gaudin, M. Panchal, S. Ayciriex, E. Werner, A. Brunelle, D. Touboul, C. Boursier-Neyret, N. Auzeil, B. Walther, C. Duyckaerts, O. Laprevote, Ultra performance liquid chromatography - mass spectrometry studies of formalin-induced alterations of human brain lipidome, *J Mass Spectrom* 49(10) (2014) 1035-42.
- [127] T. Fujiwaki, M. Tasaka, S. Yamaguchi, Quantitative evaluation of sphingomyelin and glucosylceramide using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with sphingosylphosphorylcholine as an internal standard. Practical application to tissues from patients with Niemann-Pick disease types A and C, and Gaucher disease, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 870(2) (2008) 170-6.
- [128] T. Taketomi, A. Hara, K. Uemura, E. Sugiyama, Rapid method of preparation of lysoglycosphingolipids and their confirmation by delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *J Biochem* 120(3) (1996) 573-9.
- [129] K. Arafah, R. Longuespee, A. Desmons, O. Kerdraon, I. Fournier, M. Salzet, Lipidomics for clinical diagnosis: Dye-Assisted Laser Desorption/Ionization (DALDI) method for lipids detection in MALDI mass spectrometry imaging, *OMICS* 18(8) (2014) 487-98.
- [130] G. Jarvas, M. Szigeti, A. Guttman, GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis, *Electrophoresis* 36(24) (2015) 3094-6.
- [131] M. Nagae, Y. Yamaguchi, Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins, *Int J Mol Sci* 13(7) (2012) 8398-429.
- [132] K. Mori, M. Emoto, M. Inaba, Fetuin-A: a multifunctional protein, *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 5(2) (2011) 124-46.
- [133] H.C. Joao, R.A. Dwek, Effects of glycosylation on protein structure and dynamics in ribonuclease B and some of its individual glycoforms, *Eur J Biochem* 218(1) (1993) 239-44.

- [134] G.S.M. Kammeijer, B.C. Jansen, I. Kohler, A.A.M. Heemskerk, O.A. Mayboroda, P.J. Hensbergen, J. Schappler, M. Wuhler, Sialic acid linkage differentiation of glycopeptides using capillary electrophoresis - electrospray ionization - mass spectrometry, *Sci Rep* 7(1) (2017) 3733.
- [135] D.J. Harvey, A.H. Merry, L. Royle, M.P. Campbell, R.A. Dwek, P.M. Rudd, Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds, *Proteomics* 9(15) (2009) 3796-801.
- [136] D. Hoja-Lukowicz, P. Link-Lenczowski, A. Carpentieri, A. Amoresano, E. Pochee, K.A. Artemenko, J. Bergquist, A. Litynska, L1CAM from human melanoma carries a novel type of N-glycan with Galbeta1-4Galbeta1- motif. Involvement of N-linked glycans in migratory and invasive behaviour of melanoma cells, *Glycoconj J* 30(3) (2013) 205-25.
- [137] B. Donczo, M. Szarka, J. Tovari, G. Ostoros, E. Csanky, A. Guttman, Molecular glycopathology by capillary electrophoresis: Analysis of the N-glycome of formalin-fixed paraffin-embedded mouse tissue samples, *Electrophoresis* 38(12) (2017) 1602-1608.

7.2 Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

Jelölt: Dönczö Boglárka
Neptun kód: XHA0G3
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.**, Kerékgyártó, 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., Kerékgyártó, 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.**, Kerékgyártó, 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.



8. Tárgyszavak/Keywords

glikoprotein, oligoszacharid, formalin, FFPE, kapilláris elektroforézis, glikánstruktúra

glycoprotein, oligosaccharide, formalin, FFPE, capillary electroporesis, glycan structure

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Guttman Andrásnak, a szakmai iránymutatásért és támogatásért, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönet illeti a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium munkatársait, akik segítették munkámat.

Köszönöm az Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztályának, hogy az egereket a rendelkezésemre bocsátották a kísérletekhez.

10. Függelék (megjelent publikációk)