



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Extracelluláris vezikulák glikomikai karakterizálása

OTDK dolgozat

Szerző:

Horváth Virág Nikolett
Egészségügyi mérnök MSc hallgató

Témavezetők:

Dr. Turiák Lilla
Tudományos főmunkatárs

Balbisi Mirjam
Tudományos segédmunkatárs

Belső konzulens:

Dr. Pécs Miklós
Egyetemi docens



Villamosmérnöki és
Informatikai Kar



HUN-REN Természettudományi
Kutatóközpont



Vegyészmérnöki és
Biomérnöki Kar

2025

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt és elsősorban témavezetőimnek, Dr. Turiák Lillának és Balbisi Mirjamnak szeretném kifejezni hálámat, akik folyamatos támogatásukkal, iránymutatásaikkal és türelmükkel nemcsak kutatómunkámat segítették, hanem emberileg is inspiráltak. Köszönöm, hogy minden kérdésemre készségesen válaszoltak, és mindig bátorítottak, amikor szükségem volt rá. Nélkülük ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

Szeretnék köszönetet mondani a Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport minden további tagjának, akik szakmai támogatásukkal és értékes tanácsaikkal gazdagították a munkámat. Köszönöm a közös ötleteléseket, beszélgetéseket és azt a barátságos, segítőkész légkört, amelyben a kutatásaimat végezhettem.

Köszönettel tartozom Dr. Schlosser Gittának, az MTA-ELTE Lendület Ionmobilitás-tömegspektrometria Kutatócsoport vezetőjének a GAG-ok méréseinek elvégzéséért.

Köszönet illeti Dr. Armel Nicolast, a Klosterneuburg-i Institute of Science and Technology Austria munkatársát a proteomikai mérések elvégzéséért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabó Zoltánnak és Dr. Kecskeméti Gábornak is, a Szegedi Tudományegyetem NeuroProteomikai és Lipidomikai Laboratóriumának munkatársainak a glikoproteomikai mérések elvégzéséért.

Köszönöm belső konzulensemnek, Dr. Pécs Miklósnak is, hogy támogatta a munkámat, valamint, hogy átnézte a dolgozatomat.

Végül pedig szeretném megköszönni a családomnak és a barátaimnak is a folyamatos támogatást és hogy mindig számíthatok rájuk.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítésjegyzék.....	5
Bevezetés és célkitűzések	7
1. Irodalmi áttekintés.....	8
1.1. A tüdőrák és vizsgálata	8
1.2. A glikoziláció rákban betöltött szerepe	8
1.3. Glikoproteinek és proteoglikánok	9
1.3.1. Az <i>N</i> -glikoziláció	11
1.3.2. A glükózaminoglikánok tulajdonságai	12
1.4. Glikoproteinek analitikai vizsgálati lehetőségei	13
1.4.1. Fehérjék vizsgálata	16
1.4.2. GAG-ok vizsgálata	21
1.5. Az EV-k glikomikai vizsgálatára alkalmazott munkafolyamat bemutatása	24
2. Kísérletek leírása.....	26
2.1. Felhasznált anyagok, eszközök adatai.....	26
2.2. A mérésekhez használt műszerek, programok adatai.....	27
2.3. Sejtenyésztés, előtisztítás	28
2.4. sEV-k izolálása.....	28
2.5. Frakciók vizsgálata MRPS-sel	29
2.6. Frakciók betöményítése és oldószercsere.....	30
2.7. Feltárás	30
2.8. Proteomikai emésztés	30
2.9. Acetonos kicsapás	31
2.10. GAG-ok emésztése.....	31
2.11. Tisztítási módszerek.....	32
2.12. Kromatográfias és tömegspektrometriás mérési paraméterek	32
2.13. Szoftveres kiértékelések.....	34
2.13.1. Fehérjék szoftveres kiértékelése.....	34
2.13.2. <i>N</i> -glikoproteinek szoftveres kiértékelése	35
2.13.3. Glükózaminoglikánok szoftveres kiértékelése.....	37

3. Eredmények és értékelésük	38
3.1. sEV-k proteomikai jellemzése	38
3.2. sEV-k <i>N</i> -glikoproteomikai jellemzése	39
3.3. sEV-k glükózaminoglikán jellemzése	47
Konklúzió	54
Irodalomjegyzék	55
Függelék	66

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Jelentés
ACN	Acetonitril
Arg	Arginin
Asn	Aszparagin
BEBM	Bronchiális hámsejt bazális médium
BEGM	Bronchiális hámsejt növesztő médium („ <i>bronchial epithelial growth medium</i> ”)
CE	Kapilláris elektroforézis
CS	Kondroitin-szulfát
CSPG	Kondroitin-szulfát proteoglikán
DDA	Adatfüggő analízis („ <i>data dependent acquisition</i> ”)
DIA	Adatfüggetlen analízis („ <i>data independent acquisition</i> ”)
DS	Dermatán-szulfát
DTT	Ditiotreitol
ECM	Extracelluláris mátrix
ESI	Elektroporlasztásos ionizáció („ <i>electrospray ionisation</i> ”)
EV	Extracelluláris vezikula
FBS	Magzati marha szérum („ <i>fetal bovine serum</i> ”)
FDR	Hibás találati arány („ <i>false discovery rate</i> ”)
Fuc	Fukóz
GAG	Glükózaminoglikán
GalNAc	N-acetil-galaktózamin
GlcA	Glükuronsav
GlcNAc	N-acetil-glükózamin
HA	Hialuronsav
HILIC	Hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia
HILIC-WAX	Hidrofil interakciós kölcsönhatáson és gyenge anioncserén alapuló kromatográfia („ <i>hydrophilic interaction liquid chromatography with a weak anion exchange</i> ”)
HPLC	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia („ <i>high performance liquid chromatography</i> ”)
HPLC-MS	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria („ <i>high performance liquid chromatography – mass spectrometry</i> ”)
HS	Heparán-szulfát
IAA	Jódacetamid
IdoA	Iduronsav
IR	Infravörös spektroszkópia
LC	Folyadékkromatográfia („ <i>liquid chromatography</i> ”)
KS	Keratán-szulfát
Lys	Lizin
Lys-C	A lizinmaradék C-terminális oldala
MALDI	Mátrix-szal segített lézerdeszorpciós ionizáció
MRPS	Mikrofluidikus rezisztív impulzus technika („ <i>microfluidic resistive pulse sensing</i> ”)
MS	Tömegspektrometria

MS/MS	Tandem tömegspektrometria
m/z	Tömeg/töltés
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	Foszfáttal puffertelt sóoldat („ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PCA	Főkomponens-analízis („ <i>principal component analysis</i> ”)
PG	Proteoglikán
PGC	Porózus grafit állófázis („ <i>porous graphitic carbon</i> ”)
PTM	Poszt-transzlációs módosulás
RP-IC	Fordított fázisú ionpár kromatográfia („ <i>reversed-phase ion chromatography</i> ”)
RP-LC	Fordított fázisú folyadékkromatográfia („ <i>reversed-phase liquid chromatography</i> ”)
Q	Kvadrupól („ <i>quadrupole</i> ”) analizátor
SEC	Méretkizárásos kromatográfia („ <i>size exclusion chromatography</i> ”)
Ser	Szerin
sEV	Kisméretű extracelluláris vezikula („ <i>small extracellular vesicle</i> ”)
SPE	Szilárd fázisú extrakció („ <i>solid phase extraction</i> ”)
Thr	Treonin
TFA	Trifluoecetsav
TMT	„ <i>Tandem mass tag</i> ”
TOF	Repülési idő („ <i>time of flight</i> ”) analizátor
UHPLC–MS	Ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria

Bevezetés és célkitűzések

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) kicsi (30-1000 nm-es), lipidekkel határolt részecskék, melyeket az extracelluláris környezetbe szabadítanak fel a sejtek, és amelyek kulcsfontosságú szerepet játszanak az intercelluláris kommunikációban. A változatos biomolekulákat (például fehérjéket, lipideket és nukleinsavakat) tartalmazó, 30-150 nm-es mérettartományba eső kisméretű extracelluláris vezikulák (*small extracellular vesicle*, sEV) az EV-k egy alcsoportja [1-3], melyek különféle testfolyadékokban is megtalálhatóak (például vér, vizelet, nyál). Az sEV-k nemcsak az egészséges sejtek közötti kommunikációban vesznek részt, hanem kardinális szerepet töltenek be bizonyos betegségekben, többek között a daganatos megbetegedések progressziójában is, emiatt vizsgálatuk rendkívül fontos [4, 5].

Munkám céljával tűztük ki az A549 tüdő adenokarcinóma sejtvonalból, valamint a BEAS-2B nem tumoros sejtvonalból izolált sEV fehérjék glikozilációs poszt-transzlációs módosulásainak (PTM) (*N*-glikoziláció, kondroitin-szulfát (CS) glükózaminoglikánok (GAG)) karakterizálását. Az A549 sejtvonalak sEV-inek izolálásához a sejteket magzati marha szérumot (*fetal bovine serum*, FBS) nem tartalmazó F12 médiumban tenyésztettük, a BEAS-2B sejtvonalak sEV-inek izolálásához pedig bronchiális hámsejt növesztő médiumban (*bronchial epithelial growth medium*, BEGM) tenyésztettük a sejteket 72 órán át. Az sEV-ket ezt követően mini méretkizárásos kromatográfiával (*size exclusion chromatography*, SEC) izoláltam saját készítésű oszlopokon. Az sEV-kben gazdag frakciókat betöményítettem, oldószercserét végeztem, majd egymás utáni fagyasztási-olvasztási ciklusokkal tártam fel az sEV-ket. A 6-6 párhuzamosan izolált vezikulákból a feltárást követően a mintákat tripszinnel, illetve kondroitináz ABC enzimekkel emésztettem meg, ezáltal az azokat alkotó fehérjéket peptidekké, a CS GAG-okat pedig CS diszacharidokká hasítottam. A triptikus emésztményből az *N*-glikopeptideket acetonos kicsapás segítségével dúsítottam, míg a felülúszóban a nem glikozilált peptidek maradtak. Tisztítás után nanoUHPLC-MS(MS)-sel analizáltam a minták peptid, *N*-glikopeptid és CS diszacharid összetevőit.

Munkám további célja volt a kétféle sejtvonal közötti biológiai különbségek (a glikozilációs mintázatok megváltozásának, illetve a GAG profilok közötti eltérések) karakterizálása. Ezen különbségek feltárása nagymértékben hozzájárulhat a daganatos megbetegedések folyamatainak jobb megértéséhez, valamint a potenciális diagnosztikai és gyógyszeres támadáspontok felfedezéséhez.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A tüdőrák és vizsgálata

A tüdőrák világszerte a rák okozta halálozás vezető oka mind a férfiak, mind a nők körében [6-8]. A WHO szerint a tüdőrákot két, szövettanilag különálló típusba lehet sorolni a rosszindulatú sejtek mérete és megjelenése alapján; ezek szerint megkülönböztetünk kissejtes és nem kissejtes tüdőrákot. A tüdőrákos megbetegedések több, mint 80 %-át a nem kissejtes tüdőrák teszi ki, amely tovább kategorizálható adenokarcinómára, laphámsejtes karcinómára és nagysejtes karcinómára [9]. A különféle kezelések, mint például a kemoterápia fejlődése ellenére a tüdőrákban szenvedő betegek klinikai prognózisa továbbra is gyenge, melynek legfőbb oka az, hogy a diagnózis megállapításakor a legtöbb tüdőrákos beteg már előrehaladott stádiumban van. Emiatt különösen fontos a tüdőrák diagnosztikai módszereinek javítása, valamint újabb diagnosztikai és prognosztikai biomarkerek felfedezése [6].

Az A549 egy általánosan használt sejtvonala a tüdőrák kutatásában, amelyet egy 58 éves, tüdő adenokarcinómában szenvedő kaukázusi fehér férfiből izoláltak [10, 11]. Az A549 sejtek hámszerűek, és széles körben alkalmazzák azokat *in vitro* modellként a tüdőrák biológia, a gyógyszerészítés és a daganatok progressziójának, valamint a metasztázis mechanizmusainak tanulmányozására. A BEAS-2B sejtvonala egy immortalizált humán bronchiális hámsejtvonala, amelyet egy nem rákos egyén normál hörgőhámsejteiből származtattak [12, 13]. A BEAS-2B sejteket gyakran használják egészséges kontrollként a tüdőrák kutatásában, hogy összehasonlítsák a rákos sejtvonallal, például az A549-cel, azaz a BEAS-2B modellként szolgál a normál hörgőhámsejtek biológiájának tanulmányozására.

1.2. A glikoziláció rákban betöltött szerepe

A rákos megbetegedésekből fakadó halálesetek nagy részét a késői diagnózis és a hatékony célzott terápiák hiánya okozza [14]. A jelenlegi kezelések többnyire a hagyományos kemoterápiára támaszkodnak, néhány célzott terápiával kiegészítve. Sok kísérleti bizonyíték van arra, hogy a rákos biológiai minták jóval diverzebb fehérjegylikozilációs profilokkal rendelkeznek a nem tumorosakhoz képest [15-18]. Mivel a tumorsejtek glikánokban gazdagok, és a karakterisztikus glikánvázak egyedileg jelennek meg a tumorsejteken, ezek nagyon jó célpontokként szolgálhatnak a diagnosztika, valamint a prognózis szempontjából.

A glikoziláció rendellenessége többféle módon is befolyásolja a rák kialakulását és progresszióját [14]. Ezek közül az egyik a sejtek adhéziójának és metasztázisának

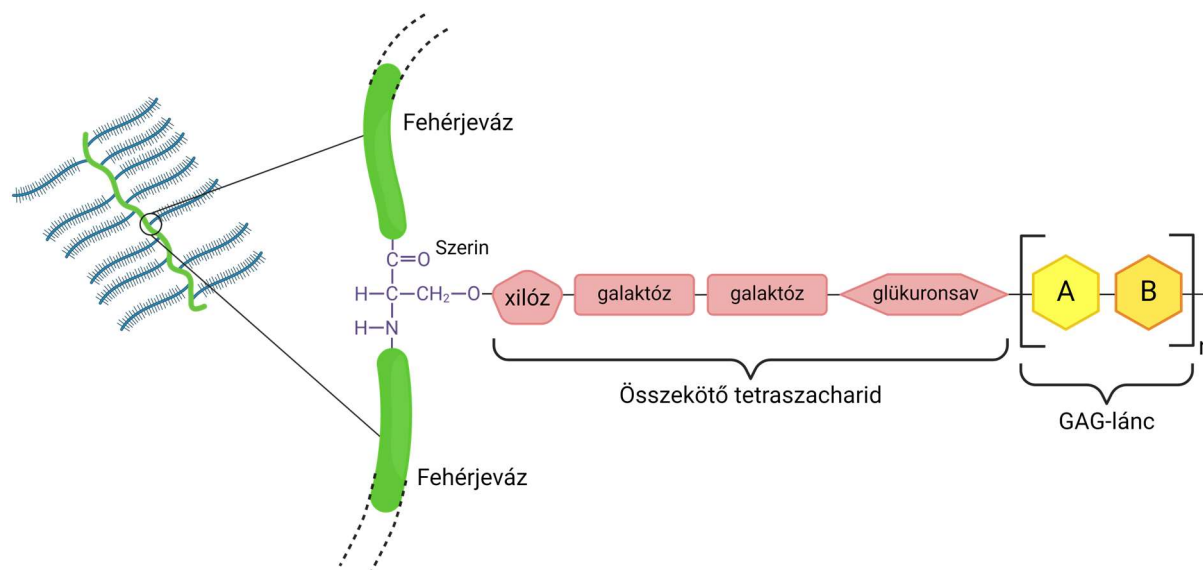
manipulációja. A sejtfelszíni fehérjék glikozilációs mintázatainak megváltozása fokozza a komplex elágazó *N*-glikánok, valamint a csonka *O*-glikánok expresszióját (azaz az abnormális glikán expressziót) a sejtfelszíni fehérjéken, amelyek az extracelluláris mátrixszal (ECM) lépnek kölcsönhatásba. A membrán-lokalizált glikánok abnormális expressziója jelentősen megkönnyíti a sejtek rosszindulatúvá válásához szükséges sajátosságok megszerzését azáltal, hogy lehetővé teszi a rákos sejtek leválását az elsődleges daganatról és a távolabbi helyekre történő elszállításukat, azaz az áttétképződést [19-21].

A glikoziláció megváltozása a tumor mikrokörnyezetének összetételét és tulajdonságait is befolyásolja az ECM átalakításán (ld. 1.3. fejezet), valamint a sejt-sejt és sejt-mátrix interakciók és az immunfelismerés módosításán keresztül [14]. Ezek a változások kedvező környezetet hoznak létre a tumor növekedéséhez és az immunszuppresszióhoz. A sejtfelszíni antigének megváltozott glikozilációja például megakadályozza az immunsejtek felismerését és megcélzását, ezáltal lehetővé téve a daganat számára az immunrendszer kijátszását és a további növekedést. A rendellenes glikozilációs mintázatok gyakran társulnak a különböző ráktípusokhoz, ennek köszönhetően biomarkerekként szolgálhatnak a betegség diagnózisának felállításához, valamint annak progressziójának megfigyeléséhez.

1.3. Glikoproteinek és proteoglikánok

A proteomika egy biológiai rendszerben előforduló összes fehérje tulajdonságainak vizsgálatával foglalkozó tudományterület [22]. Céljai között szerepel a fehérjék azonosítása, mennyiségi meghatározása, szerkezeti és funkcionális analízise, valamint a fehérjék közötti kölcsönhatások feltérképezése. A fehérjék biológiai funkciójuk betöltéséhez számos változáson mennek keresztül szintézisüket követően, például enzimatiszus folyamatok által poszt-transzlációs módosulások (PTM) jönnek rajtuk létre [23]. A PTM olyan kovalens módosítást jelent, amely során nem fehérje jellegű csoportok kapcsolódnak a fehérjéhez. A PTM-ek alapvetően befolyásolják az egyes fehérjék biológiai funkcióit: az aktivitásukat, lokalizációjukat, valamint más fehérjékkel való kölcsönhatásaikat. Egy gyakori PTM a glikoziláció, melynek során szénhidrát-szerkezetek kapcsolódnak a fehérjék meghatározott aminosavainak oldalláncához, ennek eredményeként pedig glikoproteinek jönnek létre. Az emberi fehérjéknek igen jelentős része, mintegy 80 %-a glikozilált formában van jelen a szervezetben, ami jól kiemeli a glikoziláció különböző élettani folyamatokban betöltött központi szerepét [24]. A glikoproteineknek több alosztálya is van, melyek közül a legfontosabbak az *N*-glikoproteinek, az *O*-glikoproteinek, valamint a proteoglikánok (PG). Az *N*-glikoziláció során a glikánok az aszparagin (Asn) amid csoportjához kapcsolódnak hozzá az

Asn-X-Ser/Thr konszenzus szekvenciában, ahol X a prolint kivéve bármely aminosav lehet [25]. Az *O*-glikoziláció során a glikán láncok főként a szerin (Ser) vagy treonin (Thr) oldallánc hidroxilcsoportjához kapcsolódnak, leggyakrabban egy *N*-acetyl-galaktózamin (GalNAc) egységen keresztül [26]. A PG-knél nagyméretű lineáris poliszacharidok, glükózaminoglikánok (GAG) kapcsolódnak a fehérjevázhoz [23, 27]. A kapcsolódás a kondroitin-szulfát (CS) és heparán-szulfát (HS) osztályok esetén szerineknél, tetraszacharid összekötő (linker) régió keresztül történik (1. ábra).



1. ábra – A proteoglikánok sematikus szerkezete (készült: Tóth és mtsai [23] ábrája alapján). A központi fehérjékhez kapcsolódó GAG láncok ismétlődő diszacharid egységekből állnak (A: hexuronsav/galaktóz, B: hexózamin)

A fehérje-GAG interakcióknak számos funkciója lehet (például immobilizálás, proteolízis elleni védelem), emiatt a PG-k számos biológiai folyamatban kritikus szerepet játszanak. Két fő elhelyezkedési területük a sejtek felszíne, valamint az ECM. Az ECM egy nem sejtes háromdimenziós alkotóelem, amely minden szövetben és szervben jelen van [28]. Nemcsak alapvető fizikai „állványzatot” biztosít a sejtes alkotóelemek számára, hanem elindítja a szöveti morfogenezishez, differenciálódáshoz, valamint a homeosztázishoz szükséges biokémiai parancsokat is [29]. Habár az ECM fő komponensei ugyanazok, mégis minden szövet egyedi fizikai, topológiai és biokémiai összetételű ECM-mel rendelkezik. Az ECM nemcsak szövet-specifikus, hanem meglehetősen heterogén is, azaz a biokémiai és biomechanikai tulajdonságai óriási mértékben eltérőek lehetnek nemcsak a különböző szövet típusokban, hanem akár egy szöveten belül, valamint a különböző élettani állapotokban is (egészséges/rákos) [23, 27, 29]. Ennek oka az, hogy a sejtek közötti kommunikáció miatt az ECM folyamatos enzimatikus és nem-enzimatikus átalakulásokon megy keresztül, ennek köszönhetően

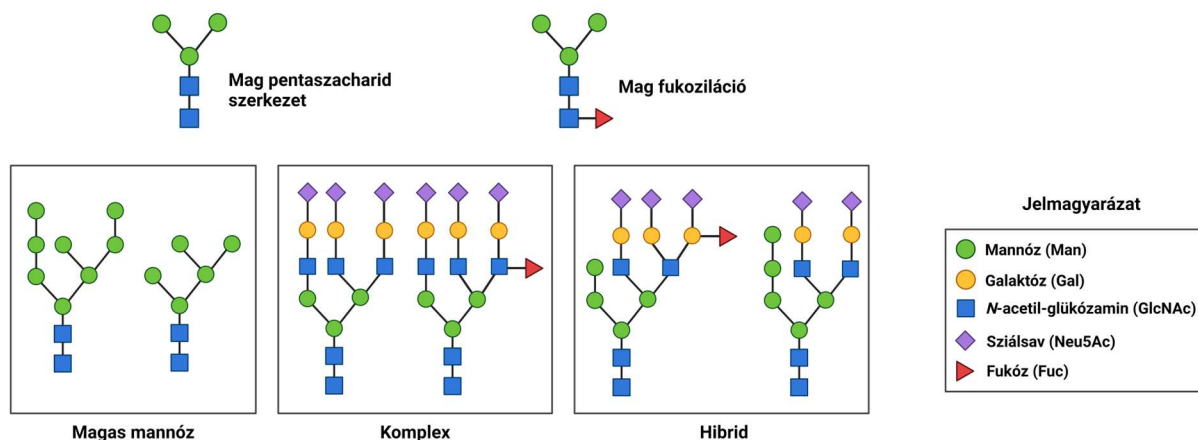
meglehetősen dinamikus struktúrával rendelkezik, molekuláris komponensei pedig számtalan PTM-nek vannak kitéve.

A PG-k számos biológiai funkciót látnak el, melyek közül a legfontosabb az ECM jelátviteli folyamatainak szabályozása. Emellett számos olyan sejtfelszíni jelátviteli folyamatot is befolyásolnak, amelyek a sejtek életciklusára hatnak ki, illetve a növekedési faktor receptorokkal is kölcsönhatásba lépnek [30, 31]. A rák kialakulása során a GAG-ok szerkezetének megváltozása különböző módokon segítheti elő a tumorképződést, ezáltal módosítva a PG-k funkcióit. A tumorsejtek olyan növekedési faktorokat választanak ki, amelyek serkentik azok további növekedését. Ezenkívül a rosszindulatú sejtek részt vesznek az ECM újjászervezésében is: módosítják a tumor mikrokörnyezetében a PG expressziót, hogy ezáltal megkönnyítsék önmaguk növekedését és később az áttétképződést [30].

1.3.1. Az *N*-glikoziláció

Az előző fejezetben már említettem, hogy az *N*-glikoziláció során a glikánok az Asn amid csoportjához kapcsolódnak hozzá az Asn-X-Ser/Thr konszenzus szekvenciában, ahol X a prolint kivéve bármely aminosav lehet [25]. Minden eukarióta *N*-glikánnak közös a mag pentaszacharid szerkezete: $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Ez a mag épülhet tovább és ágazhat el az *N*-glikánok három fő csoportjára [32]: magas mannóztartalmú, komplex vagy hibrid *N*-glikánokká (2. ábra). A magas mannóztartalmú *N*-glikánok a magszerkezeten kívül csak mannóz egységeket tartalmaznak. A komplex *N*-glikánok esetén az antenna felépítése többnyire fix: különféle cukrokat, például galaktózt, szialsavat és GalNAc-ot tartalmaznak. A hibrid *N*-glikánok mind a magas mannóztartalmú, mind pedig a komplex *N*-glikánok jellemzőit magukban foglalják. A mag fukoziláció (α 1-6 fukoziláció) során a fukóz közvetlenül a mag pentaszacharid szerkezetéhez, azon belül a glikán legbelső részéhez, az *N*-acetyl-glükózaminhoz (GlcNAc) kapcsolódik hozzá [33]. Ezzel szemben az antenna fukoziláció során a fukóz az oligoszacharid oldalláncok (antennák) cukormaradékaihoz (gyakran a galaktózhoz) kötődik α 1-3 vagy α 1-4 kötéssel, amely jelentős mértékben megváltoztatja a glikánok tulajdonságait. A glikán egységek nevezéktanában a monoszacharidok esetén az egyedi cukoregységeket gyakran három betűs kódokkal rövidítik, például Fuc (fukóz) [34]. A monoszacharidok közötti kapcsolatot számok és betűk jelzik, amelyek leírják a kötésben részt vevő szénatomokat és a glikozilációs kapcsolat típusát, például a $\text{Man}(\alpha$ 1-3) Man rövidítés egy α 1-3 kötést jelez két mannóz maradék között. Az elágazási pontok és kiterjesztések részletes struktúrákban vannak feltüntetve, gyakran diagramon ábrázolják azokat. A Funkcionális Glikomikai Konzorcium kifejlesztett egy szabványosított, szimbólumokból álló nevezéktant a glikánok grafikus ábrázolására [35-37].

Ezekben az egyes formák és színek különböző monoszacharidokat jelölnek, megkönnyítve ezzel a bonyolult glikánszerkezetek megjelenítését és megértését (2. ábra).



2. ábra – Az *N*-glikánok alapváza, a mag fukoziláció és a három fő *N*-glikán típus

1.3.2. A glükózaminoglikánok tulajdonságai

A GAG láncok lineáris heteropoliszacharidok, amelyek *N*-acetilált uronsav/galaktóz és hexózamin ismétlődő diszacharid egységekből állnak [27, 38]. Négy alapvető GAG-osztály különböztethető meg az ismétlődő egységekben lévő monoszacharidok típusai alapján [38-40]: a hialuronsav/hialuronán (HA), a keratán-szulfát (KS), a kondroitin-szulfát (CS)/dermatán-szulfát (DS), és a heparán-szulfát (HS)/heparin (Hep) (1. táblázat).

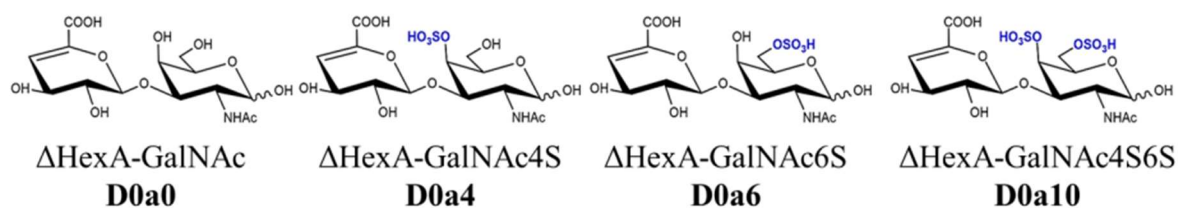
1. táblázat – A négyféle GAG-osztály szerkezetei. A kék S betű a lehetséges szulfatálás helyét jelöli; a HS esetén az *N*-szulfatálás (piros N betű) helyett lehetséges az *N*-acetilálás is [41]

GAG osztály neve	Szerkezeti képlet
Hialuronsav/hialuronán (HA)	
Keratán-szulfát (KS)	
Kondroitin-szulfát (CS)/dermatán-szulfát (DS)	
Heparán-szulfát (HS)/Heparin (Hep)	

A GAG-ok változatos szerkezetüknek köszönhetően számos sejtműködést befolyásoló funkcióval rendelkeznek. A CS rendkívül széles körben megtalálható az emberi szervezetben

[42-44]. Láncainak ismétlődő egységei egy glükuronsavból (GlcA) és egy GalNAc-ból állnak [45], melyek leginkább a sejtek felszínén, valamint az ECM-ben PG-okként fordulnak elő. A DS a CS-tól annyiban különbözik, hogy a GlcA helyett iduronsav (IdoA) van a szerkezetében (habár néhány hexuronsav monoszacharid is lehet GlcA). A CS számos kulcsfontosságú molekulával lép kölcsönhatásba (például növekedési faktorokkal, adhéziós molekulákkal és lipoproteinekkel), amelyek számos biológiai folyamatot, valamint a sejtek viselkedését is szabályozzák [46]. A CS láncok fehérjékhez való kapcsolódásakor kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG-k) jönnek létre. A CSPG-k bioszintetikus egyensúlyzavarához számos betegség társul, ilyenek például a csontrendszeri rendellenességek, a szív és érrendszeri megbetegedések, valamint a daganatos elváltozások is. A CSPG-k mennyisége jelentősen megnövekszik ezen betegségek kezdetén, ezáltal fontos szerepet töltve be a lipidek visszatartásában, módosításában, végül pedig a felhalmozásukban.

A CS ismétlődő diszacharidokat tartalmazó láncokban az GalNAc egység C4 és C6 pozíciójában egyaránt előfordulhatnak szulfátcsoportok, így beszélhetünk nem szulfatált (Lawrence kód: D0a0), egyszeresen szulfatált (Lawrence kódok: D0a4 illetve D0a6), valamint kétszeresen szulfatált (Lawrence kód: D0a10) CS diszacharidokról (3. ábra) [40].



3. ábra – A különböző szulfatáltságú CS diszacharidok szerkezete, valamint azok Lawrence-kódjai [47, 48]

1.4. Glikoproteinek analitikai vizsgálati lehetőségei

Az előző fejezetből látható, hogy a PG-k az ECM meghatározó összetevői, és az *N*-glikoziláció mellett döntő szerepet játszanak a különböző fiziológiai folyamatokban [27, 49]. Ezért a proteomikai és glikomikai analízis kulcsfontosságú a fehérjék, a glikoproteinek és a GAG-ok biológiai funkcióinak, valamint a betegségekben betöltött szerepük pontosabb megértéséhez [50]. Azonban a biológiai mátrixok szerkezeti diverzitása és komplexitása miatt a teljeskörű vizsgálat meglehetősen nagy kihívás [51]. Az általános elemzés során a fehérjék és a GAG-ok vizsgálata kizárólag külön lehetséges, viszont ennek köszönhetően pontosabb kép kapható azok rendkívül összetett szerkezetéről, tulajdonságairól és biológiai szerepéről.

A tömegspektrometria (MS) egy nagyműszeres szerkezetvizsgálati és analitikai módszer, amely egyre nagyobb teret hódít a molekuláris biológia, proteomika és a glikomika

területén [22, 52]. A tömegspektrometriás analízis előnye, hogy kis anyagmennyiségű komplex biológiai minták komponenseinek kvalitatív és kvantitatív meghatározására egyaránt alkalmas. A tömegspektrometrias analízis mellett szól az extrém érzékenység és a kromatográfiával történő kapcsolás lehetősége is. További előnye, hogy kifejezetten szelektív technikának tekinthető, ugyanis nagyon kis szerkezeti (molekulatömegbeli) különbségek kimutatására és párhuzamos elemzésére alkalmas.

A fehérjék és peptidek vizsgálatára napjainkban az elektroporlasztásos ionizációt (*electrospray ionization*, ESI), valamint ennek nanoáramlásos verzióját (nanoESI) és a mátrixszal segített lézerdeszorpciós ionizációt (MALDI) alkalmazzák [22]. Az ESI-nél a folyékony halmazállapotú mintaoldat kapillárison keresztül jut az ionforrásba, ahol nagy feszültség alkalmazása, porlasztógáz és fűtés segíti az ionizációt. Az elektroporlasztásos MS nagyon érzékeny módszer, mely kis és nagy tömegű molekulák, pozitív és negatív ionok, erősen poláris/ionos komponensek vizsgálatára is alkalmas. Előnye, hogy könnyen kapcsolható kromatográfiával, és mennyiségi meghatározásra is alkalmazható [22, 53]. Fontos tulajdonsága, hogy kevésbé tolerálja a szerves sókat és a nem illékony szennyezőket, ezért a kromatográfiás rendszerben csak illékony puffer használható. Az ionizációs folyamat során többszörösen töltött molekulaionok is keletkezhetnek, ezért alkalmas nagy molekulatömegű fehérjék, glikoproteinek, peptidek, oligonukleotidok, polimerek szerkezeti meghatározására. Az ESI ionforráson keresztül a tömegspektrométer folyadékkromatográffal közvetlenül kapcsolható, ezt nevezzük HPLC-MS-nek (*high performance liquid chromatography – mass spectrometry*). A nanoHPLC előnye a normál HPLC-hez képest az, hogy jóval kisebb a kapilláris átmérője és benne a folyadék áramlási sebessége is, így az nanoESI-vel kapcsolva nagyobb ionizációs hatékonyságot és érzékenységnövekedést biztosít [54]. Használata olyan esetekben ideális, amikor nagyon kevés a minta mennyisége.

A MALDI módszer során a mintát olyan szerves mátrixban oldják fel, amely az alkalmazott lézer hullámhosszán jelentősen abszorbeál [22, 55]. Az oldatot felviszik a mintatartó lemezre, amit hagynak megszáradni, ezután lézerrel besugározzák azt. A mátrix a lézersugárzás elnyelt energiájával gerjeszti a minta molekuláit és segíti azok ionizációját [56]. Legnagyobb előnye, hogy kiválóan alkalmas szintetikus makromolekulák és fehérjék vizsgálatára, a nagy molekulatömegű intakt fehérjék vizsgálatának gyakran alkalmazott ionizációs módszere. Meglehetősen érzékeny módszer, fragmentáció nem jellemző rá. Előnye, hogy toleráns sószennyezésre, és alkalmas keverékek direkt analízisére [22]. Hátránya, hogy on-line nem kapcsolható elválasztástechnikai módszerekkel, mivel a vizsgálat előtt a minta

kristályosítása szükséges. Hátránya továbbá az is, hogy nagy tömegű molekulák esetén a molekulacsúcs széles lehet, valamint mennyiségi meghatározásra csak nagyon korlátozottan alkalmas. Az ESI-vel történő mérések reprodukálhatósága jobb, mint a MALDI ionforrással történő analíziseké a MALDI-nál alkalmazott kristályosítás rossz reprodukálhatósága miatt.

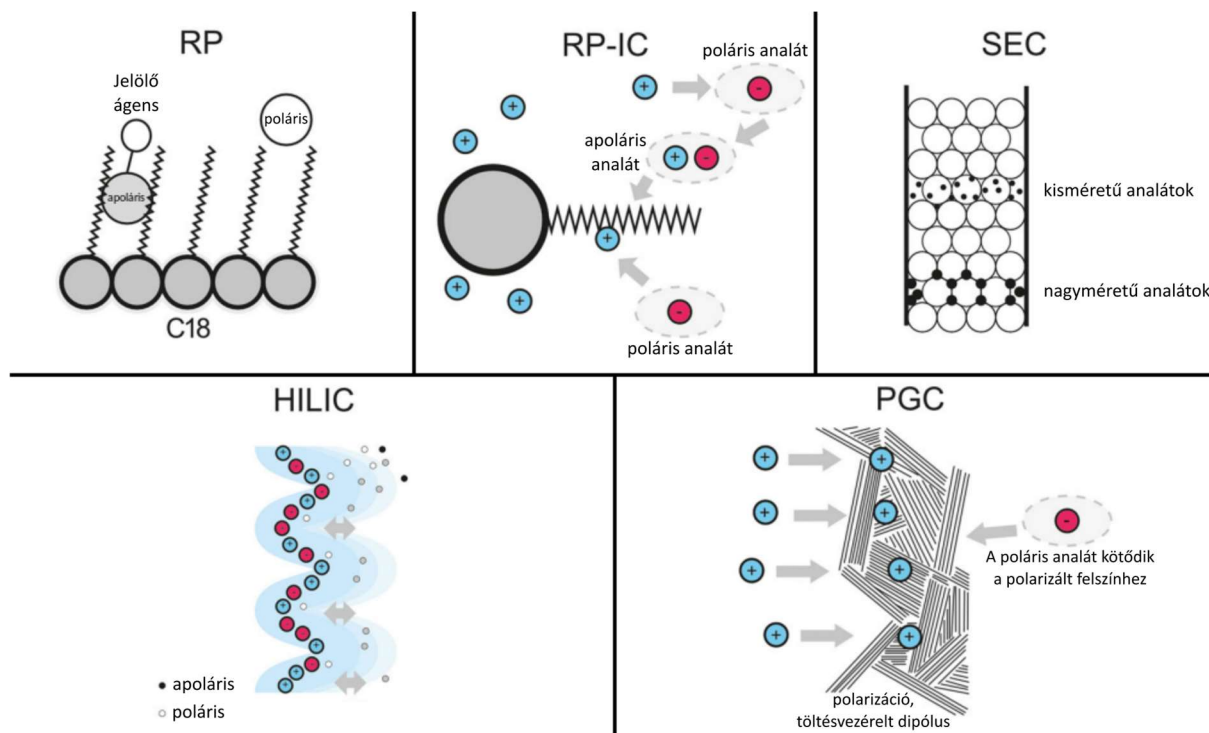
Az analizátor feladata a tömegspektrométerben az ionok elválasztása tömeg/töltés (m/z) alapján [22]. Mivel nagyon sokféle analizátor létezik, és mindegyiknek megvannak a maga előnyei és hátrányai, emiatt nincs köztük olyan, amely minden szempontból tökéletes lenne [57]. Éppen ezért a megoldandó feladattól és a mérés típusától függően kell a legalkalmasabbat kiválasztani. A proteomikában leggyakrabban a kvadrupól (*quadrupole*, Q), az ioncsapda, a repülési idő (*time of flight*, TOF), az orbitrap, valamint az ion ciklotron rezonancia analizátorokat használják. A tandem tömegspektrometriás (MS/MS) mérésekhez lehet egyszerre több, kapcsolt analizátort is alkalmazni (például kvadrupól – repülési idő analizátorok (Q-TOF)).

Az új, kíméletesebb ionizációs lehetőségek, mint például a kémiai ionizáció, illetve a műszerteknikai fejlesztések lehetővé tették az MS/MS szélesebb körű elterjedését, amely a vizsgált vegyületről a korábbinál sokkal részletesebb információt szolgáltat [58]. Az MS/MS módszerek során a gázfázisú fragmentációs folyamatokban a prekursor–fragmens ion kapcsolat határozható meg [59]. A hagyományos MS kísérletek esetén az ionizációt követően az ionforrásban képződő ionokat m/z szerint egyből elválasztják és detektálják, míg az MS/MS esetén az ionizációt követően kiválasztják azt az iont, amelynek szerkezetét meg akarják határozni, és csak azt az iont gerjesztik/fragmentáltatják, majd az így nyert fragmenseket m/z értékeik szerint elválasztják.

A kromatográfiás módszereket, azon belül a folyadékkromatográfiát (*liquid chromatography*, LC) is gyakran használják a fehérjék és a GAG-ok vizsgálatához a tömegspektrometriás detektálást megelőzően [60]. A többi kromatográfiás módszerrel szemben az LC előnye, hogy a mozgó- és állófázisok, valamint az elválasztási mechanizmusok nagy választéka és sokoldalú kombinálhatósága a legkülönbözőbb minták analízisét, komponenseinek preparatív tisztítását teszi lehetővé [22].

A kromatográfiás technikák közül a proteomikában az elsődlegesen alkalmazottak a fordított fázisú (*reversed-phase liquid chromatography*, RP-LC), a fordított fázisú ionpár kromatográfia (*reversed-phase ion chromatography*, RP-IC), a SEC és a hidrofíl kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HILIC) [22]. Kevésbé elterjedtek és ritkábban használt módszerek az affinitás kromatográfia, a rögzített fém-kelát kromatográfia, illetve a hidrofób

kölcsönhatáson alapuló kromatográfia. A diszacharidok vizsgálata esetén az elsődlegesen alkalmazott kromatográfiai technikák az RP-LC, az RP-IC, a porózus grafit állófázisos (*porous graphitic carbon*, PGC) kromatográfia, a SEC és a HILIC (4. ábra) [39, 61]. Az egyes technikák előnyeit és hátrányait a fehérjék és a GAG-ok esetén külön fogom részletezni a következő alfejezetekben.



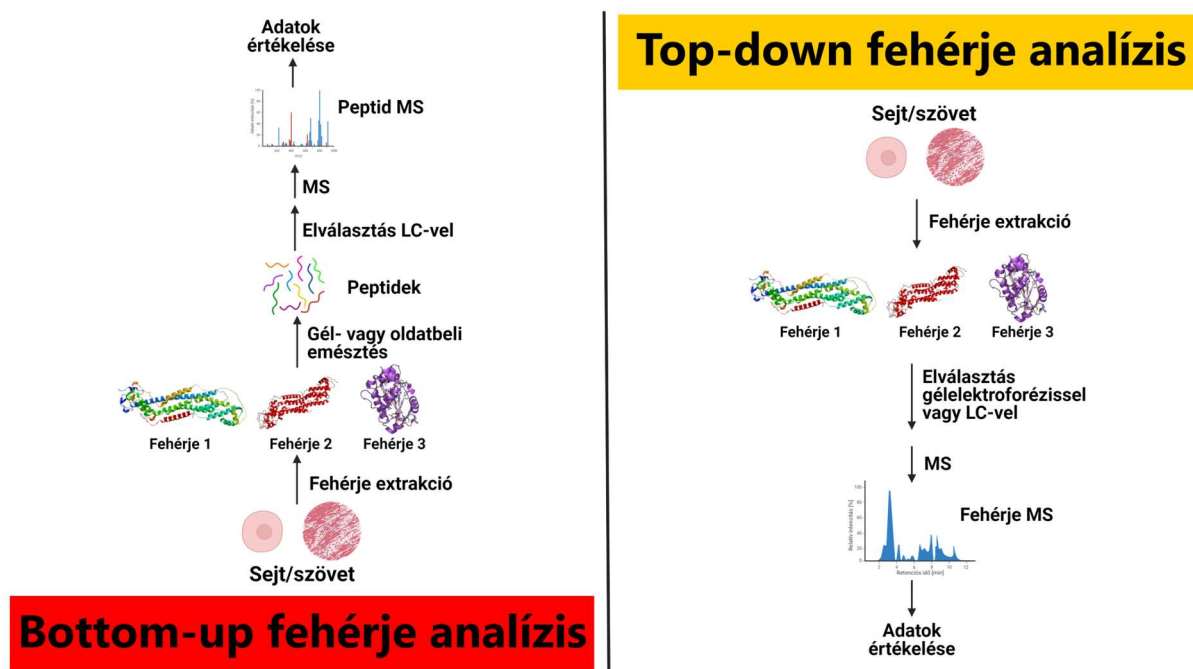
4. ábra – A fehérjék és a GAG-ok elemzéséhez használt leggyakoribb kromatográfiai módszerek [61]

1.4.1. Fehérjék vizsgálata

A fehérjék komplex biológiai környezetben való vizsgálatára jött létre a proteomika, amely egy biológiai rendszerben előforduló összes fehérje tulajdonságainak vizsgálatával foglalkozó tudományterület [22, 62]. Fő célja a biológiai rendszerben lévő fehérjék különböző szintű szerkezetének, a mutációk során képződő új szekvenciák, a polipeptidláncon található PTM-ek, a fehérjék sejtbeli lokalizációjának, valamint azok koncentrációinak, illetve koncentrációváltozásainak egy adott történés során való megismerése. A proteomika legfőbb műszeres analitikai eszköze az MS, amelynek során lágy ionizációs technikák (ESI, MALDI) alkalmazása szükséges [23]. Általánosan használt, elválasztástechnikával kombinált módszer a nanoméretű, ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfiával való kapcsolás (nanoUHPLC-MS).

A fehérjék elemzése általánosan az alábbi megközelítésekkel lehetséges: a *top-down* vagy a *bottom-up* módszerrel (5. ábra) [22, 63]. A *top-down* technika során az elválasztott

fehérjéket intakt formában, emésztetlenül analizálják tömegspektrometriával, melynek nagy előnye az, hogy az ún. proteoformák (egy adott gén termékei, beleértve a genetikai polimorfizmusokat, mutációkat, az alternatív hasításokat és a poszt-transzlációsan módosított formákat is), sőt megfelelő körülmények között a nemkovalens kölcsönhatások is karakterizálhatók [23].



5. ábra – A *bottom-up* és a *top-down* fehérje vizsgálatok általános sémája
(készült: Gregorich és mtsai [64] ábrája alapján)

Hátránya viszont az, hogy mivel a fehérjék nagy méretűek, különböző konformációkat vehetnek fel és számos PTM-mel rendelkezhetnek, az elemzés során kapott adatokat nehezen lehet értelmezni és feldolgozni, így komplex minták nem vizsgálhatók ezzel a módszerrel. A fehérjék elválasztására (esetleg izolálására) alkalmazható az RP-LC, az RP-IC, a SEC, az affinitáskromatográfia, a rögzített fém-kelát kromatográfia, a hidrofób kölcsönhatású kromatográfia és a HILIC [22].

A *bottom-up* technika alapja az, hogy a fehérjéket enzimatikusan peptidekké hasítják, amelyet különböző proteolitikus enzimek (például tripszin) segítségével végeznek [22, 23, 63]. A keletkező peptidkeverékeket ezután elválasztják egymástól, majd ezt követően MS/MS-sel elemzik azokat. A proteomikában alapvetően kétféle adatfelvételi technikát használnak: az adatfüggő (*data dependent acquisition*, DDA) és adatfüggetlen (*data independent acquisition*, DIA) analízist [65]. DDA esetén a legintenzívebb prekursorokról készül MS/MS felvétel, míg a DIA esetén tömegtartományokra osztják a teljes spektrumot, és az egyes tartományokat fragmentálják meg, így minden prekuzorról készül MS/MS felvétel. A megfelelő adatfelvételi

technikával kivitelezett tömegspektrometriás mérések során felvett eredmények ezután összevethetők a különböző adatbázisokban rendelkezésre álló *in silico* peptid tömegspektrumokkal, így a szoftveres kiértékelés segítségével valószínűségi alapon meghatározhatóvá válik a mintákban azonosított peptidek (részleges) aminosavsorrendje. Ezután a jelen lévő karakterisztikus peptidek segítségével azonosíthatók a mintát alkotó fehérjék.

A proteomikai elemzési eljárások négy fő lépést tartalmaznak [66]: (1) mintaelőkészítés (extrakció, emésztés, dúsítás), (2) a fehérjék vagy a megemésztett peptidek szeparálása, (3) a fehérjék azonosítása MS-sel (*top-down* vagy *bottom-up*) és (4) a hatalmas mennyiségű generált információk feldolgozása (funkcionális osztályozás vagy összehasonlító elemzés).

A HPLC-MS vizsgálatok előtti megfelelő mintaelőkészítés elengedhetetlen a kísérletek sikerességéhez [22]. A mintaelőkészítés két nagy részre osztható, melyek közül az első a biológiai minta feltárása, amely a (sejt)membrán/(sejt)fal elroncsolását takarja, hogy ezáltal a bent lévő komponensek is elérhetővé váljanak az enzim számára. A második lépésben a fehérjekeverékből a tömegspektrometriás analízisre alkalmas mintát kell előkészíteni, leggyakrabban enzimátikus emésztéssel.

A fehérjék kivonásához először fel kell tární a mintát, amely többféle módszerrel is történhet [22], például cseppfolyós nitrogénes hűtéssel, szövetlízálóban való hűtéssel, késes, kézi vagy motoros homogenizálással, illetve ultrahangos szonikáltatással. A hatékony és teljes mintafeltárás elengedhetetlen a sikeres fehérje vizsgálatokhoz, mert nélküle nagy veszteségek léphetnek fel. A fehérjeemésztést további tisztítási, dúsítási, szeparáló lépések előzhetik meg, hogy minél tisztább legyen a vizsgálandó minta és az emésztőenzim hatékonyan tudjon működni, valamint hogy a későbbiekben a peptidek MS/MS spektrumai a lehető legtöbb információt hordozzák majd [67].

A fehérjék denaturálása azért szükséges, mert ezáltal elérhetőbbek lesznek az alkalmazott enzim számára a belső peptid kötések. Denaturálószerként gyakran használják például a metanolt, az acetont, az acetonitrilt (ACN), vagy például az ureát [22, 68]. A felületaktív anyagok alkalmazása szintén segíti a fehérjék denaturációját, ezáltal könnyebben emészthetővé teszik azokat. Gyakran használt felületaktív anyagok például a nátrium-dodecil-szulfát, a Rapigest, vagy a Triton X-100.

A fehérjék harmadlagos szerkezetét diszulfidhidak stabilizálják, melyek akadályozzák az emésztőenzimek hatékony működését, ezzel gátolva a fehérjelánc egyes részeihez való szabad

hozzáférést, valamint bonyolítják a tömegspektrometriás mérést is [22, 68]. Emiatt igyekezni kell megszabadulni ezektől különböző kémiai ágensek segítségével. A diszulfidhidakat a proteolízis előtt redukálni kell, majd a keletkező szabad cisztein oldalláncokat alkilezéssel kell védeni a későbbi újraoxidálódástól [67]. Többféle redukáló- és alkilálószer használatos, a megfelelő kiválasztásánál figyelembe kell venni a minta puffer pH-ját, összetételét stb. Gyakran használt redukálószer például a 2-merkaptoetanol, a ditiotritol (DTT), amelyek nagyon hatékonyak a diszulfidhidak lebontásában. A 4-vinilpiridint, a jódecetsavat, valamint a jódacetamidot (IAA) alkilálószerként alkalmazzák, amelyek a ciszteinmaradványok alkilezése által megakadályozzák a diszulfidkötések újbóli kialakulását, ezáltal biztosítják, hogy a fehérje teljesen denaturált és redukált állapotban maradjon. Az adott enzim működéséhez szükséges optimális pH fenntartásához különféle puffereket szoktak hozzáadni a mintákhoz az emésztés megkezdése előtt [22, 68].

Végül a már teljesen redukált, alkilezett és a megfelelő pH-ra beállított minta készen áll az enzimatis emésztésre. Az emésztőenzimek közül leggyakrabban a tripszint szokták alkalmazni [22]. Az enzimatis emésztést követően szükség lehet a mintában kis koncentrációban jelen lévő, PTM-mel rendelkező (például foszforilált vagy *N*-glikozilált) peptidek dúsítására, hogy ezáltal könnyebb legyen azok azonosítása és vizsgálata [69, 70]. A glikopeptidek dúsításának egyik módja a glikopeptidek kicsapása [71], amely történhet szerves oldószerrel, illetve oldószerkeverékkel (például aceton, kloroform-metanol), savval (például triklórecetsav) vagy sóval (például ammónium-szulfátos kisózás). Legalább hatszoros térfogatnyi szerves oldószert kell adni a mintához, amelyet ezután jégen vagy $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on legalább 1–2 órán át kell inkubálni. Nagy sebességű centrifugálás (10000-15000 g) után az oldható szennyeződések és nem glikozilált peptideket tartalmazó felülúszót óvatosan kell eltávolítani a pelletről. Ezt követően egy rövid szárítás után a glikopeptid csapadék marad vissza, amelyet a későbbi tömegspektrometriás elemzéshez a megfelelő pufferben kell feloldani.

A nem glikozilált peptideket tartalmazó felülúszók műszeres analitikai vizsgálata előtt azonban szükséges még egy tisztítási lépés, melynek során az analátot izolálják, koncentrálik és megtisztítják a mérést zavaró biológiai mátrixtól [72, 73]. Ez a folyamat egyrészt azért fontos, mert ezáltal megnő a tömegspektrometriás elemzés érzékenysége és pontossága, amely igen hangsúlyos a fehérjék minőségi és mennyiségi elemzése során, másrészt pedig így elkerülhető a tömegspektrométer elszennyezése. Sokféle módszer áll rendelkezésre a minták tisztítására, mint például a SEC, a mágneses gyöngyökkel való tisztítás, valamint a szilárd fázisú extrakció (*solid phase extraction*, SPE). Az SPE az egyik leghatékonyabb módszer a megemésztett

mintákban lévő szennyeződések eltávolítására, ezáltal a mátrix zavaró hatásának kiküszöbölésére és az analát dúsítására [74]. Az SPE állófázisa lehet szilikagél alapú (például C₁₈, C₈ vagy fenil csoporttal módosított), polimer alapú, illetve léteznek ioncserélő állófázisok is.

Az SPE-vel végzett tisztítás során először aktiválni, majd ekvilibrálni kell az állófázist, hogy ezáltal az alkalmas legyen a tisztítás elvégzésére [72]. Ezután kell felvinni a mintát az állófázisra, amelyből a számunkra fontos analát(ok) megkötődnek az adszorbens felületén. Utána egy mosási lépés segítségével a meg nem kötődött szennyezők eltávolításra kerülnek az állófázis felületéről, majd végül az utolsó lépésben a megfelelő oldószerrel eluálják a megkötődött analátot/analátokat.

Az enzimatisz emésztést, valamint a tisztítást követően a peptidek és glikopeptidek elválasztására leggyakrabban az RP-LC-t, illetve a HILIC-et alkalmazzák [22, 23]. Mivel az RP-LC során a molekulák hidrofóbicitása, a HILIC során pedig a vegyületek polaritása alapján történik az elválasztás, ezért ezek a módszerek egymást kiegészítő információt szolgáltatnak, így gyakori ezek kombinált alkalmazása is 2D-s kromatográfiás elválasztásokban (multidimenziós kromatográfia). Bár a multidimenziós kromatográfia jelentős mértékben javítja az elválasztás hatékonyságát, önmagában nem nyújt sem minőségi, sem mennyiségi információt a mintát alkotó komponensekről. Az elválasztott alkotóelemek azonosításához és mennyiségi meghatározásához ez esetben is szükség van tömegspektrométerre. A HPLC-MS lehetővé teszi nagyon kis mennyiségű mintából akár 3000-5000 fehérje azonosítását különböző adatbázisok segítségével, valamint azok koncentrációja is meghatározható [22].

A minták proteomikai vizsgálatát követő számítógépes adatértékelés egy meglehetősen komplex, többlépcsős folyamat. Az adatelemzéshez például a MaxQuant, a Proteome Discoverer, a Byonic és a SkyLine programok használatosak [75]. Az MS mérések eredményeiből (*bottom-up* technika esetén) először a peptidek azonosítása történik. Az MS/MS spektrumok tükrözik az egyes peptidekből származó fragmensek m/z arányát és intenzitását. A spektrumokból származó adatok ezután összevetésre kerülnek egy már meglévő peptid- vagy fehérjeadatbázisban rendelkezésre álló *in silico* peptid tömegspektrumokkal [23]. A szoftverben lévő egyes algoritmusok valószínűség alapú modellt követnek, amelyek rangsorolják a spektrumokat az egyezések jósága alapján, és meghatározhatóvá válik az azonosított peptidek (részleges) aminosavsorrendje. Ennek eredményeként egy-egy pontszám kerül hozzárendelésre minden egyes spektrumhoz, amely az egyezés mértékét tükrözi [75].

A (gliko)proteomikai adatbázis-keresés egyik kritikus pontja a hibás találati arány (*false discovery rate*, FDR) meghatározása [22]. A fehérjeazonosításban bevett megközelítés az ún. „*target-decoy*” módszer, melynek során randomizált vagy fordított aminosav-szekvenciákon történő keresésből becsülik az FDR értékét. Proteomikai vizsgálatokban tipikusan úgy húzzák meg a találatok elfogadásának határát, hogy 1 %-os FDR-t kapjanak.

Ezután következik a peptidek összekapcsolása a fehérjékkel, melynek során a szoftver a peptid szekvenciák alapján valószínűsíti a mintában lévő fehérjéket. Mivel sok olyan peptid van, amely több különböző fehérjében is megtalálható, a szoftver az egyedi peptidek száma alapján dönti el, hogy mely fehérjék jelenléte a legvalószínűbb [76]. Léteznek olyan karakterisztikus peptidek, amelyek lehetővé teszik az adott fehérje egyértelmű azonosítását, azonban a mindössze egyetlen peptiddel történt fehérjeazonosítás nem elegendő a teljes bizonyossághoz. Minél több egyedi peptidet azonosított a program egy adott fehérjéből, annál nagyobb a valószínűsége, hogy a fehérje ténylegesen jelen van a mintában.

A mennyiségi meghatározás többféleképpen is lehetséges: a meghatározás történhet abszolút vagy relatív skálán. Előbbihez izotópjelzett standardok használata szükséges, emiatt költségesebb, és főként klinikai alkalmazásokban található meg [75]. A különböző mintákat különböző izotópokkal jelölik, majd az MS/MS spektrumokból az izotópjelölések relatív intenzitása alapján határozzák meg a fehérjék mennyiségét. A relatív mennyiségi meghatározás leginkább a felfedező kutatásokban terjedt el, amelynek oka az, hogy néhány fehérje izotópos jelölését még viszonylag problémamentesen meg lehet oldani, viszont ha több ezer fehérje jelenlétét kívánják egyszerre monitorozni, akkor az sajnos nem kivitelezhető [22]. Gyakran alkalmazott módszer viszont a „*tandem mass tag*” (TMT), amely során nem közvetlenül a fehérjéket, hanem az emésztés során keletkező peptideket jelölik izotópokkal [77]. A TMT-vel felvett tandem tömegspektrometriás spektrumok alapján a peptidek izotópos jelöléseinek intenzitását összehasonlítva nyerhetők ki a relatív mennyiségi információk.

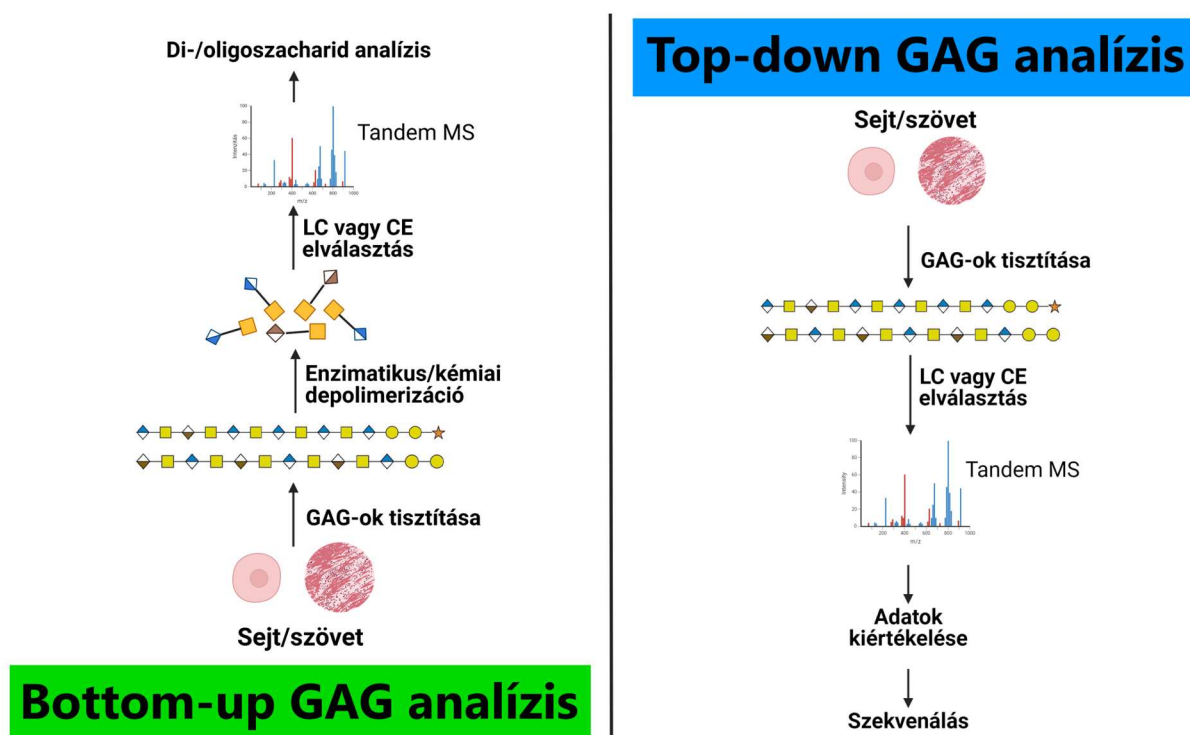
A jelölésmentes módszer az egyes peptidek spektrális intenzitásait vagy az MS1 szinten mérhető m/z csúcsok intenzitását használja a mennyiségi meghatározásra. A különféle szoftverek (például MaxQuant vagy Skyline) ezeket az intenzitásokat használják a peptidek és a hozzájuk tartozó fehérjék relatív mennyiségének becslésére.

1.4.2. GAG-ok vizsgálata

Az 1.3.2. fejezetben leírtak alapján látható, hogy a GAG-ok mennyire fontos szerepet töltenek be a különböző élettani folyamatokban. Ennek következtében kulcsfontosságú a

GAG-ok analízise ezen folyamatok pontos részleteinek, valamint a GAG-oknak az azokban betöltött szerepük jobb megértése érdekében [78]. Mivel a GAG-ok biológiai aktivitása és szerkezete között meglehetősen bonyolult a kapcsolat, elengedhetetlen a pontos szerkezetük feltérképezése a funkcióik tisztázása érdekében [79]. A GAG-ok szerkezetének karakterizálása a mögöttes szerkezeti komplexitás (az alapváz polaritása, illetve a különböző mértékű szulfatáció) miatt nem egyszerű, de megfelelően beállított ütközési energiával lehetséges, minimális fragmentációval.

A GAG-ok általános szerkezeti analízise sok lépést foglal magában. Mivel a GAG-láncok meglehetősen hosszúak (akár 100 kDa-osak is lehetnek), így intakt analízisük meglehetősen nehézkes [27, 80]. Elemzésükhöz emiatt célszerű kémiai vagy enzimatis hasítási lépést alkalmazni, ezáltal elérhető egy jóval kisebb di- vagy oligoszacharid-keverék vizsgálata [23]. Sajnos egyetlen analitikai módszer sem biztosít önmagában teljeskörű minőségi és mennyiségi információt a GAG-ok szerkezetéről, ezért kell különböző analitikai módszereket kombinálni, pl. az infravörös spektroszkópiát (IR), illetve a folyadékkromatográfiával vagy a kapilláris elektroforézissel (CE) kapcsolt tömegspektrometriát. A négy GAG-osztály műszeres analitikai vizsgálata történhet *top-down* vagy *bottom-up* technikával (6. ábra).



6. ábra – A *bottom-up* és *top-down* GAG-analízisek munkafolyamatai (készült: Solakyildirim és mtsai [39] ábrája alapján)

A *top-down* technika alkalmazásakor a GAG-ok szerkezetének egészét vizsgálják (intakt módon) előzetes enzimatis vagy kémiai hasítás nélkül, amelynek nagy előnye az, hogy

teljeskörű információt nyújt az erősen heterogén GAG-poliszacharidok szerkezetéről és diverzitásáról [80]. A *top-down* analízis keretében szükség van a heterogén minta elválasztására, amelyre kiválóan alkalmas a CE és az LC, azon belül is leginkább az RP-IC és a HILIC, mivel ezek teszik lehetővé a GAG-ok magas fokú érzékenységgel történő elválasztását és elemzését mind kvalitatív, mind pedig kvantitatív módon [81, 82]. Ezeket az effektív elválasztási technikákat általában tömegspektrometriával kombinálják, amelyet szintén rendkívül széles körben használnak a GAG-ok *top-down* szerkezeti analízisére, mivel nagy érzékenységet és jó felbontást biztosít [83, 84]. Azonban az LC-MS alapú technikák hátránya, hogy sajnos csak a kis méretű GAG-láncok (például bikunin) intakt analízisére alkalmazhatók sikeresen, ugyanis a nagy GAG-láncok intakt analízise éppen azok mérete miatt okoz jelentős nehézséget [85].

A *bottom-up* technika a *top-down* technika ellentéte, amely a GAG-ok esetén szinte kizárólagosan alkalmazott módszer, mivel ez jelentősen megkönnyíti a GAG-ok analízisét. A módszer kezdetén az intakt GAG poliszacharidokat enzimatikusan vagy kémiai úton diszacharidjaikra hasítják. Az emésztést követően keletkező kis méretű GAG diszacharidok analízise már jól megvalósítható egy tisztítási lépést követően, melyhez számos elválasztástechnikai módszer áll rendelkezésre [23], például az RP-LC, a SEC, és a különösen poláros vegyületekre gyakran alkalmazott porózus grafit- vagy amid-HILIC kromatográfia. Az elválasztást követően MS-sel elemzik a GAG diszacharidokat.

A HILIC az egyik legalkalmasabb módszer a GAG-ok elválasztására [86], ugyanis az alkalmazott, magasabb szerves oldószerösszetétel kompatibilisebb a tömegspektrometriával, ugyanis csökkenti a sólerakódás mértékét a tömegspektrométer ionforrásában. Az amin vagy amid kötésű HILIC oszlopokon lévő amin vagy amid csoportok erős hidrogénkötéseket alakítanak ki a GAG-okkal, ennek köszönhetően kiválóan alkalmasak azok elválasztására [87]. A natív GAG diszacharidok elválasztására régebben amid-HILIC oszlopokat használtak ESI-vel negatív ionizációs módban [88], azonban azt figyelték meg, hogy a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható HILIC kolonnákon a szulfatátlan diszacharidoknak nincs kellő visszatartása [89]. A kutatócsoportunkban korábban kifejlesztettek egy saját töltésű hidrofíli interakciós kölcsönhatáson és gyenge anioncserén alapuló kromatográfiás (*hydrophilic interaction liquid chromatography with a weak anion exchange*, HILIC-WAX) oszlopot és sógradienst [90], kutatómunkám során én is ezeket használtam.

Korábban már említettem, hogy a fehérjékhez hasonlóan (1.4.1. fejezet) a GAG-oknál is szükséges még egy tisztítási lépés a műszeres analitikai vizsgálatok előtt, melynek során a GAG diszacharidokat megtisztítják az emésztési maradványoktól, illetve a zavaró biológiai

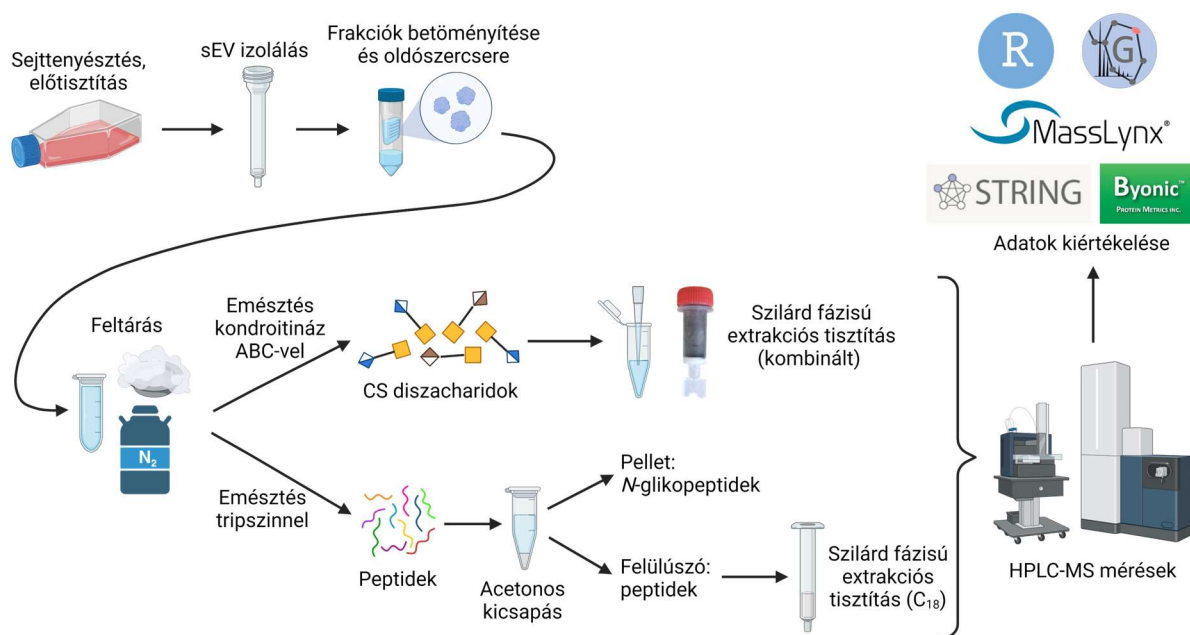
mátrixtól [72]. A GAG-ok esetén is sokféle módszer áll rendelkezésre a minták megtisztításához, például a poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE), a SEC vagy az SPE. Ezek közül az SPE a leghatékonyabb, ugyanis az lehetővé teszi a GAG-ok szelektív retencióját és elúcióját, ezáltal nagy tisztaságú GAG-okat eredményezve [74, 91]. Az állófázis kiválasztása a GAG-ok karakterisztikus kémiai tulajdonságaitól (például töltés, méret, hidrofilitás) függ. SPE állófázisnak alkalmasak a tradicionális HILIC állófázisok, ugyanis a HILIC használatával lehetséges a peptidek és a sók hatékony eltávolítása a glikán frakciókból [88, 92, 93]. A HILIC alkalmazása során a poláris állófázis felületén kialakult stabil, vízben gazdag réteg elősegíti a hidrofil glikánok retencióját, míg a kevésbé hidrofil peptidek és sók inkább a szerves mozgófázisban maradnak, így korábban eluálódnak [94, 95]. Ezt bizonyítja, hogy korábban már sikeresen alkalmaztak hidrofil anyagokat (például vattát és cellulózt) az *N*-glikánok szelektív dúsítására [96, 97].

A porózus grafit is egy rendkívül hatékony állófázis, amely nagy felületének, erős adszorpciós képességének, kémiai stabilitásának, valamint az elúciós körülmények közötti sokoldalúságának köszönhető [94, 98]. Mivel a PGC felülete eredetileg apoláris, emiatt elsősorban hidrofób vegyületek elválasztására alkalmas. Azonban a grafiton lévő π -elektronoknak, valamint a grafit nagy polarizálhatóságának köszönhetően ion-dipólus kölcsönhatásba is tud lépni a GAG-okban jelen lévő negatív töltésű szulfát- és karboxilcsoportokkal [99]. Mivel ezek a kölcsönhatások különösen erősek és szelektívek, ez teszi lehetővé a különböző szulfatáltságú – és ennél fogva eltérő hidrofilitású – GAG-ok hatékony adszorpcióját [100, 101]. Habár a pontos kölcsönhatási mechanizmusok még nem teljesen ismertek, a PGC fentebb említett tulajdonságai folytán meglehetősen ígéretes állófázis lehet a glikomikai SPE tisztításokhoz. Kutatómunkám során egy, a kutatócsoportban kifejlesztett vatta-grafit kétlépéses tisztítási protokollt alkalmaztam.

1.5. Az EV-k glikomikai vizsgálatára alkalmazott munkafolyamat bemutatása

Munkám során (7. *ábra*) a sejtek tenyésztése és előtisztítása után saját töltésű SEC oszlopokkal izoláltam az sEV-ket, majd a frakciók betöményítését és azok oldószercseréjét követően fagyasztási-olvasztási ciklusokkal feltártam az sEV-ket. Ezután a proteomikai emésztés megkezdése előtt denaturálószerként metanolt, redukálószerként DTT-t, felületaktív anyagként Rapigestet, alkilezőszerként IAA-t, pufferként pedig ammónium-bikarbonátot adtam hozzá a mintákhoz. Ezt követően a fehérjéket tripszinnel peptidekké, a CS GAG-okat pedig

ammónium-acetát hozzáadását követően kondroitináz ABC-vel CS diszacharidokká emésztettem. Emésztés után a CS diszacharidokat egy kombinált (vatta és grafit állófázisok együttes alkalmazása) SPE tisztítást követően elválasztottam egymástól HPLC-vel, majd MS-sel elemeztem azokat. Az *N*-glikoziláció vizsgálata végett a megemésztett fehérjemintákban acetonos kicsapással dúsítottam az *N*-glikopeptideket. Centrifugálás után a mintákból elválasztottam az *N*-glikopeptideket tartalmazó pelleteket a felülúszóktól, amelyekben főleg a nem glikozilált peptidek voltak megtalálhatók. Az *N*-glikopeptideket tisztítás nélkül, a nem glikozilált peptidkeverékeket egy C_{18} -as SPE tisztítást követően HPLC-MS-sel elemeztem, amelyet az adatok számítógépes kiértékelése követett.



7. ábra – A munkám során alkalmazott proteomikai és glikomikai vizsgálat folyamata

2. Kísérletek leírása

2.1. Felhasznált anyagok, eszközök adatai

Anyag/eszköz neve	Anyag töménysége/eszköz típusa, cég neve, cég székhelye
Acetonitril	100 %, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
10 kDa-os koncentrátor (Falcon-csőbe való)	10 kDa-os Amicon Ultra - 15 ml koncentrátorok, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
10 kDa-os zsebes szűrő (Eppendorfba való)	10 kDa-os Amicon Ultra - 0,5 ml centrifuga szűrők, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
30 µm-es szűrő	Econo-Pac® Disposable Chromatography Columns csomag része, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA
A549 sejtek	A549 Cell Line human (86012804-1VL, from human lung(carcinoma)), Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Aceton	>99,9 %, Honeywell, Charlotte, Észak-Karolina, USA
Ammónia	25 %, Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft., Budapest, Magyarország
Ammónium-acetát	>99 %, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Ammónium-bikarbonát	>99,5 %, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Bakteriális szűrő (0,22 µm-es)	Millipore Express® PES Membrane Filter Unit (0,22 µm), Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
BEAS-2B sejtek	BEAS-2B Cell Line human (95102433-1VL), Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Bronchiális hámsejt bazális médium	CC-3171 BEBM Basal Medium, Lonza Group AG, Basel, Svájc
Bronchiális hámsejt növesztő médium	BEGM® Bronchial Epithelial Growth Medium BulletKit® (contains 1 ea. CC-3171 & CC-4175), BIOCENTER Laboratóriumi Szolgáltató Kft., Szeged, Magyarország
C ₁₈ SPE oszlopok	Pierce™ TopTip C18 Spin Tips & Columns, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
CS diszacharidok	1 mg-os egységek CS diszacharidonként, Iduron Ltd., Cheshire, UK
Cseppfolyós nitrogén	Linde Gáz Magyarország Zrt., Répcelak, Magyarország
Ditiotreitol	>99,5 %, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA
Ecetsav	>99,7 %, glacial, ACS reagent, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Econo-Pac kromatográfiás oszlopok	10 ml, Econo-Pac® Disposable Chromatography Columns csomag része, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA
Etanol	100 %, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
F12 médium	F-12 (1X) + GlutaMAX™-I Nutrient Mixture (Ham), Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Grafit oszlopok	Pierce™ Graphite Spin Columns (High Select™ Phosphopeptide Enrichment Kits & Reagents), ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hangyasav	~98 %, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
HPLC H ₂ O	Ultratiszta (LC-MS grade), VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
Jódacetamid	>99 %, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Kondroitináz ABC	>100 egység/ml, Chondroitinase ABC from Proteus vulgaris (BSA free), Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország

LysC-Tripszin mix	Mass Spectrometry Grade Trypsin/Lys-C Mix, Promega, Madison, Wisconsin, USA
Magzati marha szérum	Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX™ Supplement, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Metanol	>99,9 %, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
PBS	Por formájú, tasakos kiszerezésű, egy tasak tartalmából 1 liter oldat készíthető, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Rapigest	1 mg-os RapiGest SF Surfactant, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA
Szefaróz-2B	Sepharose™ CL-2B (20 % etanol tartósítószerként), Cytiva Sweden AB, Uppsala, Svédország
SEC oszlop	Saját készítésű: Econo-Pac® kromatográfiás oszlopokba töltött 10 ml szefaróz-2B, annak tetején a 30 µm-es szűrővel
Trifluorecetsav	>99 %, Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Németország
Tripszin	Mass Spectrometry Grade Tripszin Gold, Promega, Madison, Wisconsin, USA
HILIC-WAX töltet	GlycanPac™ AXH-1 1,9 µm; analitikai kolonnából (2,1×100mm), ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.2. A mérésekhez használt műszerek, programok adatai

Műszer/program neve	Műszer/program típusa, cég neve, cég székhelye
Block heater (blokkmelegítő)	Stuart block heater SBH130, TEquipment, Long Branch, New Jersey, USA
Byonic	Byonic™, Protein Metrics by Dotmatics
Centrifuga	HERMLE Z 300 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Németország
GlycoWorkbench	GlycoWorkbench 2.0, European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK
GlycReSoft	GlycReSoft v0.4.0, Boston University School of Medicine's Mass Spectrometry Resource, Boston, Massachusetts, USA
HPLC készülék <i>N</i> -glikoproteomikai elválasztásokhoz	Waters nanoAcquity nanoUHPLC, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA
HPLC készülék proteomikai elválasztásokhoz	nanoElute 2 nano-HPLC, Bruker Daltonics, Bréma, Németország
HPLC készülék a CS diszacharidok elválasztásához	Waters Acquity I-Class UPLC, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA
MassLynx	MassLynx 4.2, Waters™
Melegítőszekrény	Environmental Shaker - Incubator ES-20/60, bioSan, Riga, Lettország
Nanodrop	NanoDrop® Spectrophotometer (ND-1000), ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Peptideket elválasztó trap oszlop	Si_Mo_75_id C ₁₈ oszlop (3 µm-es C ₁₈ -cal bevont részecskéket tartalmazó töltet, 15 cm × 75 µm belső átmérő, hézagterefogat: 0,46 µl), Bruker Daltonics, Bréma, Németország
Peptideket koncentráló trap oszlop	Thermo Trap Cartridge oszlop (5 µm-es C ₁₈ -cal bevont részecskéket tartalmazó töltet, 5 mm × 300 µm belső átmérő), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

<i>N</i> -glikopeptideket elválasztó trap oszlop	Acquity M-Class BEH130 C18 (1,7 μ m, 75 μ m $\times$ 250 mm) analitikai kolonna, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA
<i>N</i> -glikopeptideket koncentráló trap oszlop	Symmetry® C18 (100 Å, 5 μ m, 180 μ m $\times$ 20 mm) oszlop, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA
CS diszacharidokat elválasztó oszlop	HILIC-WAX kapilláris oszlop (250 μ m $\times$ 10 cm), a saját csoportunkban lett kifejlesztve
RStudio	RStudio, Posit PBC
SpeedVac	GeneVac™ miVac DUO concentrator, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermoshaker (rázótermosztát)	PSC18 PHMT Grant-bio Thermo-Shaker, Grant Instruments, Royston, Cambridge, UK
Tömegspektrométer <i>N</i> -glikoproteomikai mérésekhez	ThermoFisher Exploris 240 Orbitrap, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tömegspektrométer proteomikai mérésekhez	timsTOF HT, Bruker Daltonics, Bréma, Németország
Tömegspektrométer a CS diszacharidok méréseihez	Waters Select Series ciklikus ionmobilitás-tömegspektrométer, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA
Ultrahangos fürdő	Bandelin Sonorex, BANDELIN electronic GmbH, Berlin, Németország

2.3. Sejtenyésztés, előtisztítás

Az sEV-k izolálásához a Ludwig és mtsai [1] által javasolt protokollt használtuk némi változtatással. Az A549 sejteket 10 V/V % hő-inaktivált magzati marha szérumot (FBS), valamint 1 V/V% penicillin/sztreptomocint tartalmazó F12 médiumban, a BEAS-2B sejteket pedig bronchiális hámsejt növesztő médiumban (*bronchial epithelial growth medium*, BEGM) tenyésztettük. Izolálás előtt 72 órával a tenyésztő médiumokat FBS-mentesre cseréltük, hogy ezáltal minimalizáljuk az FBS által okozott háttérszennyeződések, amelyek zavarhatják a sejtek által kibocsátott vezikulák tisztaságát, valamint későbbi vizsgálatukat is. A 72 óra letelte után a tenyésztett sejtek felülúszóiban megtalálhatók voltak a sejtek által kibocsátott EV-k (köztük az sEV-k is), így a felülúszókat egy-egy 50 ml-es Falcon-csőbe gyűjtöttük, amelyeket 30 percig, 4 °C-on, 10000 g-n centrifugáltunk. A felülúszókat egy-egy 0,22 μ m-es bakteriális szűrőn leszűrtük, hogy ezáltal eltávolítsuk a leggyűjtött felülúszókban lévő baktériumokat, sejttermelékeket, gombákat és más mikrobiális szennyeződések. A szűrést követően 1 ml-esre töményítettem be a felülúszókat 10 kDa-os (15 ml össztérfogatú) Amicon Ultra-15 koncentrátorok segítségével 5000 g-n, 4 °C-on.

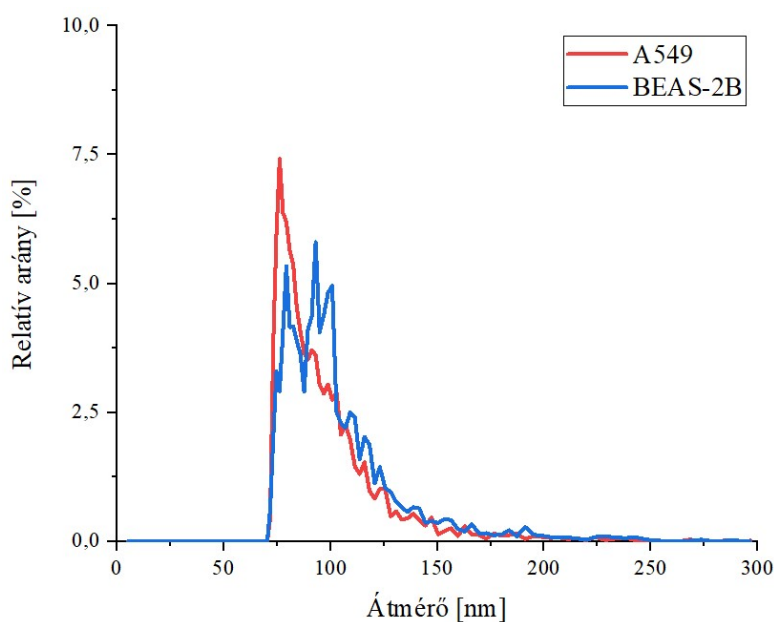
2.4. sEV-k izolálása

Az előtisztított felülúszókból álló 1-1 ml-nyi alikvotokat felvittem a saját készítésű mini méretkizárásos kromatográfiás (SEC) oszlopokra. Az oszlopokat a következőképpen készítettem el: az Econo-Pac® kromatográfiás oszlopokba töltöttem a tartósítószerként 20 %

etanolt is tartalmazó, foszfáttal pufferelt sóoldattal (phosphate buffered saline, PBS) fele-fele arányban összekevert szefaróz-2B-t, amelyről a szűrőn keresztül csak a PBS csepegett le, így az oszlopon csak a szefaróz-2B maradt fenn. Az oszlopot 10 ml-ig töltöttem. Végül a szefaróz tetejére ráhelyeztem egy 30 μm -es szűrőt, amelyre ezután rápipettáztam a kétféle sejtvonal betöményített felülúszóit. Ezt követően 10·1 ml PBS rápipettázásával eluáltam az egyes frakciókat külön Eppendorfbokba.

2.5. Frakciók vizsgálata MRPS-sel

Az izolálás után a 3., 4. és 5. frakciókból (azaz az MS vizsgálathoz használt frakciókból) 50-50 μl -t egyesítettünk és a mintákat mikrofluidikus rezisztív impulzus technikával (*microfluidic resistive pulse sensing*, MRPS) vizsgáltuk meg, hogy jellemezzük a méreteloszlásukat és igazoljuk a 30-150 nm részecskeátmérőjű sEV-k jelenlétét. Az MRPS egy olyan új, nanorészecskék jellemzésére szolgáló módszer, amely lehetővé teszi a részecskék méretének és koncentrációjának mérését statisztikailag releváns részecskeszám alapján [102, 103]. Az MRPS a Coulter-elven alapszik: az elektrolit oldatban szuszpendált részecskék egy szűk keresztmetszetű csatornán haladnak át, melynek során a részecske ellenállás-impulzust generálva kiszorítja az ionokat. Az MRPS vizsgálat során minden mintából PBS-sel ötszörös hígítást végeztünk, majd 2-2 μl -t pipettáztunk a cartridge-ba, amit egy Spectradyne nCS1 készülékbe helyeztünk, és detektáltuk a részecskék méretét. A mérés eredményét a **8. ábra** szemlélteti, amely az egyes mintacsoportokba tartozó különálló mérések átlagát mutatja. Látható, hogy mindkét mintatípus esetén a 150 nm-nél kisebb méretű részecskék domináltak, mely eredmény az sEV-k jelenlétét támasztja alá.



8. ábra – Az MRPS vizsgálat átlagolt eredményei

2.6. Frakciók betöményítése és oldószercsere

Ehhez a lépéshez 10 kDa-os (0,5 ml össztérfogatú) Amicon Ultra-0,5 centrifuga szűrőket használtam. A szűrőket először 200 µl vízzel mostam, majd 13500 g-n, 10 percig centrifugáltam. Ezután 500 µl-es egységenként pipettáztam a szűrőkre a SEC-cel eluált frakciók közül a 3.-at, a 4.-et és az 5.-et. Minden egyes 500 µl-es egység után 13500 g-n, 10 percig centrifugáltam a két sejtvonal frakcióit. Ezt követően 200 µl 200 mM-os ammónium-bikarbonát oldatot pipettáztam rá a szűrőkre, amelyeket ezután szintén 13500 g-n, 10 percig centrifugáltam. A következő lépés során 200 µl 50 mM-os ammónium-bikarbonát oldatot pipettáztam a szűrőkre, amelyeket ezután 13500 g-n, 15 percig centrifugáltam. Végül a szűrőket fejjel lefelé fordítottam és 1000 g-n, 1 percig centrifugáltam a szűrőkön fentmaradt, már MS kompatibilis közegben lévő, betöményedett frakciókat. A betöményített frakciók térfogatait megmértem automata pipetták segítségével.

2.7. Feltárás

A betöményített frakciókban található EV-k feltárása 7 db egymást követő fagyasztási és olvasztási lépésből állt. A fagyasztási lépés 30 másodpercig cseppfolyós nitrogénbe merítést, az olvasztási lépés pedig 10 percig tartó ultrahangos fürdőben végzett szonikáltatást takart. A 2. és a 4. ciklus kivételek, azoknál a fagyasztási lépés 1 óráig tartó fagyasztóban tárolás volt. Az utolsó lépés után megmértem a feltárt frakciók fehérjekoncentrációit Nanodrop segítségével.

2.8. Proteomikai emésztés

A kísérleteim során mindvégig 5 µg-nyi fehérjemennyiségeket emésztettem meg a feltárt frakciókból, amelyeket vízzel 35 µl-re egészítettem ki. Az emésztendő mintákhoz először 1,5 µl metanolt adtam hozzá, majd 2 µl 200 mM-os DTT-t és 5 µl 0,5 %-os Rapigestet, ezután 60 °C-on, 30 percig inkubáltam azokat 250 rpm-en rázótermosztát segítségével. Az inkubálási idő lejártá után 2,5 µl 200 mM IAA-t és 5 µl 200 mM-os ammónium-bikarbonát oldatot adtam a mintákhoz, majd ezután szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltam azokat 30 percig, mivel az IAA fényérzékeny. Ezt követően hozzáadtam a szükséges Lys-C-tripszin mixet a mintákhoz 1:100 (enzim : fehérje) arányban, amelyeket ezután 1 órán át inkubáltam 37 °C-on 250 rpm-en rázótermosztátban. Végül a tripszint adtam hozzá a mintákhoz 1:10 (enzim:fehérje) arányban, amelyeket ezután egy egész éjszakán át inkubáltam 37 °C-on 250 rpm-en rázótermosztátban. 16 óra eltelte után 0,5 µl hangyasav hozzáadásával állítottam le az emésztést, majd beszárítottam a megemésztett mintákat.

2.9. Acetonos kicsapás

A proteomikai emésztések után a beszárított mintákon acetonos kicsapást hajtottam végre, hogy a bennük lévő *N*-glikopeptideket dúsítsam. Ennek során először 15 µl 1 %-os hangyasavban oldottam fel a beszárított mintákat, majd hozzájuk adtam 150 µl jéghideg acetont a fagyasztóból, végül a mintákat egy éjszakán át a fagyasztóban tároltam. Másnap a mintákat 12000 g-n, 10 percig centrifugáltam 20 °C-on, ezután pipettával elválasztottam a felülúszókat (nem-glikozilált peptidek) a pelletektől (glikozilált peptidek). A felülúszókat és a pelleteket is beszárítottam, majd ezután a felülúszót C₁₈-cal tisztítottam.

2.10. GAG-ok emésztése

A kísérleteim során mindvégig 10 µg-nyi fehérjemennyiségekről emésztettem a GAG-okat a feltárt frakciókból, amelyeket vízzel 70 µl-re egészítettem ki. Kontrollként az A549 és a BEAS-2B sejtvonalak médiumaiból is azonos mennyiségeket emésztettem meg, mindkettőből 3-3 párhuzamosat. Az emésztendő mintákhoz hozzáadtam 20 µl 500 mM-os ammónium-bikarbonátot, valamint 5 µl 100 mM-os ammónium-acetátot. Ezután hozzáadtam 5 µl 5 mU/µl koncentrációjú kondroitináz ABC enzimet, majd vízzel kiegészítettem a minták térfogatát 90 µl-re és 37 °C-on, 250 rpm-en, 16 órán át emésztettem azokat. A minták emésztését úgy állítottam le, hogy egy 90 °C-ra felmelegített blokkmelegítőbe helyeztem azokat 3 percre. Ezután vákuumszáritóban beszárítottam azokat, majd a vatta-grafit kombinált tisztítást alkalmaztam rájuk. Végül HPLC-MS-sel megmértem a mintákban lévő CS diszacharidok mennyiségét (részletek: 2.11. fejezet).

2.11. Tisztítási módszerek

A munkám során használt tisztítási módszereket a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat – A munkám során alkalmazott tisztítási módszerek lépései

C ₁₈ tisztítás		Vattás tisztítás		Grafitos tisztítás	
Centrifugálás: 2000 rpm, 2 min		Centrifugálás: 2500 rpm, 1 min		Centrifugálás: 2500 rpm, 1 min	
Felület aktiválása	200 µl 50 % metanol 2x	Felület aktiválása	50 µl 40 % H ₂ O 60 % ACN	Felület aktiválása	100 µl 80 % ACN 0,1 % TFA 2x
Mosás	200 µl 0,5 % TFA + 5 % ACN 2x	Kondicionálás	50 µl 1 % TFA 95 % ACN 2x	Kondicionálás	100 µl H ₂ O 2x
Ekvilibrálás	200 µl 0,1 % TFA 2x	Eppendorfork cseréje		Eppendorfork cseréje	
Eppendorfork cseréje		Minták felvitele	1,5 µl 1 % TFA vízben oldva, utána 28,5 µl 1 % TFA ACN-ben oldva	Minták felvitele	50 µl H ₂ O-ban oldva, előtte inkubálás a készülékben 2 percig
Minták felvitele	50 µl 0,1 % TFA-ban oldva				
Minták újbóli visszapipettázása a hegyekre		Minták újbóli visszapipettázása a hegyekre 2x		Minták újbóli visszapipettázása a hegyekre	
Mosás	100 µl 0,1 % TFA 2x	Mosás	50 µl 1% TFA 95 % ACN	Mosás	100 µl H ₂ O 3x
Eppendorfork cseréje		Vatta átfolyók beszárítása		Eppendorfork cseréje	
Elúció	50 µl 70 % ACN + 0,1 % TFA 2x	Elúció	10 µl 40 °C-os 1 %-os NH ₃ oldat 2x	Elúció	50 µl 40 % ACN 0,05 % TFA
Elúciók beszárítása		Elúciók beszárítása		Elúciók beszárítása	

A CS diszacharidok tisztítására alkalmazott kombinált tisztítás a vattás és a grafitos tisztítás „keveréke”, amelynek során a vattás tisztításból származó, a mintából az oszlopon áteső és elmosott komponenseket tartalmazó, beszárított mintákat oldottam fel 50 µl vízben és alkalmaztam rá a továbbiakban a grafitos tisztítás lépéseit. Végül a grafitos tisztítás elúcióját rápipettáztam a vattás tisztítás beszárított elúciójára, és ezt szárítottam be.

2.12. Kromatográfiás és tömegspektrometriás mérési paraméterek

A peptidek kromatográfiás elválasztása során a mintákat 20 µl 0,1% hangyasavat tartalmazó 2:98 V/V% ACN:H₂O keverékben oldottuk vissza, amelyből 1,2 µl-t injektáltunk. A mintákat nanoHPLC-MS/MS-sel elemeztük egy nanoElute 2 nano-HPLC készülékkel, amely egy timsTOF HT műszerhez volt csatlakoztatva, és CaptiveSpray 1 ionforrással felszerelve. A peptideket egy Thermo Trap Cartridge oszlopon koncentráltuk, amelyeket azután egy Si_Mo_75_id C₁₈ oszlopon választottunk el. A hőmérséklet mindvégig 50 °C volt. Az elválasztást gradiens módban végeztük el, melynek paramétereit a következőkben ismertetem.

Az „A” eluens 0,1 % hangyasavat tartalmazó ultratiszta víz volt, a „B” eluens 0,1 % hangyasavat tartalmazó 100 %-os tisztaságú ACN volt, az áramlási sebesség mindvégig 0,5 µl/min volt. A program összideje 30 perc volt. A „B” eluens aránya az alkalmazott gradiensprogram során a következő volt: 0-17,8 perc: egyenletes növekedés 5 %-ról 30 %-ra, 17,8-18,3 perc: egyenletes növekedés 30 %-ról 95 %-ra, 18,3-21 perc: 95 %, 21-25 perc: egyenletes csökkenés 95 %-ról 5 %-ra, amelyet egy 5 perces ekvibrálási fázis követett.

A DDA proteomikai tömegspektrometriás mérési beállítások a következők voltak: az m/z tartomány = 100-1700 Th, ionmobilitási tartomány = 0,84-1,3 1/K0, átviteli idő = 60 µs, elő-tárolási idő = 12 µs, ionpolaritási mód = Pozitív, pásztázási mód = MS/MS. A TIMS beállítások paraméterei: a ramp idő és az akkumulációs idő egyaránt 180 ms volt. A PASEF paraméterek a következőkre voltak beállítva: MS/MS pásztázások = 4, teljes ciklusidő = 0,93068 s, töltési tartomány = 0-5, kizárási ablak tömegszélesség = 0,015 m/z , kizárási ablakszélesség = 0,015 V·s/cm².

Az *N*-glikopeptidek kromatográfiás elválasztása során a mintákat 10 µl HPLC H₂O-ban oldottuk vissza, amelyből 2 µl-t injektáltunk. Az elválasztást egy ThermoFisher Exploris 240 Orbitrap tömegspektrométerhez kapcsolt Waters nanoAcquity nanoUHPLC készülékkel végeztük. Az *N*-glikopeptideket egy Symmetry® oszlopon koncentráltuk, amelyeket azután egy Acquity M-Class BEH130 C18 analitikai kolonnán választottunk el. Az „A” eluens 99,9 % H₂O + 0,1 % hangyasav, a „B” eluens pedig 99,9 % ACN + 0,1 % hangyasav volt, az áramlási sebesség mindvégig 300 nl/perc volt. A program összideje 90 perc volt. A „B” eluens aránya az alkalmazott gradiensprogram során a következő volt: 0-1 perc: 2 %, 1-82 perc: egyenletes növekedés 25 %-ra, 82-85 perc: egyenletes növekedés 40 %-ra, 85-86 perc: egyenletes növekedés 90 %-ra, 86-87 perc: 90 %, 87-89 perc: egyenletes csökkenés 2 %-ra. Egy *N*-glikopeptid minta kromatogramja a Függelékben, az **F1. ábrán** látható.

Az *N*-glikoproteomikai tömegspektrometriás méréseket egy ThermoFisher Exploris 240 Orbitrap készülékkel végeztük el. A kapilláris hőmérséklete 275 °C volt, a porlasztó- és vivőgáz áramlási sebességei egyaránt 0 egységre voltak beállítva. A készülék pozitív módban volt üzemeltetve, az ionforrás kapilláris feszültsége pedig 1,8 kV-ra volt állítva. A felbontás teljes MS módban 120 000, az AGC értéke $2 \cdot 10^6$, a maximális injektálási idő pedig 200 ms volt. A vizsgált tömegtartomány 360-2200 Th m/z volt. MS/MS módban az ionizációs ablak 2 Th m/z , a HCD lépcsőzetes ütközési energiák 10, 20 és 30 V-okra voltak beállítva. MS/MS módban a felbontás szintén 120 000, a maximális injektálási idő is szintén 200 ms, az AGC értéke $2 \cdot 10^5$,

a vizsgált tömegtartomány pedig 200-2000 Th m/z volt. A minimum AGC érték $1 \cdot 10^3$, a minimum prekursor intenzitás $1,7 \cdot 10^4$ volt.

A CS diszacharidok mérései esetén a mintákat 8 μ l 10 mM-os ammónium-formiát + 75 % ACN (pH = 4,4) oldatban oldottuk fel, amelyből 1,5 μ l-eket injektáltunk. A kromatográfiás elválasztást egy Waters Select Series ciklikus ionmobilitás-tömegspektrométerhez kapcsolt Waters Acquity I-class UPLC készüléken végeztük el. A diszacharidokat egy, a kutatócsoportunkban korábban kifejlesztett, saját töltésű HILIC-WAX kapilláris oszlopon választottuk el. Az „A” és „B” eluensek rendre 10 mM-os és 65 mM-os ammónium-formiát + 75 % ACN (pH = 4,4) oldatot tartalmaztak, az áramlási sebesség mindvégig 10 μ l/perc volt. A program összideje 10 perc volt, amely alatt a CS diszacharidok izokratikus elúcióval (8 % „B”) kerültek elválasztásra. Egy minta CS diszacharidjainak kromatogramjai a Függelékben, az **F2. ábrán** láthatók.

A detektáláshoz egy Waters Select Series ciklikus ionmobilitás-tömegspektrométert használtunk alacsony áramlású ESI ionforrással, negatív ionizációs módban. A kapilláris feszültség 1,9 kV, a kúp feszültség 20 eV, míg az ionforrás hőmérséklete 120 °C volt. A CS diszacharidok mérésekor a D0a4 és D0a6 izomer párok megkülönböztetése érdekében MS1 és MS/MS spektrumokat is rögzítettünk. Ezek esetében a fragmentáció az átviteli szakaszban történt, 32 eV ütközési energiával.

2.13. Szoftveres kiértékelések

2.13.1. Fehérjék szoftveres kiértékelése

A fehérjék tömegspektrometriás méréseinek eredményeit a Byonic szoftverrel értékeltem ki. A szoftveres elemzéshez be kellett állítanom a használt készülék, valamint az enzimes emésztés paramétereit, illetve a lehetséges fehérjemódosításokat is (ideértve a mintaelőkészítés során saját magam által hozzáadott, meghatározott tömegű módosítást (Karbamidometil) is) (**3. táblázat**).

3. táblázat – A fehérjék Byonic-os kiértékelése során beállított paraméterek

Készülék paraméterei		Emésztési paraméterek	
Prekurzor tömegtolerancia	10 ppm	Hasítási hely	KR (Lys, Arg)
Fragmens tömegtolerancia	20 ppm	Hasítási oldal	C-terminális
Fragmentáció fajtája	QTOF/HCD	Emésztési specificitás	Teljesen specifikus
Rekalibráció	Nincs	Kihagyott hasítási helyek száma	2
Megengedett módosítások			
Karbamidometil (fix)	Oxidáció (gyakori)		Deamidáció (ritka)
Egyéb paraméterek			
Maximum FDR		1 %	

Az egyes mintákban található fehérjék azonosításához szükségesek voltak a tömegspektrometriás, illetve a tandem tömegspektrometriás spektrumok, valamint a lehetséges fehérjék listája referenciaként. Az azonosításhoz referencia adatbázisként egy, a UniProt weboldaláról (<https://www.uniprot.org/>) letöltött teljes humán proteom adatbázist használtam FASTA fájlformátumban letöltve.

A Byonic-os azonosítás által kiadott eredményeket utólag szűrtem. Csak akkor fogadtam el egy fehérjét megbízható találatnak, ha a logProb értéke 2 felett volt, valamint legalább két egyedi peptiddel rendelkezett. Ezt követően megszámláltam, hogy a megmaradt fehérjék közül mennyi egyezik meg az Exocarta weboldalán (http://exocarta.org/exosome_markers_new) lévő 100 leggyakoribb vezikula marker fehérjével.

2.13.2. N-glikoproteinek szoftveres kiértékelése

Az *N*-glikoproteinek azonosításához szintén a Byonic szoftvert használtam, mivel a program a beépített *N*-glikán adatbázisa révén *N*-glikopeptideket is tud azonosítani. Az azonosításhoz a teljes humán proteomot használtam, a UniProt weboldaláról letöltött FASTA fájl formájában. Az *N*-glikopeptidek azonosításához egy 182 db humán *N*-glikánból álló adatbázist használtam, glikánonként maximum egy fukózzal.

Az *N*-glikoproteinek mennyiségi elemzéséhez a GlycReSoft szoftvert alkalmaztam. Ez a program azért alkalmas LC-MS alapú *N*-glikoproteomikai mérések kiértékelésére, mert a spektrumadatok dekonvolúciója révén azonosítani tudja a mintában jelen lévő glikánokat és *N*-glikopeptideket. Ehhez először egy keresési teret hoz létre, amely vagy egy előre megadott glikánlistából, vagy kombinatorikusan létrehozott glikánokból épül fel. Ezt követően a fehérjelistából *in silico* emésztés útján keletkező elméleti peptidekhez társítja a potenciális glikánokat a lehetséges glikozilációs helyeken. A keresési terek mellett a program elméleti tömegspektrumokat is generál, amelyeket a mért spektrumokhoz viszonyít.

A glikánok keresési terét a humán sejtek által szintetizált *N*-glikánok összetétele alapján építettem fel, amely összesen 448 db glikánstruktúrát tartalmazott. Az *N*-glikopeptid keresési tér létrehozásához egy kevésbé szigorú Byonic keresést futtattam le, az összes mérési adatot egyetlen fájlba kombinálva, 2 % FDR mellett. Ez a keresés összesen 862 db humán *N*-glikoproteint azonosított. Peptidenként egy glikozilációs kötőhelyet engedélyeztem, és az *in silico* peptidhasításhoz legfeljebb két hiányzó hasítási helyet fogadtam el. Az MS1 és MS2 spektrumok tömegpontosságát rendre 10 ppm-re és 20 ppm-re állítottam be, a spektrumok feldolgozása során figyelembe véve a fehérjemódosításokat is, amelyek megegyeztek a Byonic beállításával.

A glikozilált marker fehérjék szerkezeteinek azonosításához további szűrési lépéseket kellett elvégezni a Byonicból kiexportált adatokon. Csak akkor fogadtam el egy *N*-glikopeptidet megbízható találatnak, ha a logProb értéke 1,3 felett volt, valamint a Score értéke 100 felett volt. Ezt követően mindkét sejtvonalon esetén kikerestem a táblázatokban a glikozilált marker fehérjék szerkezeteit, amelyeket a GlycoWorkbench program segítségével ábrázoltam.

A statisztikai kiértékeléseket az RStudio program segítségével végeztem el. A programba kiindulási adatsorként a GlycReSoft-ból kiexportált, az egyes minták *N*-glikoproteomikai mérési adatait reprezentáló Excel táblázatokat importáltam be. A statisztikai tesztek elvégzése előtt imputálást végeztem azokra az *N*-glikopeptidekre, amelyeket a GlycReSoft az egyik csoport mintáinak legalább felében (azaz legalább 3 mintában) megtalált. Ezen *N*-glikopeptidek egyes mintákban mért intenzitását teljes területre normalizáltam, amely az adott glikopeptid intenzitásának a minta összintenzitásával való elosztását jelentette.

Ezt követően kezdtem meg az eredmények statisztikai elemzését, amelyek elvégzésére egy olyan függvényt használtam, amely a varianciaegyenlőség- és normalitásvizsgálatok eredményeitől függően kiválasztotta a megfelelő tesztet (kétmintás t-próba, Welch-próba, Mann-Whitney-próba) a csoportok közötti különbségek kiértékelésére. Miután az adatok imputálását és normalizálását elvégeztem, a függvény a csoportok intenzitásadataira alkalmazta a fentebb említett statisztikai teszteket. A tesztek kiválasztása után a függvény kiszámította a p-értékeket (a 0,05-nél kisebb p-értékeket vettem statisztikailag szignifikánsnak) és a „Fold Change” értékét (ennek a határát 10-szeres alul/felülreprezentálásra állítottam be). Ezek az értékek azt mutatják meg, hogy hányszorosára változott az *N*-glikopeptidek mennyisége a tumoros mintákban az egészséges mintákhoz képest.

2.13.3. Glükózaminoglikánok szoftveres kiértékelése

A kiértékeléshez a MassLynx programot használtam, amelyben kiintegráltam a különböző szulfatáltságú CS diszacharidok MS és MS/MS csúcsait. Az egyes csúcsok területértékeit kiexportáltam egy táblázatba. Ezután az egyes minták abszolút területértékeit a kalibráló sorok mért adatai segítségével normalizáltam és átszámoltam fmol/ μ l-re. A két egyszeresen szulfatált CS diszacharid (D0a4 és D0a6) arányát is az MS/MS csúcsok kiintegrált területeiből számoltam ki a kalibráló sorokkal való normalizálással és koncentrációra való átszámolással. Az így kapott koncentrációkat százalékosan osztottam el a minták között, hogy meghatározzam a komponensek mintákon belüli megoszlási arányát. Ezután a négyféle, különböző szulfatáltságú CS diszacharid normalizált koncentrációit kiátlagoltam az egyes mintacsoportokon belül, majd kiszámoltam a szórásaikat is. Az A549 csoport egy mintájában – feltehetőleg mintaelőkészítési hiba miatt – nem tudtam detektálni a GAG diszacharidokat, ezért azt kihagytam az adatértékelésből.

Ezt követően az egyes mintákhoz tartozó különböző szulfatáltságú CS diszacharidok normalizált koncentrációit összeadtam, majd az egyes komponensek normalizált koncentrációit a normalizált összkoncentrációval leosztva kiszámoltam a D0a0, a D0a4, a D0a6 és a D0a10 normalizált százalékos megoszlási arányát (azaz a relatív mennyiségeiket). A normalizált százalékos megoszlásokat kiátlagoltam az egyes csoportokon belül, majd kiszámoltam a hozzájuk tartozó szórásokat is. Ezután az átlagos szulfatációs fokot számoltam ki, amelynél az egyes CS diszacharidok relatív gyakoriságait azok szulfatáltságának mértékeivel szoroztam össze (nem szulfatált = 0, egyszeresen szulfatáltak = 1, kétszeresen szulfatált = 2), majd összeadtam azokat. Utána a 6S/4S arányt számoltam ki a D0a6 és a D0a4 egyszeresen szulfatált CS diszacharidok abszolút mennyiségeinek hányadosából.

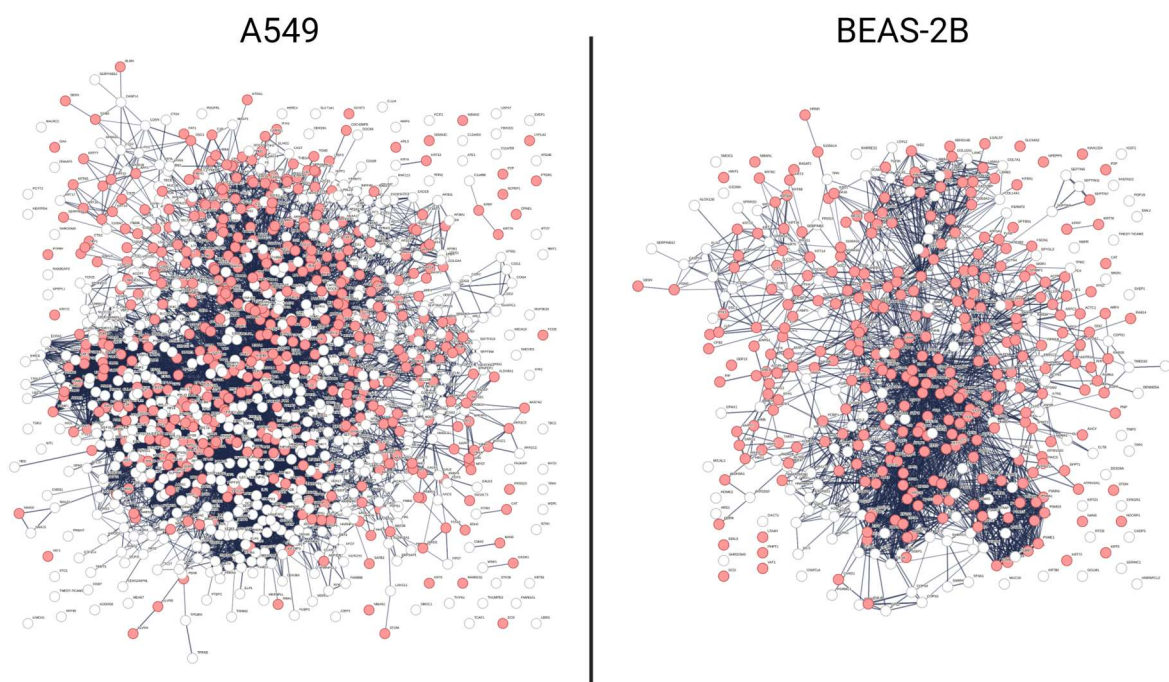
A statisztikai kiértékeléseket az RStudio program segítségével végeztem el. A programba kiindulási adatsorként a különböző szulfatáltságú CS diszacharidok koncentrációit tartalmazó táblázatot importáltam be. Az eredmények statisztikai elemzésének első lépéseként a kezdeti feltételeket Shapiro-Wilk- (normalitásvizsgálat), valamint Levene-próbákkal (variációk egyenlőségének vizsgálata) ellenőriztem. Ezen tesztek eredményeitől függően alkalmaztam a két csoport elemeinek összehasonlítására a kétmintás t-próbát (adatok normális eloszlásúak, variációk egyenlőek), a Welch-próbát (adatok normális eloszlásúak, variációk nem egyenlőek), illetve a Mann-Whitney-próbát (adatok nem normális eloszlásúak). A 0,05-nél kisebb p-értékeket vettem statisztikailag szignifikánsnak (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

3. Eredmények és értékelésük

3.1. sEV-k proteomikai jellemzése

A proteomikai vizsgálatok során az A549-ben 1403 db, míg a BEAS-2B-ben 659 db fehérjét azonosított a Byonic szoftver, melyek az elvégzett szűrési lépések (ld. 2.12.1. fejezet) után 1178 db-ra (A549), illetve 470 db-ra (BEAS-2B) csökkentek. Az A549-ben talált fehérjék közül 71 db, a BEAS-2B-ben talált fehérjék közül pedig 70 db egyezett meg az Exocarta weboldalán (http://exocarta.org/exosome_markers_new) lévő 100 leggyakoribb vezikula marker fehérjével. Ezenkívül 14 db proteoglikán (PG) vázfehérjét is sikerült azonosítanom a két sejtvonalban, amelyek a következők voltak: verzikán, agrin, lumikán, glipikán-1, glipikán-6, szindekán-1, szindekán-4, biglikán, tesztikán-1, aggregán, CD44, fibromodulin, perlekán és mimekán. A PG vázfehérjék számos funkciót látnak el sejtek és a szövetek működése során, így azonosításuk kiemelten fontos többek között a rákos megbetegedések kialakulásának jobb megértése, valamint a gyógyszeres kezelési lehetőségek fejlesztése érdekében. Emellett a PG vázfehérjék azonosítása igazolja azt is, hogy érdemes a GAG-okat is vizsgálni a mintákban.

A mérési fájlok Byonic-os lekeresései, valamint az azokat követő szűrések után a talált fehérjék génneveit beimportáltam a STRING internetes adatbázisába (<https://string-db.org>), amelynek segítségével kirajzoltattam a fehérje-fehérje interakciós hálózatot az A549-re, illetve a BEAS-2B-re is (9. ábra).



9. ábra – Az A549-ben és a BEAS-2B-ben talált, szűrt fehérjék interakciós hálózata. Piros színnel az extracelluláris vezikulákban igazoltan megtalálható fehérjék vannak jelölve

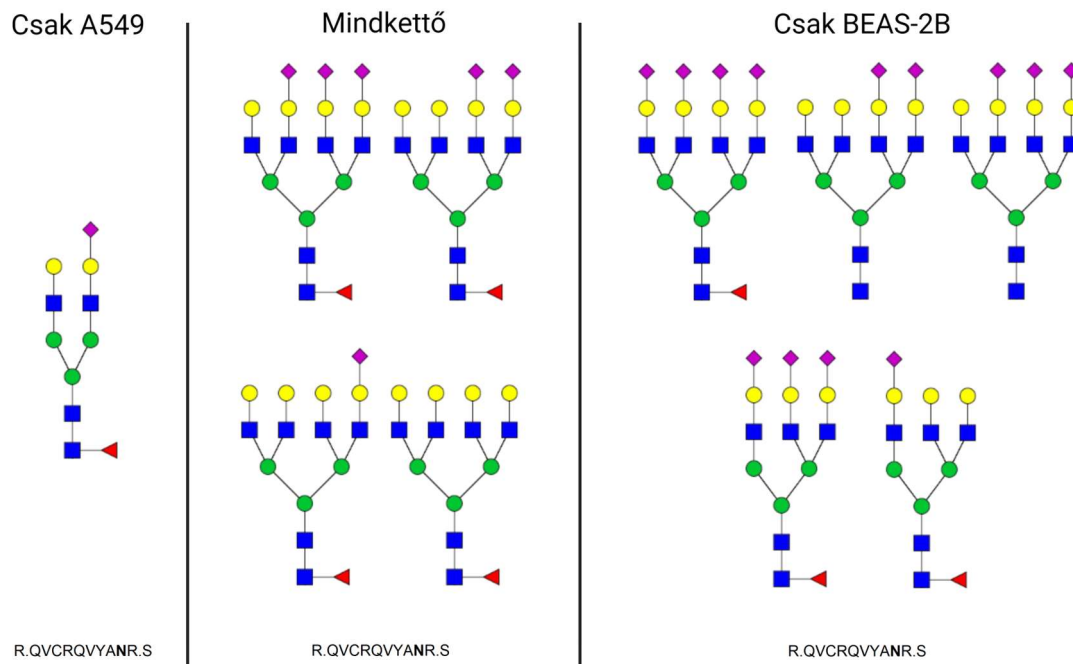
A fehérje-fehérje kölcsönhatások ábrázolásánál erős 0,7-es interakciós megbízhatósági szintet állítottam be, ugyanis minél magasabb ez az érték, annál biztosabb, hogy a fehérjék között valóban fennáll kölcsönhatás. Piros színnel az extracelluláris vezikulákból származó fehérjéket emeltem ki. Mindkét sejtvonal fehérjei esetén látható, hogy nagyon sok fehérje áll közvetlen, illetve közvetett kapcsolatban egymással. Ez a magas hálózati sűrűség arra utal, hogy a fehérjék szorosan kapcsolódnak egymáshoz.

Összefoglalásként elmondható, hogy a mérések Byonic-os lekeresései, majd az azokat követő szűrések után sok fehérje, köztük rengeteg EV marker fehérje volt azonosítható mind az A549-ben, mind pedig a BEAS-2B-ben. A STRING-ben való ábrázolás során megállapítható volt, hogy az azonosított fehérjék igen jelentős része tisztán extracelluláris vezikulákból származik, amely a későbbiekben fontos kiindulópontként szolgálhat az EV-k *N*-glikoproteomikai és GAG-omikai vizsgálataihoz.

3.2. sEV-k *N*-glikoproteomikai jellemzése

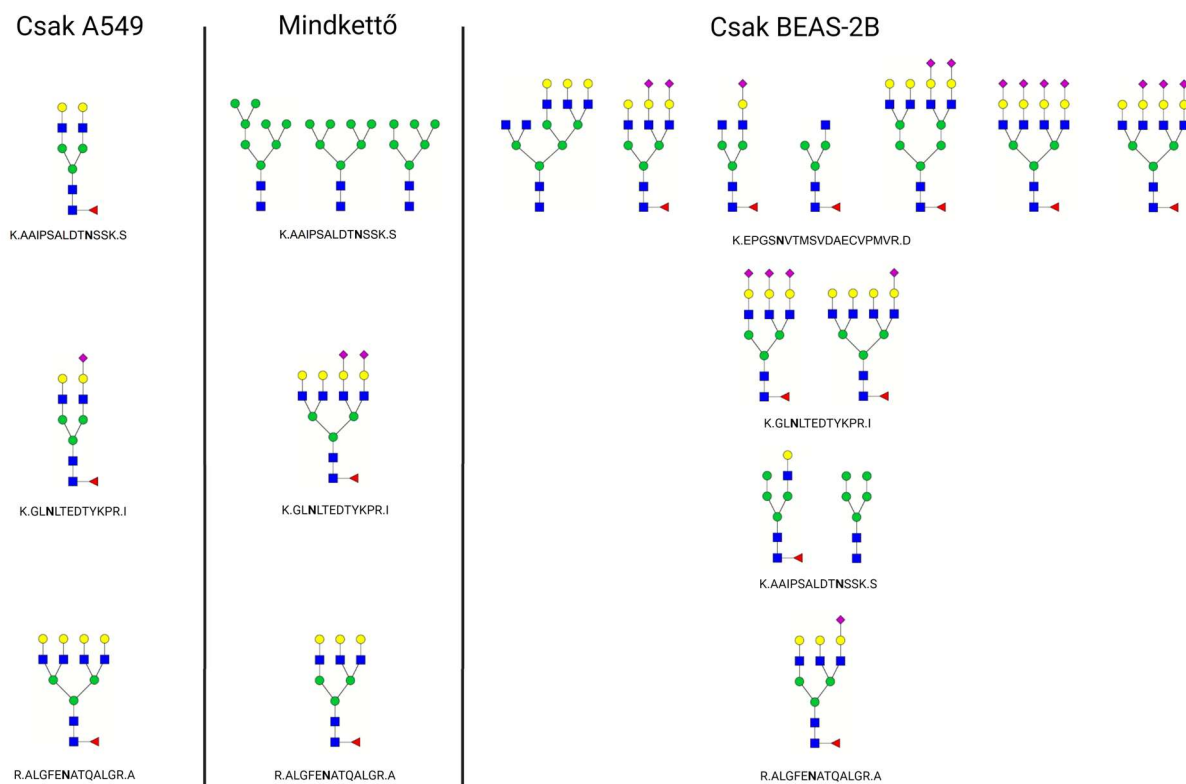
Az *N*-glikoproteomikai vizsgálatok során a számítógépes kiértékelés első lépése a glikozilált peptidek és fehérjék Byonic-kal való azonosítása volt. Az elvégzett szűrési lépések (ld. 2.12.2. fejezet) után az A549 esetén 220 db *N*-glikopeptidet azonosítottam 60 db glikozilált fehérjéről, a BEAS-2B esetén pedig 244 db *N*-glikopeptidet azonosítottam 62 db glikozilált fehérjéről. Néhány kiemelten fontos fehérje esetén is azonosítottam *N*-glikopeptideket, amelyeket a következőkben mutatok be részletesebben.

A tromboszpondin-1 egy multifunkcionális *N*-glikozilált marker fehérje, amely számos biológiai folyamatot befolyásol [104]. Daganatos megbetegedések esetén szerepe azért kulcsfontosságú, mert képes gátolni a tumor angiogenezisét, ezáltal megakadályozni a tumor vérellátását. Funkciói, valamint más fehérjékkel való kölcsönhatásai a sokféle lehetséges PTM-nek köszönhetően dinamikusan képesek változni. A tromboszpondin-1 A549-ben, illetve BEAS-2B-ben megtalált szerkezeteit a **10. ábra** mutatja. Látható, hogy mindkét sejtvonal esetén kizárólag komplex típusú *N*-glikoproteinek voltak jelen, valamint, hogy a BEAS-2B-nél elágazóbb, több antennás szerkezeteket azonosítottunk.



10. ábra – A tromboszpondin-1 különböző szerkezetei a kétféle sejtvonalban

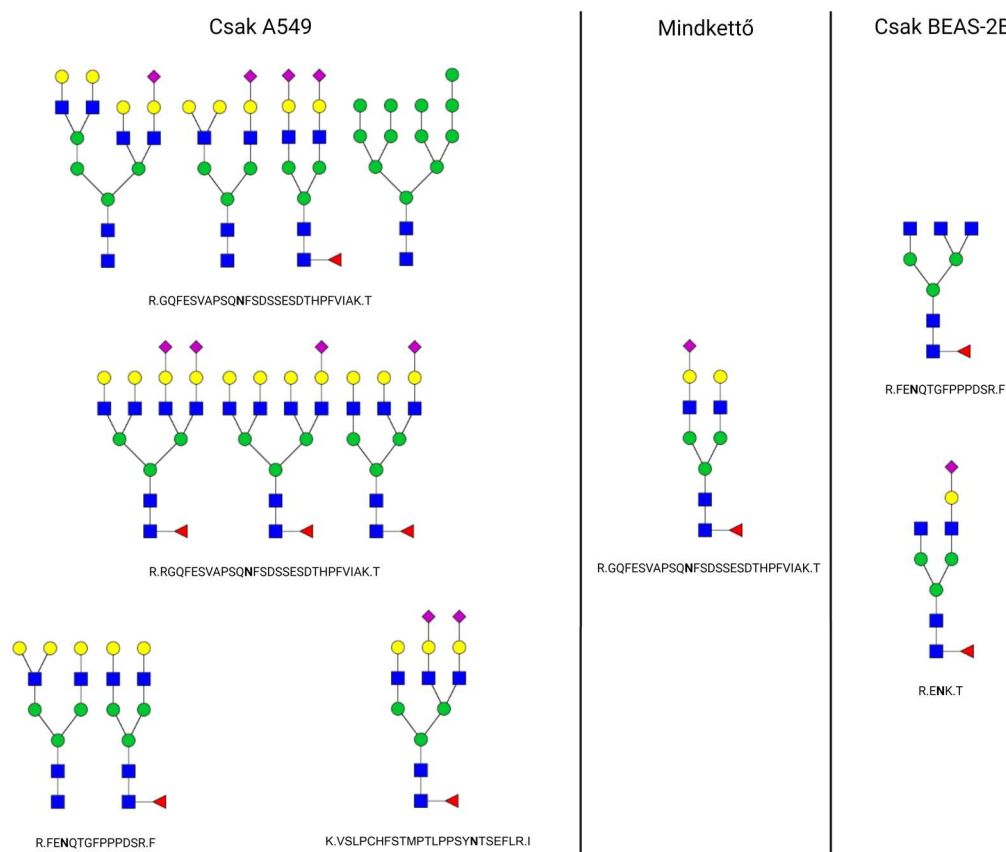
A galektin-3 kötő fehérje szintén egy kiemelten fontos *N*-glikozilált marker fehérje, mivel befolyásolni tudja az ECM-ben lezajló jelátviteli folyamatokat. Bizonyos tumor típusok esetén fokozottan expresszálódik, ezért biomarkerként is alkalmazzák [105]. A galektin-3 kötő fehérje A549-ben, illetve BEAS-2B-ben azonosított szerkezeteit a 11. ábra mutatja.



11. ábra – A galektin-3 kötő fehérje különböző szerkezetei a kétféle sejtvonalban

Az ábrán látható, hogy a kétféle sejtvonalban egyaránt előfordulnak magas mannóz, komplex, valamint hibrid szerkezetek is. Megfigyelhető azonban, hogy a különböző glikozilációs helyeken mások a jellegzetes szerkezetek, például az AAIPSALDTNSSK glikopeptid esetén elsősorban magas mannóz szerkezeteket azonosítottam, a GLNLTEDTYKPR glikopeptid esetén pedig többantennás komplex szerkezeteket.

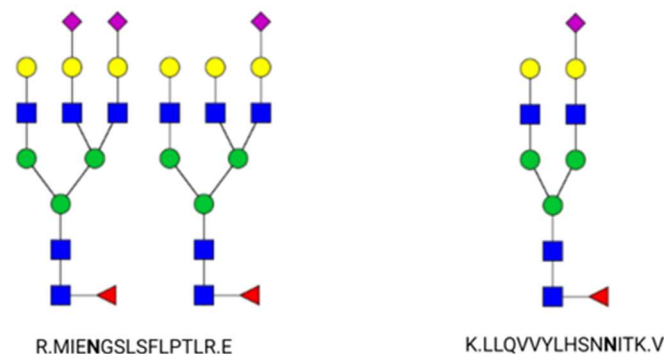
A verzikán egy PG vázfehérje, amely központi szerepet tölt be az ECM-ben lezajló biokémiai folyamatok szervezésében, például a szövetek szerkezetének fenntartásában, valamint a daganatok és egyéb gyulladásos folyamatok kialakulásában [106]. A verzikán A549-ben, illetve BEAS-2B-ben megtalált szerkezeteit a **12. ábra** mutatja. Látható, hogy túlnyomórészt komplex szerkezeteket sikerült azonosítani, illetve, hogy az A549-ben sokkal több és komplexebb *N*-glikopeptid volt megtalálható, viszont magas mannóz szerkezet is előfordult közöttük.



12. ábra – A verzikán különböző szerkezetei a kétféle sejtvonalban

A biglikán szintén egy multifunkcionális glikozilált PG vázfehérje, mely fontos szerepet tölt be az egészséges ECM szerkezetének felépítésében, és a szövetek mechanikai tulajdonságainak fenntartásában. Ezenkívül részt vesz a sejtek közötti jelátvitel szabályozásában, illetve stressz hatására aktiválja az immunrendszert gyulladások kialakítása

által [107]. Tumorbiológiai szerepe kettős: bizonyos körülmények között elősegíti a tumoros sejtek növekedését, más esetekben viszont tumorelles hatása is lehet. Az azonosított biglikán szerkezeteket a **13. ábra** szemlélteti, melyek közül mindegyik komplex típusú volt. Biglikán *N*-glikoprotein szerkezeteket kizárólag a BEAS-2B sejtvonalban lehetett azonosítani. Korábban csoportunkban vizsgáltak tüdőrákos szövetmetszeteket, ahol több biglikán glikopeptid is alulreprezentált volt a tumoros mintacsoportban a környező normál régiókhoz képest, amely összhangban van a jelen vizsgálatok eredményeivel.

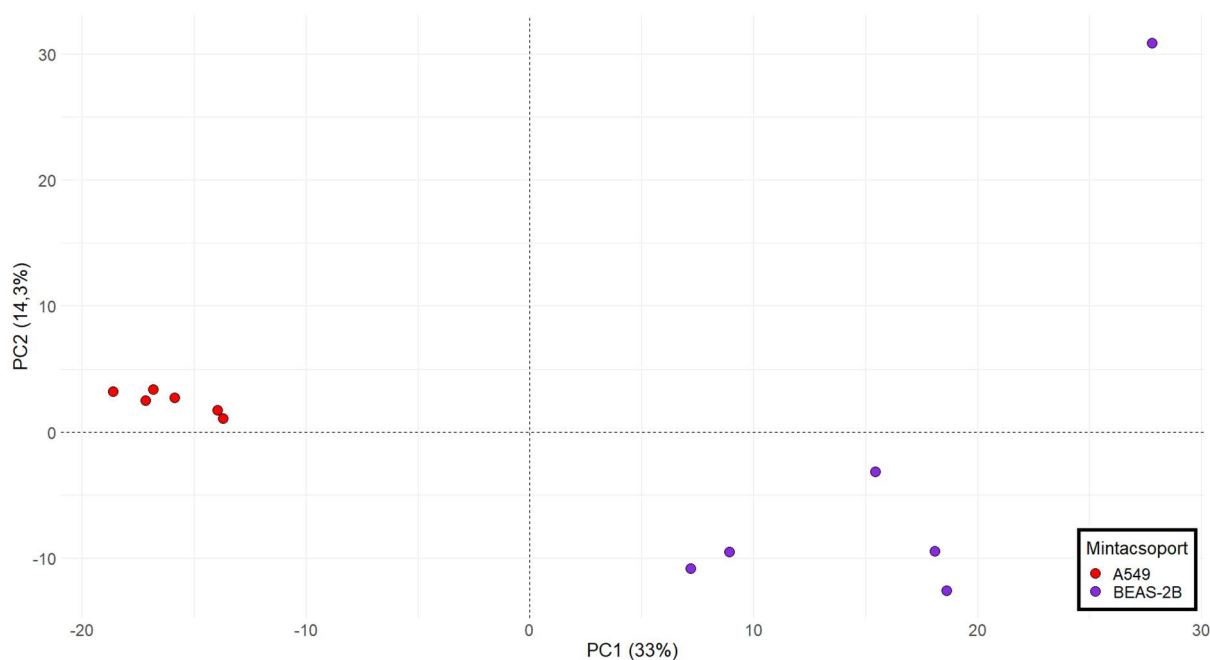


13. ábra – A biglikán különböző szerkezetei a BEAS-2B sejtvonalban

A kvantitatív jellemzéshez az elvégzett szűrési lépések (ld. 2.12.2. fejezet) után azonosított 862 db fehérje listáját adtam meg bemenetként a GlycReSoft-ba annak érdekében, hogy lecsökkentssem a keresési teret és az FDR-t. A szoftver ezt követően a *Homo sapiens*-re jellemző beépített adatbázis segítségével *in silico* emésztést végzett a megadott fehérjéken, és legenerálta a potenciális *N*-glikopeptidek elméleti tömegspektrumait. Ezeket az elméleti spektrumokat az *N*-glikoproteomikai mérések során kapott spektrumokkal vetette össze. Az azonosított *N*-glikopeptidek kvantifikálása az extrahált ionkromatogram csúcs alatti területe alapján történt. A program emellett az azonosítás minőségét FDR számítással is ellenőrizte, amit a „*target-decoy*” módszerrel végzett el. A program 6980 db különböző *N*-glikopeptid típust és 715 db különböző *N*-glikoproteint talált és határozta meg azok mennyiségeit az összesen 12 db mintából.

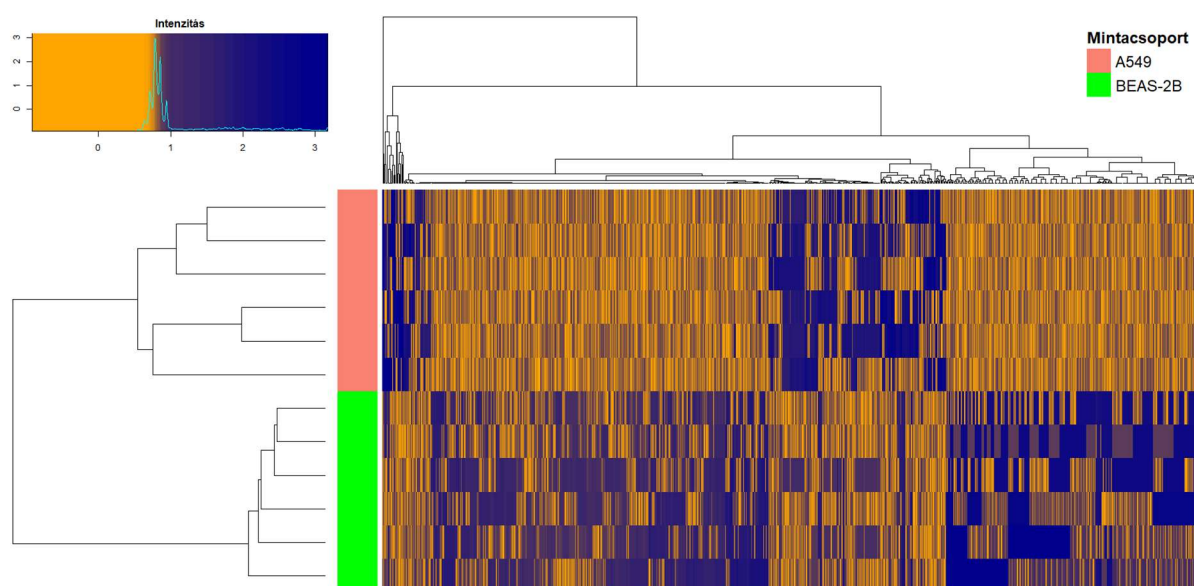
Az *N*-glikopeptidek közül csak 931 db volt jelen legalább a minták felében legalább az egyik mintacsoportban. Ezek közül 158 db *N*-glikopeptid volt jelen legalább 6 db mintában. Ennek a nagymértékű variabilitásnak valószínűleg a nagyfokú mikroheterogenitás lehet az oka, vagyis az, hogy az egy adott glikozilációs helyhez kapcsolódó glikánstruktúrák sokfélesége az *N*-glikoproteinek esetében meglehetősen nagy lehet. A főkomponens-analízist (principal component analysis, PCA), a hőtérképet és a „volcano plot”-ot erre a 931 db glikopeptidre végeztem el.

Először a PCA-t végeztem el a mintaelemekre (**14. ábra**). Az ábrán jól látszik, hogy a tumoros és az egészséges csoport elemei nagyon jól elkülönülnek egymástól az első főkomponens mentén, amely igazolja, hogy két csoport elemei közötti eltérések szignifikánsak.



14. ábra – Az *N*-glikopeptidekre elvégzett főkomponens-analízis eredménye a két csoport szerint megosztva

Ezt követően oly módon szerettem volna vizualizálni a két csoport elemeinek a különbözőségét, amely hierarchikusan rendezi a minták adatait aszerint, hogy mely *N*-glikopeptidok változnak a leghasonlóbban a minták között, és mely minták *N*-glikopeptid profilja a leghasonlóbb. Ennek megfelelően egy olyan hő térképen ábrázoltam az adatokat (**15. ábra**), amely hierarchikusan klaszterezte azokat.



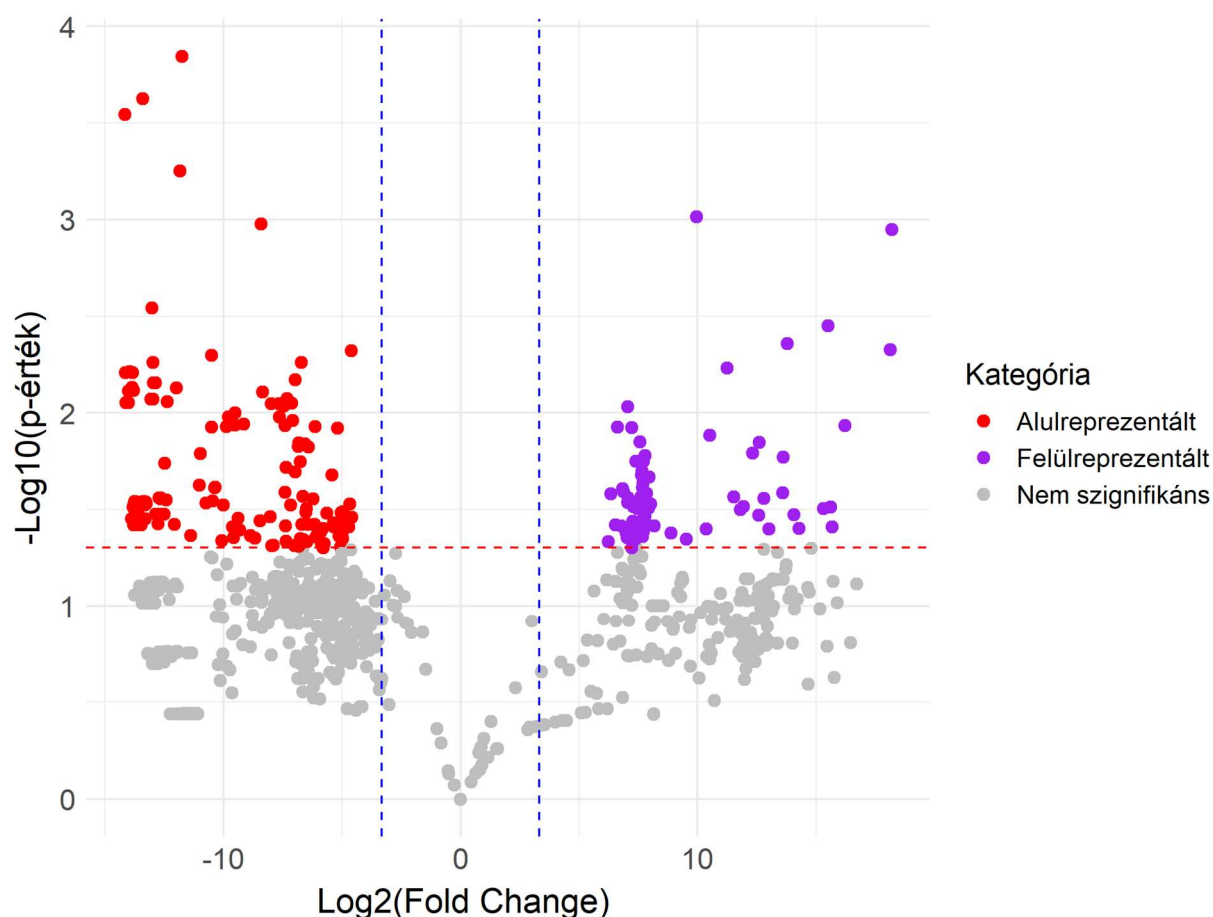
15. ábra – A két csoport mintáinak abszolút *N*-glikopeptid mennyiségeit hierarchikusan klaszterező hő térkép

A bemeneti adatokat a program standardizálta, így az értékek a szórásaik alapján térnek el kisebb-nagyobb mértékben a standardizált középértéktől. A hő térképen a színek árnyalata és intenzitása ez alapján került meghatározásra, azaz, hogy az egyes mintákhoz tartozó mennyiségi értékek az átlaghoz képest milyen előjelűek. Az ábrán jól látható, hogy minden nem tumoros minta együtt klasztereződött, illetve a tumoros minták is együtt klasztereződtek. Ez megerősítette a PCA eredményét, vagyis azt, hogy a két csoport elemei jól elkülönülnek, azokat nagy biztonsággal meg lehet különböztetni egymástól az *N*-glikopeptid profil alapján.

A statisztikai teszteket a 2.12.2. fejezetben leírt módon végeztem el. Megvizsgáltam, hogy a kvantifikált *N*-glikopeptidek melyik glikán típushoz (magas mannóz, komplex, hibrid) tartoznak, amelyet a szialiláció, a fukoziláció és a galaktoziláció vizsgálatai követtek. Mivelhogy az egyes glikán típusok kölcsönösen kizárják egymást, a típusok arányainak kiszámításához az adott típusú glikánok adott csoportban azonosított számát osztottam az adott csoportban azonosított összes glikán számával. Mivel szialiláció és galaktoziláció kizárólag az antényszerkezeten történhet, ennél fogva a számolásukhoz a szialosavat/galaktozt tartalmazó anténák számát osztottam el az összes antenna számával, tehát csak az antennával rendelkező glikánokat, vagyis a komplex és hibrid típusúakat vettem számításba. A fukoziláció számításához elosztottam a fukózt tartalmazó glikánok számát az összes glikán számával. Ehhez a magas mannóz típusú glikánokat is számításba kellett vettem, ugyanis a fukóz általában az összes *N*-glikánban közös törzsrészhez kapcsolódik.

Az *N*-glikopeptidek 96,25 %-a komplex, 2,46 %-a hibrid és 1,29 %-a magas mannóz típusú volt. A statisztikai tesztek alapján mind a szialiláció, a fukoziláció és a galaktoziláció általános mértéke is szignifikánsan megváltozott a tumoros vezikulákban (szialiláció p -értéke = $5,1 \cdot 10^{-3}$, „Fold Change” értéke = 0,86; fukoziláció p -értéke = $1,4 \cdot 10^{-2}$, „Fold Change” értéke = 1,3; galaktoziláció p -értéke = $9,5 \cdot 10^{-4}$, Fold Change értéke = 1,1). Összességében tehát a szialiláció kismértékű csökkenését, valamint a fukoziláció és galaktoziláció kismértékű növekedését tapasztaltam a tumoros mintacsoportban a nem tumoroshoz képest.

Az egyedi *N*-glikopeptidek mennyiségi változását egy „volcano plot”-on ábrázoltam a p -értékek negatív 10-es alapú logaritmusával és a „Fold Change” 2-es alapú logaritmusával függvényében (16. ábra).



16. ábra – Az *N*-glikopeptidek mennyiségeinek változását ábrázoló „volcano plot”

Az ábrán pirossal jelöltem azokat az *N*-glikopeptideket, amelyeknél $p < 0,05$ ($-\log_{10}(p) > 1,3$), és $FC < 0,1$ ($\log_2(FC) < -3,3$), ezek voltak az alulreprézentált *N*-glikopeptidek. Lilával azokat az *N*-glikopeptideket jelöltem, amelyeknél $p < 0,05$ ($-\log_{10}(p) > 1,3$), és $FC > 10$ ($\log_2(FC) > 3,3$), ezek voltak a felülreprézentált *N*-glikopeptidek. A vizsgált *N*-glikopeptidek közül összesen 233 db-nak lett 0,05-nél kisebb p -értéke, valamint 10-nél nagyobb vagy 0,1-nél kisebb „Fold Change” értéke, ebből 72 db mennyisége nőtt, 161 db mennyisége pedig csökkent a tumoros a tumoros EV-kben.

Az alulreprézentált *N*-glikopeptid vázakhöz tartozó *N*-glikozilált fehérjék között szerepelt például a szerotranszferrin, a kinezin-szerű fehérje, a biglikán, a galektin-3 kötő fehérje, a haptoglobin, a kis sűrűségű lipoprotein receptor, a laminin α -5 részegysége, a hemopexin, az utropin és a plakofilin-2. A felülreprézentált *N*-glikopeptid vázakhöz tartozó fehérjék között szerepelt például az antitrombin-III, a vakuoláris protonpumpa B részegysége, a calnexin, a vitronektin, a transzmembrán fehérje 245, a polimer immunoglobulin receptor, az α -taxilin, a galektin-7, a kalcium homeosztázis endoplazmatikus retikulum fehérje és a Rab GTPáz-aktiváló fehérje 1.

Összefoglalásként elmondható, hogy az A549 és a BEAS-2B sejtvonalakból izolált sEV-k *N*-glikoproteomikai minőségi elemzése során az A549 esetén 220 db *N*-glikopeptidet azonosítottam 60 db glikozilált fehérjéről, a BEAS-2B esetén pedig 244 db *N*-glikopeptidet azonosítottam 62 db glikozilált fehérjéről. Mindkét sejtvonalban megtalálhatók voltak olyan glikozilált marker fehérjék, mint például a tromboszpodin-1 és a galektin-3 kötő fehérje, illetve olyan *N*-glikozilált proteoglikán vázfehérjék, mint például a verzikán. Biglikán egyedül a BEAS-2B sejtvonalban fordult elő, amely korrelált a csoportunkban korábban elvégzett szövetmetszeti vizsgálatok eredményeivel. A mennyiségi elemzésnél a PCA, valamint a hierarchikusan klaszterező hőtérképen való ábrázolás megerősítette azt, hogy a tumoros és az egészséges minták jól elkülönülnek egymástól, vagyis a két csoport *N*-glikozilációja közötti eltérések jelentősek. Szignifikáns különbségek voltak kimutathatók továbbá a két csoport között a szialiláció, a fukoziláció, valamint a galaktoziláció összmértékében: a szialiláció csökkent, a fukoziláció és a galaktoziláció viszont nőtt. Ezenkívül számos egyedi *N*-glikopeptid mennyisége is szignifikánsan megváltozott.

A fentebb részletezett változásoknak komoly biológiai jelentőségük lehet. Az egyedi glikopeptidek mennyiségében, valamint a szialiláció, a fukoziláció és a galaktoziláció összmértékében mutató szignifikáns különbségek azt mutatják, hogy a glikoziláció megváltozása kardinális szerepet játszhat a daganatok kialakulása során [14], például a sejtfelszíni molekulák és az ECM szerkezetének megváltoztatása, valamint a sejtek közötti jelátvitel befolyásolása által, amely az immunrendszer megtévesztéséhez vezet. A jelenlegi szakirodalmi adatok alapján (amelyek nem EV-kre vonatkoznak) a daganatok kialakulása során a szialiláció és a fukoziláció általában nő a rákban [108-110], a galaktoziláció viszont csökken [111, 112]. Extracelluláris vezikulák szintjén azonban az *N*-glikoziláció jellemzéséről rendkívül kevés ismeret áll még rendelkezésre. Eredményeimből megállapítható, hogy a fukoziláció megváltozása szoros összefüggésben van a szakirodalomban más biológiai rendszerben leírtakkal, viszont a szialiláció és a galaktoziláció az ellentétes irányban változott.

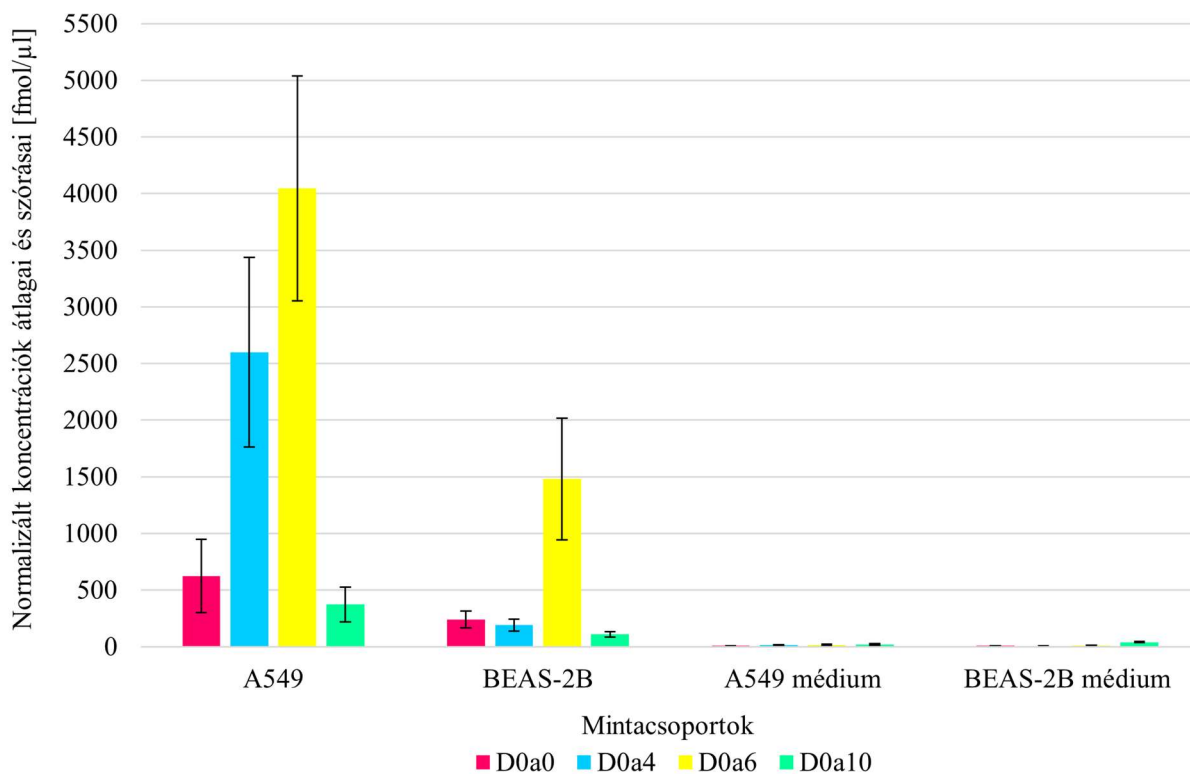
Vermassen és mtsai [113] a prosztatarákban szenvedő betegek vizeletében található EV-k felszabadulását és azok glikozilációs mintázatainak megváltozását vizsgálta az egészséges egyénekhez képest. Az általuk kapott eredmények szerint a prosztatarákos betegek vizeletében felszabaduló EV-k *N*-glikozilációs profilja szignifikánsan eltért az egészségesekéhez képest: a szialiláció és a fukoziláció egyaránt megnövekedett. Eredményeik közül a fukoziláció növekedése korrelál az általuk kapott eredményekkel.

Islam és mtsai [114] a tumor-eredetű EV-k glikozilációs mintázatainak (azon belül különösen a fukoziláció) megváltozásait vizsgálták különböző urológiai patológiájú (jóindulatú prosztata hiperpláziában, húgyhólyagrákban, illetve prosztatarákban szenvedő egyénektől vett) vizeletmintákból. Eredményeikből azt állapították meg, hogy a daganatos betegek mintái esetén megnövekedett a fukoziláció, amely összhangban áll az általam kapott eredményekkel.

3.3. sEV-k glükózaminoglikán jellemzése

A glükózaminoglikánok jellemzése során először azt vizsgáltam, hogy a két sejtvonal tenyésztésére használt médiumok mennyi CS diszacharidot tartalmaznak, és hogy ezek hogyan befolyásolják az izolált vezikulák CS diszacharid tartalmát. A vizsgálathoz kontrollként az A549 és a BEAS-2B sejtvonalak médiumaiból is azonos mennyiségeket emésztettem meg, mindkettőből 3-3 párhuzamosat.

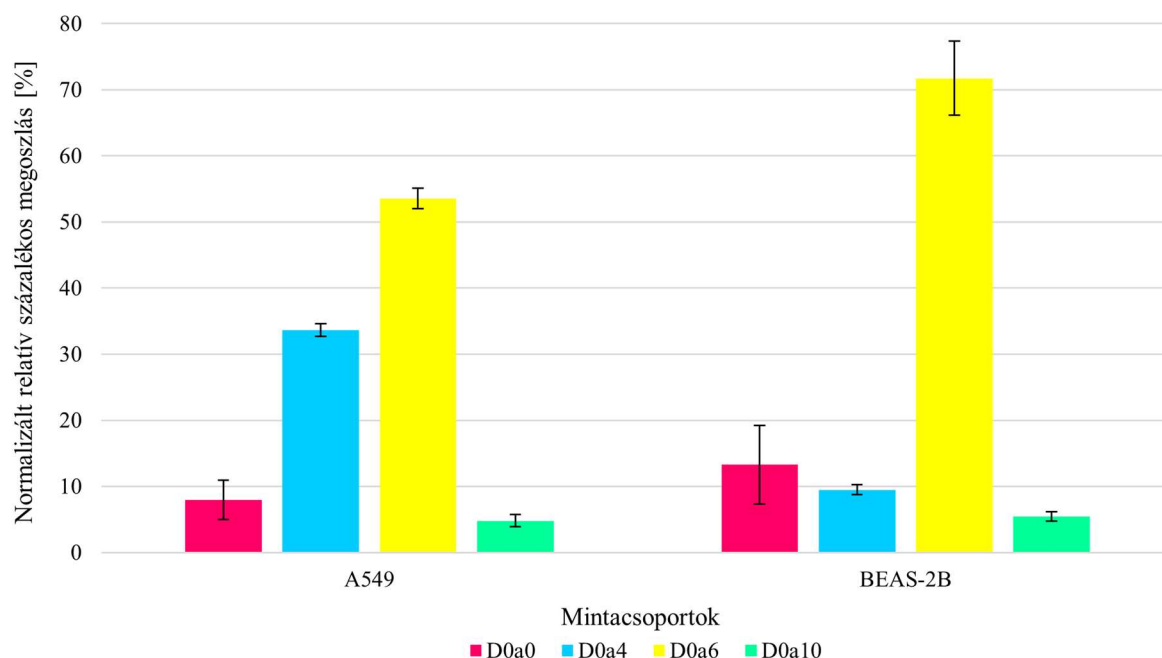
A számítógépes kiértékelés során a négyféle, különböző szulfatáltságú CS diszacharid normalizált területeit kiátlagoltam az egyes mintacsoportokon belül, majd kiszámoltam a szórásaikat is, amelyeket egy oszlopdiagramon ábrázoltam (17. ábra). Az A549 csoport egy mintájában – feltehetőleg mintaelőkészítési hiba miatt – nem tudtam detektálni a GAG diszacharidokat, ezért azt kihagytam az adatértékelésből.



17. ábra – A CS diszacharidok normalizált koncentrációinak átlagai és szórásai

Az ábrán látható, hogy mind az A549-hez, mind pedig a BEAS-2B-hez tartozó médiumokban elenyésző a különböző szulfatáltságú CS diszacharidok mennyisége. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a sejtenyésztés és a felülűszók izolálása során a médiumok nem változtatták meg az egyes sejtvonalak vezikuláiban lévő CS diszacharidok mennyiségét. Az is megfigyelhető, hogy az A549-ben az egyes CS diszacharidok össz mennyisége átlagosan 5,6-szor nagyobb, mint a BEAS-2B-ben.

A CS diszacharidok relatív mennyiségeit a két mintacsoportban a **18. ábra** szemlélteti. A nem tumoros mintacsoporthoz képest a D0a0 relatív mennyisége 0,60-szorosára, a D0a4 relatív mennyisége 3,55-szörösére, a D0a6-é 0,75-szörösére, a D0a10-é pedig 0,88-szorosára változott. Ez alapján megállapítható, hogy a két profil jelentősen eltér egymástól.



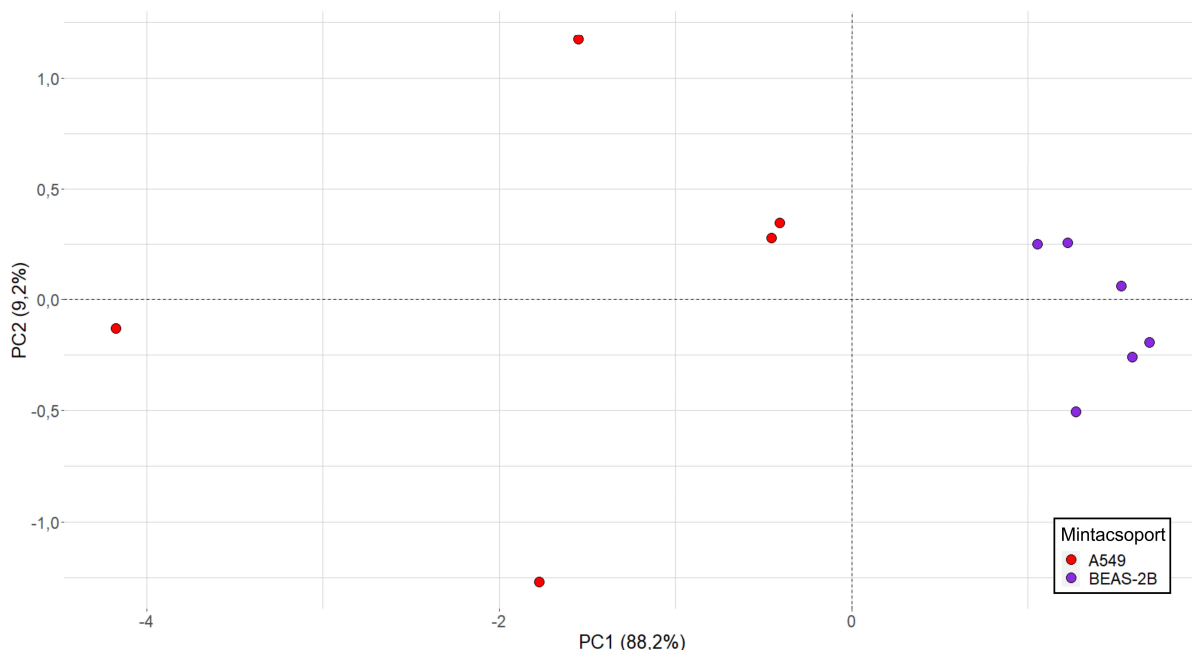
18. ábra – Az egyes mintacsoportokon belüli CS diszacharidok normalizált százalékos megoszlása

Az RStudióban lefuttatott statisztikai tesztekkel először azt szerettem volna megvizsgálni, hogy a két csoport mintáinak abszolút diszacharid mennyiségei között szignifikáns különbségek vannak-e. A próbák eredményei mind a négy CS diszacharid esetén 0,05-nél kisebb p-értéket adtak (**4. táblázat**), amelyből arra következtettem, hogy szignifikáns különbségek vannak különböző szulfatáltságú CS diszacharidok abszolút mennyiségeiben a két csoport között.

4. táblázat – Az abszolút CS diszacharid mennyiségekre lefuttatott statisztikai tesztek eredményei

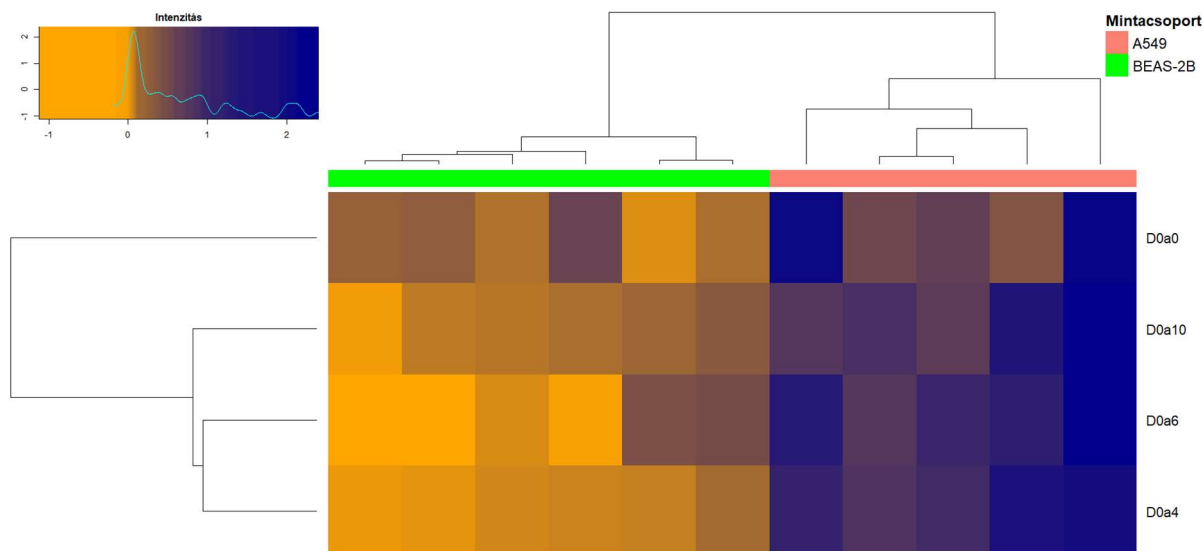
CS diszacharid típusa	Statisztikai teszt során kapott p-érték
D0a0	$1,7 \cdot 10^{-2}$
D0a4	$4,5 \cdot 10^{-3}$
D0a6	$8,1 \cdot 10^{-4}$
D0a10	$4,5 \cdot 10^{-3}$

A különböző szulfatáltságú CS diszacharidok abszolút mennyiségeinek különbségeit az egyes mintacsoportok között boxplotokon is ábrázoltam, amelyet a Függelék **F3. ábrája** szemléltet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Ezután PCA-t végeztem el az egyes mintákban található különböző szulfatáltságú CS diszacharidokra (**19. ábra**), hogy vizuálisan is szemléltessem, mennyire térnek el egymástól a tumoros és az egészséges csoportok elemei. Az ábrán jól látszik, hogy a két csoport elemei teljes mértékben elkülönülnek egymástól az első főkomponens mentén, amely igazolja a statisztikai próbák eredményeit, azaz, hogy két csoport elemei közötti eltérések szignifikánsak.

**19. ábra** – A CS diszacharidokra elvégzett főkomponens-analízis eredménye a két csoport szerint megosztva

Ezt követően egy hő térképen is ábrázoltam az adatokat (**20. ábra**). A hő térkép hierarchikusan rendezte a minták adatait aszerint, hogy mely minták, valamint, hogy mely CS diszacharidok a leghasonlóbbak. Az ábrán jól látható, hogy minden nem tumoros minta együtt klasztereződött, illetve a tumoros minták is együtt klasztereződtek. Ez megerősítette a PCA és a többi statisztikai próba által kiadott eredményeket, vagyis azt, hogy a két csoport elemei jól elkülönülnek, azokat nagy biztonsággal meg lehet különböztetni egymástól. Az egyes CS diszacharidokat reprezentáló sorok közül a két egyszeresen szulfatált CS diszacharid

klasztereződött közvetlenül együtt, majd azokat követően a kétszeresen szulfatált, végül a nem szulfatált CS diszacharid klasztereződött.



20. ábra – A két csoport mintáinak abszolút GAG mennyiségeit hierarchikusan klaszterező hő térkép

Ezt követően további statisztikai tesztek végeztem el a kiszámolt adatokon, hogy megtudjam, hogy a két csoport relatív gyakoriságai szignifikánsan eltérnek-e egymástól. A tesztek eredményeit az **5. táblázat** szemlélteti. A próbák a D0a4 és a D0a6 relatív gyakoriságainál 0,001-nél kisebb p-értéket adtak eredményül, amelyből az a következtetés vonható le, hogy a két egyszeresen szulfatált CS diszacharid relatív gyakoriságaiban szignifikáns eltérések vannak a két csoport mintái között.

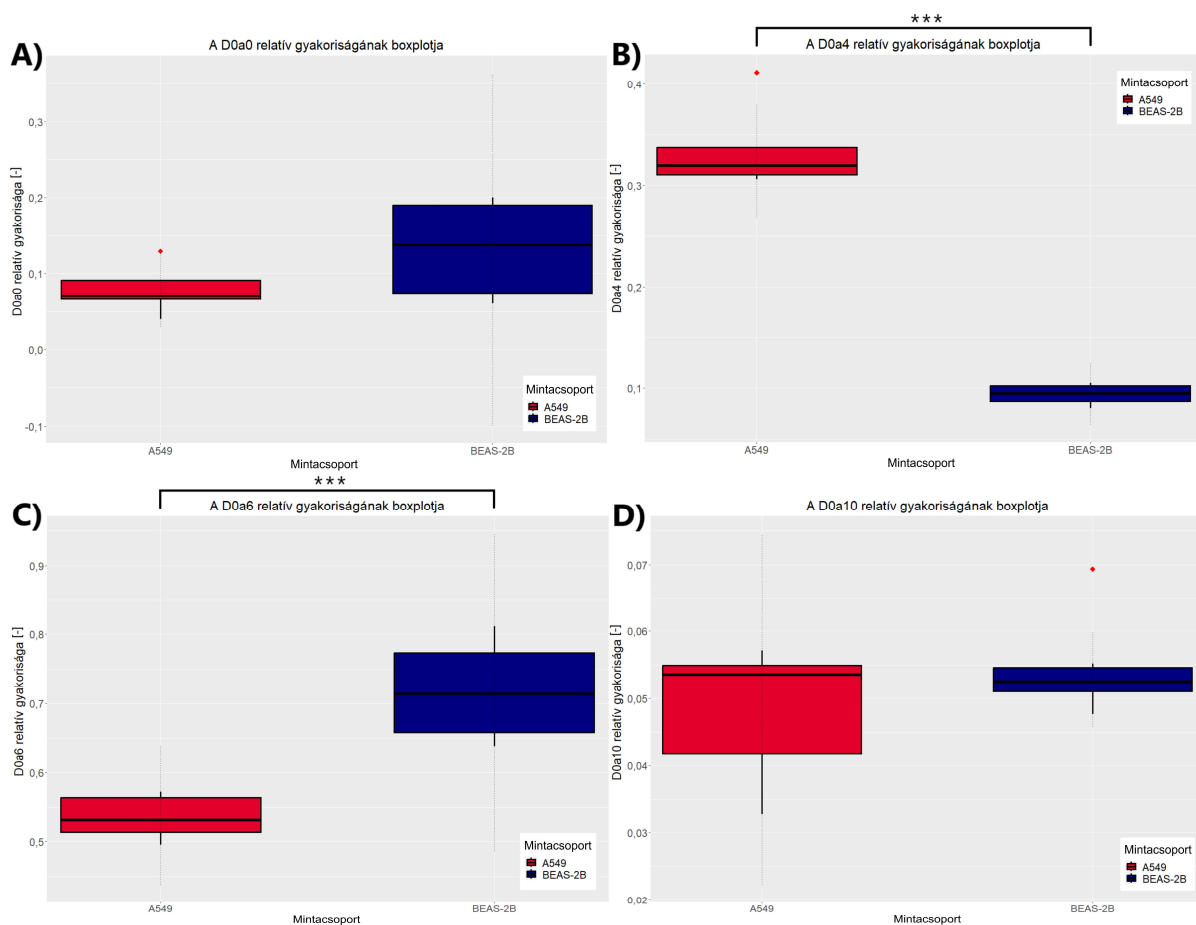
5. táblázat – A relatív CS diszacharid mennyiségekre lefuttatott statisztikai tesztek eredményei

CS diszacharid típusa	Statisztikai teszt során kapott p-érték
D0a0	0,12
D0a4	$2,9 \cdot 10^{-7}$
D0a6	$7,4 \cdot 10^{-4}$
D0a10	0,25

A két mintacsoport különböző szulfatáltságú CS diszacharidjainak relatív gyakoriságait boxplotokon is szemléltettem (**21. ábra**). Az ábrán jól látható, hogy a két egyszeresen szulfatált CS diszacharid boxplotjai jobban elkülönülnek, mint a nem szulfatált, illetve a kétszeresen szulfatált CS diszacharidok boxplotjai, amely korrelál a statisztikai próbákra kapott eredményekkel.

A két mintacsoport relatív CS diszacharid mennyiségei közötti eltérések szemléltetése érdekében egy PCA-t is elvégeztem, amely a Függelék **F4. ábráján** látható. Emellett a CS

diszacharidok relatív mennyiségeinek különbségeit egy hierarchikusan klaszterező hőtérképen is ábrázoltam, amelyet a Függelék **F5. ábrája** szemléltet.



21. ábra – A különböző szulfatáltságú CS diszacharidok relatív gyakoriságainak boxplotjai (***: $p < 0,001$)

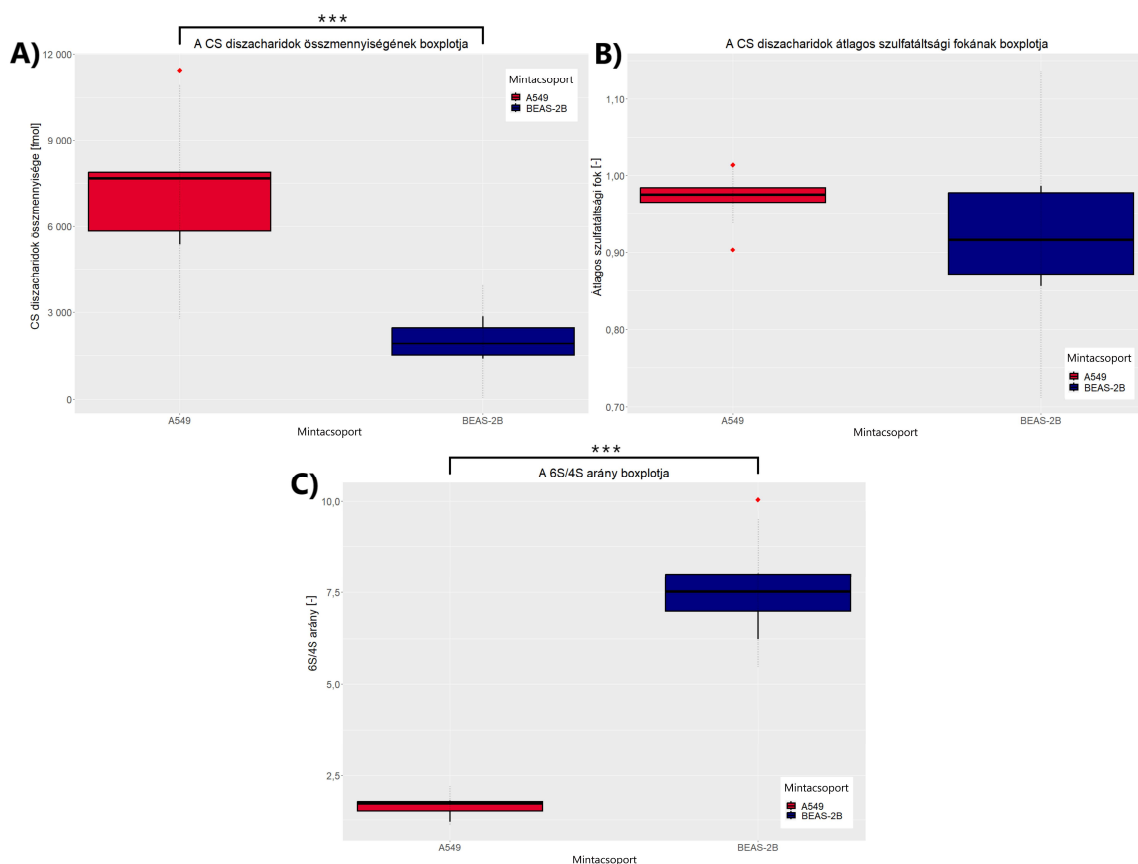
Ezután a két mintacsoport CS diszacharidjainak összmenyiségére, az átlagos szulfatációs fokokra, valamint a 6S/4S arányokra is elvégeztem a statisztikai teszteket, hogy megtudjam, vannak-e közöttük szignifikáns eltérések (**6. táblázat**).

6. táblázat – A CS diszacharidok összmenyiségére, az átlagos szulfatációs fokokra és a 6S/4S arányokra elvégzett statisztikai próbák eredményei

	Statisztikai teszt során kapott p-érték
CS diszacharidok összmenyisége	$3,4 \cdot 10^{-4}$
Átlagos szulfatációs fok	0,18
6S/4S arány	$3,4 \cdot 10^{-6}$

A CS diszacharidok összmenyisége, illetve a 6S/4S arányok esetén a p-értékek kisebbek voltak, mint 0,001, így megállapítható, hogy ezen mennyiségek tekintetében a két mintacsoport szignifikánsan eltér egymástól. Az átlagos szulfatáltsági fok a két mintacsoport között közel azonosnak adódott és statisztikailag nem tért el egymástól. A CS diszacharidok

összmenyiségét, az átlagos szulfatációs fokot és a 6S/4S arányt ábrázoló boxplotokat a **22. ábra** szemlélteti.



22. ábra – A CS diszacharidok összmenyiségének, az átlagos szulfatációs foknak, valamint a 6S/4S aránynak a boxplotjai (***: $p < 0,001$)

Ahogy azt már a **17. ábra** normalizált koncentrációinak elemzése során is bemutattam, az A549-hez tartozó CS diszacharidok összmenyisége nagyobb volt, mint a BEAS-2B-hez tartozóké. Ez összhangban áll azzal, hogy a statisztikai próbák szignifikáns eltéréseket adtak eredményül a két csoport CS diszacharidjainak összmenyiségei között.

Mint ahogy az a **18. ábra** relatív normalizált százalékos megoszlásainál látható, a D0a4 és a D0a6 relatív gyakoriságainak összege, valamint D0a10 relatív gyakorisága közel azonosak a két csoportnál, ennek következtében az átlagos szulfatáltsági fok próbájának eredményére az jött ki, hogy nincs szignifikáns különbség a két csoport között. A 6S/4S arányok esetén azért vannak már szignifikáns eltérések, mivel a D0a4 és D0a6 relatív, normalizált százalékos megoszlásai jelentősen különböznek a két csoport között (ld. **18. ábra**).

Összefoglalásként elmondható, hogy az A549 és BEAS-2B sejtvonalakból izolált sEV-k GAG profiljának elemzése során a főkomponens-analízis, valamint a hierarchikusan klaszterező hőtérképen való ábrázolás megerősítette azt, hogy a tumoros és az egészséges

minták jól elkülönülnek egymástól, vagyis a két csoport elemei közötti eltérések jelentősek. Szignifikáns különbségek voltak kimutathatók továbbá a két csoport CS diszacharidjainak összmennyiségei, az egyszeresen szulfatált CS diszacharidok relatív gyakoriságai, valamint a 6S/4S arányok között.

A fentebb ismertetett változások jelentős biológiai hatással bírhatnak. Korábban már mások is tapasztalták a CS diszacharidok összmennyiségének szignifikáns növekedését tumoros szövetmetszetekben az egészségesekhez képest [24], amely utalhat a tumor terjeszkedésére, valamint a metasztázisok kialakulásának megkezdődésére. A D0a4 és a D0a6 relatív mennyiségeinek megváltozása azt jelezheti, hogy megváltozott a szulfatált PG-k működése a szervezetben, amely szintén elősegítheti az áttétképződést. A 6S/4S arány szignifikáns csökkenése utalhat az ECM szerkezetének átalakulására, amelynek központi szerepét a rák kialakulásában már korábban, az 1.2. és 1.3. fejezetekben részleteztem. A megfigyelt változás egyik lehetséges magyarázata, hogy az EV-kben oncofetális CS-ok találhatók [115-117], amelyek jellemzően sok 4-O szulfatációt tartalmaznak. Ezek mennyisége szolid tumorokban jelentősen megnő, és közvetett módon hozzájárulhatnak a tumor progressziójához az EV-k által szállított bioaktív molekulák célsejtekhez történő transzportja révén.

Korábban már publikáltak egy olyan tanulmányt [118], amelyben tüdőrákban szenvedő betegektől, valamint egészséges egyénektől vett szövetmintákon vizsgálták a GAG-ok potenciális biomarker szerepét. Munkájuk során vizsgálták a CS diszacharidok összmennyiségeit, valamint a nem szulfatált és az egyszeresen szulfatált CS diszacharidok relatív gyakoriságai közötti eltéréseket. Eredményeik azt mutatták, hogy a tumoros mintákban a CS diszacharidok összmennyisége szignifikánsan nőtt a nem tumoros mintákhoz képest, amely összhangban van a saját eredményeimmel. Viszont esetükben a D0a6 relatív mennyisége szignifikánsan nőtt, a D0a4 relatív mennyisége pedig szignifikánsan csökkent a nem tumoros mintákhoz képest, amelyek a saját eredményeimhez képest pont fordított irányba változtak.

Pál és mtsai [119] különböző típusú tüdőrákos szövetmetszetek GAG profilját vizsgálták és hasonlították össze a nem tumoros szövetek GAG profiljaival. Az általuk végzett kísérletek kiértékelése során a tumoros mintákban a CS diszacharidok összmennyiségei, valamint a D0a4 és a D0a6 relatív gyakoriságai is szignifikánsan nőttek, a 6S/4S arányok pedig szignifikánsan csökkentek az egészséges mintákhoz képest. Eredményeik közül a D0a6-ot kivéve mindegyik összhangban van az én eredményeimmel, ugyanis esetemben tumoros mintákban a D0a6 relatív mennyisége szignifikánsan csökkent a nem tumoros mintákhoz képest.

Konklúzió

Munkám célja az A549 tüdő adenokarcinóma sejtvonalból, valamint a BEAS-2B nem tumoros sejtvonalból izolált sEV fehérjék glikozilációs poszt-transzlációs módosulásainak (*N*-glikoziláció, kondroitin-szulfát (CS) glükózaminoglikánok (GAG)) karakterizálása volt. A kétféle sejtvonal sEV-inek izolálásához 72 óra tenyésztést, valamint centrifugálási és szűrési lépéseket követően mini méretkizárásos kromatográfiát (SEC) végeztem saját készítésű oszlopokon. Az sEV-kben gazdag frakciókat betöményítettem, oldószercserét végeztem, majd egymást követő fagyasztási-olvasztási ciklusokkal tártam fel az sEV-ket. A 6-6 párhuzamosban izolált vezikulákból a feltárást követően a mintákat tripszinnel, illetve kondroitináz ABC enzimekkel emésztettem meg, ezáltal az azokat alkotó fehérjéket peptidekké, a CS GAG-okat pedig CS diszacharidokká hasítottam. A triptikus emésztményből az *N*-glikopeptideket acetonos kicsapás segítségével dúsítottam, míg a felülúszóban a nem glikozilált peptidek maradtak. Tisztítás után nanoUHPLC-MS(MS)-sel analizáltam a minták *N*-glikopeptid és CS diszacharid összetevőit.

A proteomikai vizsgálatok megerősítették a nagy tisztaságú EV-k jelenlétét, amelyek alapvető referenciaként szolgáltak a vezikulák későbbi glikomikai elemzéseire. A főkomponens-analízis és a hierarchikus klaszterezés során mind a CS diszacharidok, mind az *N*-glikoproteomikai profil alapján egyértelműen elkülönült a két mintacsoport. Az *N*-glikoproteomikai analízis során az A549-hez tartozó mintáknál 220 db *N*-glikopeptidet sikerült azonosítani 60 db glikozilált fehérjéről, a BEAS-2B-hez tartozó mintáknál pedig 244 db *N*-glikopeptidet sikerült azonosítani 62 db glikozilált fehérjéről. Az azonosított *N*-glikopeptidek többsége komplex típusú volt. Mindkét csoportban jelen voltak olyan glikozilált marker fehérjék, mint például a tromboszpudin-1, illetve a galektin-3 kötő fehérje. Kvantitatív analízist követően szignifikáns különbségek voltak kimutathatók továbbá a két csoport között a szialiláció, a fukoziláció, valamint a galaktoziláció összmértékében: a szialiláció csökkent, a fukoziláció és a galaktoziláció nőtt. Ezenkívül 233 egyedi *N*-glikopeptid mennyisége is szignifikánsan megváltozott. A GAG statisztikai elemzések során szignifikáns változások voltak kimutathatók a két mintacsoport között a CS diszacharidok összmennyiségei, az egyszeresen szulfatált CS diszacharidok relatív mennyiségei, valamint a 6S/4S arányok között. Eredményeim egyértelműen rávilágítanak a kétféle sejtvonal közötti biokémiai különbségekre, amelyek a későbbiekben kulcsfontosságúak lehetnek akár új gyógyszeres támadáspontok felfedezésében.

Irodalomjegyzék

- [1] N. Ludwig *et al.*, "Isolation and Analysis of Tumor-Derived Exosomes," (in eng), *Curr Protoc Immunol*, vol. 127, no. 1, p. e91, **2019**, doi: 10.1002/cpim.91.
- [2] R. Kalluri and K. M. McAndrews, "The role of extracellular vesicles in cancer," *cell*, vol. 186, no. 8, pp. 1610-1626, **2023**, doi: 10.1016/j.cell.2023.03.010.
- [3] X. Zhang *et al.*, "The biology and function of extracellular vesicles in cancer development," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, p. 777441, **2021**, doi: 10.3389/fcell.2021.777441.
- [4] N. Kosaka, Y. Yoshioka, Y. Fujita, and T. Ochiya, "Versatile roles of extracellular vesicles in cancer," *The Journal of clinical investigation*, vol. 126, no. 4, pp. 1163-1172, **2016**, doi: 10.1172/jci81130.
- [5] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends," *Journal of Cell Biology*, vol. 200, no. 4, pp. 373-383, **2013**, doi: 10.1083/jcb.201211138.
- [6] W. D. Travis, "Pathology of Lung Cancer," *Clinics in Chest Medicine*, vol. 32, no. 4, pp. 669-692, **2011**, doi: 10.1016/j.ccm.2011.08.005.
- [7] C. Planque, V. Kulasingam, C. R. Smith, K. Reckamp, L. Goodglick, and E. P. Diamandis, "Identification of Five Candidate Lung Cancer Biomarkers by Proteomics Analysis of Conditioned Media of Four Lung Cancer Cell Lines *," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 8, no. 12, pp. 2746-2758, **2009**, doi: 10.1074/mcp.M900134-MCP200.
- [8] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, "Global cancer statistics," (in eng), *CA Cancer J Clin*, vol. 61, no. 2, pp. 69-90, **2011**, doi: 10.3322/caac.20107.
- [9] E. Kuhn, P. Morbini, A. Cancellieri, S. Damiani, A. Cavazza, and C. E. Comin, "Adenocarcinoma classification: Pattern and prognosis," *Pathologica*, vol. 110, no. 1, pp. 5-11, **2018**. [Online]. Available: <https://air.unimi.it/bitstream/2434/784575/2/document%282%29.pdf>.
- [10] C. C. American Type, "ATCC. A549 (ATCC® CCL-185™)," in <https://www.atcc.org/products/ccl-185>, ed.
- [11] M. Lieber, G. Todaro, B. Smith, A. Szakal, and W. Nelson-Rees, "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial

- cells," *International journal of cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 62-70, **1976**, doi: 10.1002/ijc.2910170110.
- [12] C. C. American Type, "BEAS-2B at ATCC CRL-3588 TM," in <https://www.atcc.org/products/crl-3588>, ed.
- [13] R. R. Reddel *et al.*, "Immortalized human bronchial epithelial mesothelial cell lines," **1989**.
- [14] D. Thomas, A. K. Rathinavel, and P. Radhakrishnan, "Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1875, no. 1, p. 188464, **2021**, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188464.
- [15] W. Hu *et al.*, "Diagnostic Potential of Serum Glycome Analysis in Lung Cancer: A Glycopattern Study," *Journal of Proteome Research*, vol. 23, no. 1, pp. 500-509, **2024**, doi: 10.1021/acs.jproteome.3c00645.
- [16] J. Zhou, Y. Du, Z. Lai, T. Chen, and Z. Li, "Intra-Individual Variation in Disease-Specific IgG Fc Glycoform Ratios to Monitor the Disease Progression of Lung Cancer," *Journal of Proteome Research*, vol. 22, no. 1, pp. 246-258, **2023**, doi: 10.1021/acs.jproteome.2c00680.
- [17] P. Jezková, J. Skříčková, G. Wimmer, Jr., J. Zelinková, Z. Zdráhal, and E. Lattová, "Differentiation of Sialyl Linkages Using a Combination of Alkyl Esterification and Phenylhydrazine Derivatization: Application for *N*-Glycan Profiling in the Sera of Patients with Lung Cancer," *Analytical Chemistry*, vol. 94, no. 18, pp. 6736-6744, **2022**, doi: 10.1021/acs.analchem.2c00105.
- [18] M. R. S. Alvarez *et al.*, "*N*-Glycan and Glycopeptide Serum Biomarkers in Philippine Lung Cancer Patients Identified Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry," *ACS Omega*, vol. 7, no. 44, pp. 40230-40240, **2022**, doi: 10.1021/acsomega.2c05111.
- [19] C. L. Chaffer and R. A. Weinberg, "A Perspective on Cancer Cell Metastasis," *Science*, vol. 331, no. 6024, pp. 1559-1564, **2011**, doi: 10.1126/science.1203543.
- [20] S. Mereiter, M. Balmaña, D. Campos, J. Gomes, and C. A. Reis, "Glycosylation in the Era of Cancer-Targeted Therapy: Where Are We Heading?," *Cancer Cell*, vol. 36, no. 1, pp. 6-16, **2019**, doi: 10.1016/j.ccell.2019.06.006.
- [21] N. Kosaka, H. Iguchi, Y. Yoshioka, K. Hagiwara, F. Takeshita, and T. Ochiya, "Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs,"

- Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 2, pp. 1397-1405, **2012**, doi: 10.1074/jbc.M111.288662.
- [22] É. Csősz *et al.*, *Bevezetés a proteomikába*. Semmelweis Kiadó, **2023**.
- [23] G. Tóth, K. Vékey, L. Drahos, and L. Turiák, "A proteoglikánok és műszeres analitikai vizsgálatuk," in *MAGYAR KÉMİKUSOK LAPJA*, 74 ed, **2019**, pp. 342-344.
- [24] M. Balbisi *et al.*, "Inter- and intratumoral proteomics and glycosaminoglycan characterization of ALK rearranged lung adenocarcinoma tissues: a pilot study," *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, p. 6268, **2023**, doi: 10.1038/s41598-023-33435-1.
- [25] C. Reily, T. J. Stewart, M. B. Renfrow, and J. Novak, "Glycosylation in health and disease," *Nature Reviews Nephrology*, vol. 15, no. 6, pp. 346-366, **2019**, doi: 10.1038/s41581-019-0129-4.
- [26] J. F. Ernst and S. K. H. Prill, "O-Glycosylation," *Medical Mycology*, vol. 39, no. 1, pp. 67-74, **2001**, doi: 10.1080/mmy.39.1.67.74.
- [27] J. D. Esko, K. Kimata, and U. Lindahl, "Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans," *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*, **2009**.
- [28] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 97, pp. 4-27, **2016**, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [29] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 24, pp. 4195-4200, **2010**, doi: 10.1242/jcs.023820.
- [30] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, G. N. Tzanakakis, and N. K. Karamanos, "Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting," *The FEBS journal*, vol. 277, no. 19, pp. 3904-3923, **2010**, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x.
- [31] C. A. Kirkpatrick and S. B. Selleck, "Heparan sulfate proteoglycans at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 11, pp. 1829-1832, **2007**, doi: 10.1242/jcs.03432.
- [32] P. Hossler, B. C. Mulukutla, and W.-S. Hu, "Systems Analysis of N-Glycan Processing in Mammalian Cells," *PLOS ONE*, vol. 2, no. 8, p. e713, **2007**, doi: 10.1371/journal.pone.0000713.
- [33] E. Staudacher, F. Altmann, I. B. H. Wilson, and L. März, "Fucose in N-glycans: from plant to man," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1473, no. 1, pp. 216-236, **1999**, doi: 10.1016/S0304-4165(99)00181-6.
- [34] C. Zuber and J. Roth, *N-glycosylation*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2009**.

- [35] Z. Universität, "Glycosylation Nomenclature," in <https://www.physiol.uzh.ch/en/Glycosylation/Basicstructuralfeatures/Nomenclature.html>, ed, **2023**.
- [36] S. Neelamegham *et al.*, "Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans guidelines," *Glycobiology*, vol. 29, no. 9, pp. 620-624, **2019**, doi: 10.1093/glycob/cwz045.
- [37] K. Dammen-Brower *et al.*, "Strategies for glycoengineering therapeutic proteins," *Frontiers in Chemistry*, vol. 10, p. 863118, **2022**, doi: 10.3389/fchem.2022.863118.
- [38] N. Afratis *et al.*, "Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment," *The FEBS journal*, vol. 279, no. 7, pp. 1177-1197, **2012**, doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08529.x.
- [39] K. Solakyildirim, "Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 411, no. 17, pp. 3731-3741, **2019**, doi: 10.1007/s00216-019-01722-4.
- [40] D. Soares da Costa, R. L. Reis, and I. Pashkuleva, "Sulfation of glycosaminoglycans and its implications in human health and disorders," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 19, pp. 1-26, **2017**, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044610.
- [41] N. S. Gandhi and R. L. Mancera, "The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins," *Chemical Biology & Drug Design*, vol. 72, no. 6, pp. 455-482, **2008**, doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x.
- [42] R. M. Lauder, "Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems," *Complementary Therapies in Medicine*, vol. 17, no. 1, pp. 56-62, **2009**, doi: 10.1016/j.ctim.2008.08.004.
- [43] P. A. Mourão *et al.*, "Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 39, pp. 23973-23984, **1996**, doi: 10.1074/jbc.271.39.23973.
- [44] S. Yamada, H. Morimoto, T. Fujisawa, and K. Sugahara, "Glycosaminoglycans in *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa, Cnidaria): demonstration of chondroitin in the developing nematocyst, the sting organelle, and structural characterization of glycosaminoglycans," *Glycobiology*, vol. 17, no. 8, pp. 886-894, **2007**, doi: 10.1093/glycob/cwm051.
- [45] A. Malmström, B. Bartolini, M. A. Thelin, B. Pacheco, and M. Maccarana, "Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function," *Journal of*

- Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 60, no. 12, pp. 916-925, **2012**, doi: 10.1369/0022155412459857.
- [46] A. D. Theocharis, I. Tsolakis, G. N. Tzanakakis, and N. K. Karamanos, "Chondroitin Sulfate as a Key Molecule in the Development of Atherosclerosis and Cancer Progression," in *Advances in Pharmacology*, vol. 53: Academic Press, **2006**, pp. 281-295.
- [47] G. Tóth *et al.*, "Glycosaminoglycan Analysis of FFPE Tissues from Prostate Cancer and Benign Prostate Hyperplasia Patients Reveals Altered Regulatory Functions and Independent Markers for Survival," *Cancers*, vol. 14, no. 19, p. 4867, **2022**, doi: 10.3390/cancers14194867.
- [48] R. Lawrence, H. Lu, R. D. Rosenberg, J. D. Esko, and L. Zhang, "Disaccharide structure code for the easy representation of constituent oligosaccharides from glycosaminoglycans," *Nature Methods*, vol. 5, no. 4, pp. 291-292, **2008**, doi: 10.1038/nmeth0408-291.
- [49] T. N. Wight, D. K. Heinegård, and V. C. Hascall, "Proteoglycans: structure and function," *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition*, pp. 45-78, **1991**, doi: 10.1007/978-1-4615-3770-0_3.
- [50] J. Halper, "Proteoglycans and Diseases of Soft Tissues," in *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*, J. Halper Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, **2014**, pp. 49-58.
- [51] M. Didraga, B. Barroso, and R. Bischoff, "Recent developments in proteoglycan purification and analysis," *Current Pharmaceutical Analysis*, vol. 2, no. 4, pp. 323-337, **2006**, doi: 10.2174/157341206778699573.
- [52] Z. Noor, S. B. Ahn, M. S. Baker, S. Ranganathan, and A. Mohamedali, "Mass spectrometry-based protein identification in proteomics — a review," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 22, no. 2, pp. 1620-1638, **2020**, doi: 10.1093/bib/bbz163.
- [53] M. Wilm, "Principles of Electrospray Ionization," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 10, no. 7, **2011**, doi: 10.1074/mcp.M111.009407.
- [54] A. El-Faramawy, K. W. M. Siu, and B. A. Thomson, "Efficiency of nano-electrospray ionization," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 16, no. 10, pp. 1702-1707, **2005**, doi: 10.1016/j.jasms.2005.06.011.
- [55] F. Hillenkamp, T. W. Jaskolla, and M. Karas, "The MALDI Process and Method," in *MALDI MS*, 2013, pp. 1-40.

- [56] K. Dreisewerd, "The Desorption Process in MALDI," *Chemical Reviews*, vol. 103, no. 2, pp. 395-426, **2003**, doi: 10.1021/cr010375i.
- [57] S. Medhe, "Mass Spectrometry: Analysers an Important Tool," *International Journal of Chemical Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 1-8, **2018**.
- [58] F. W. McLafferty, "Tandem Mass Spectrometry," *Science*, vol. 214, no. 4518, pp. 280-287, **1981**, doi: 10.1126/science.7280693.
- [59] E. de Hoffmann, "Tandem mass spectrometry: A primer," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 31, no. 2, pp. 129-137, **1996**, doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T.
- [60] Y. Shi, R. Xiang, C. Horváth, and J. A. Wilkins, "The role of liquid chromatography in proteomics," *Journal of Chromatography A*, vol. 1053, no. 1, pp. 27-36, **2004**, doi: 10.1016/j.chroma.2004.07.044.
- [61] A. Zappe, R. L. Miller, W. B. Struwe, and K. Pagel, "State-of-the-art glycosaminoglycan characterization," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 41, no. 6, pp. 1040-1071, **2022**, doi: 10.1002/mas.21737.
- [62] A. J. McArdle and S. Menikou, "What is proteomics?," *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, vol. 106, no. 3, pp. 178-181, **2021**, doi: 10.1136/archdischild-2019-317434.
- [63] N. L. Kelleher, H. Y. Lin, G. A. Valaskovic, D. J. Aaserud, E. K. Fridriksson, and F. W. McLafferty, "Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121, no. 4, pp. 806-812, **1999**, doi: 10.1021/ja973655h.
- [64] Z. R. Gregorich, Y.-H. Chang, and Y. Ge, "Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up?," *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, vol. 466, no. 6, pp. 1199-1209, **2014**, doi: 10.1007/s00424-014-1471-9.
- [65] A. Doerr, "DIA mass spectrometry," *Nature Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 35-35, **2015**, doi: 10.1038/nmeth.3234.
- [66] L. Hu, M. Ye, X. Jiang, S. Feng, and H. Zou, "Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis—A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 598, no. 2, pp. 193-204, **2007**, doi: 10.1016/j.aca.2007.07.046.
- [67] L. Switzar, M. Giera, and W. M. A. Niessen, "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments," *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 3, pp. 1067-1077, **2013**, doi: 10.1021/pr301201x.
- [68] J. von Hagen, *Proteomics sample preparation*. John Wiley & Sons, **2008**.

- [69] Y. Liu, Q. Cao, and L. Li, "Isolation and characterization of glycosylated neuropeptides," in *Methods in Enzymology*, vol. 626, B. A. Garcia Ed.: Academic Press, **2019**, pp. 147-202.
- [70] Y. Xue *et al.*, "Study on behaviors and performances of universal N-glycopeptide enrichment methods," *Analyst*, Paper vol. 143, no. 8, pp. 1870-1880, **2018**, doi: 10.1039/C7AN02062G.
- [71] L. Turiák *et al.*, "Site-specific N-glycosylation of HeLa cell glycoproteins," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 14822, **2019**, doi: 10.1038/s41598-019-51428-x.
- [72] B. Buszewski and M. Szultka, "Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 42, no. 3, pp. 198-213, **2012**, doi: 10.1080/07373937.2011.645413.
- [73] A. Żwir-Ferenc and M. Biziuk, "Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications," *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 15, no. 5, **2006**.
- [74] N. J. Simpson, *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. CRC press, **2000**.
- [75] S. W. Haga and H.-F. Wu, "Overview of software options for processing, analysis and interpretation of mass spectrometric proteomic data," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 49, no. 10, pp. 959-969, **2014**, doi: 10.1002/jms.3414.
- [76] J. E. Elias and S. P. Gygi, "Target-Decoy Search Strategy for Mass Spectrometry-Based Proteomics," in *Proteome Bioinformatics*, S. J. Hubbard and A. R. Jones Eds. Totowa, NJ: Humana Press, **2010**, pp. 55-71.
- [77] A. Thompson *et al.*, "Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS," *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 8, pp. 1895-1904, **2003**, doi: 10.1021/ac0262560.
- [78] I. U. Antia, K. Mathew, D. R. Yagnik, F. A. Hills, and A. J. Shah, "Analysis of procainamide-derivatised heparan sulphate disaccharides in biological samples using hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 410, no. 1, pp. 131-143, **2018**, doi: 10.1007/s00216-017-0703-1.
- [79] L. Polewski *et al.*, "Ion Mobility Mass Spectrometry-Based Disaccharide Analysis of Glycosaminoglycans," *Chemistry – A European Journal*, vol. 30, no. 35, p. e202400783, **2024**, doi: 10.1002/chem.202400783.

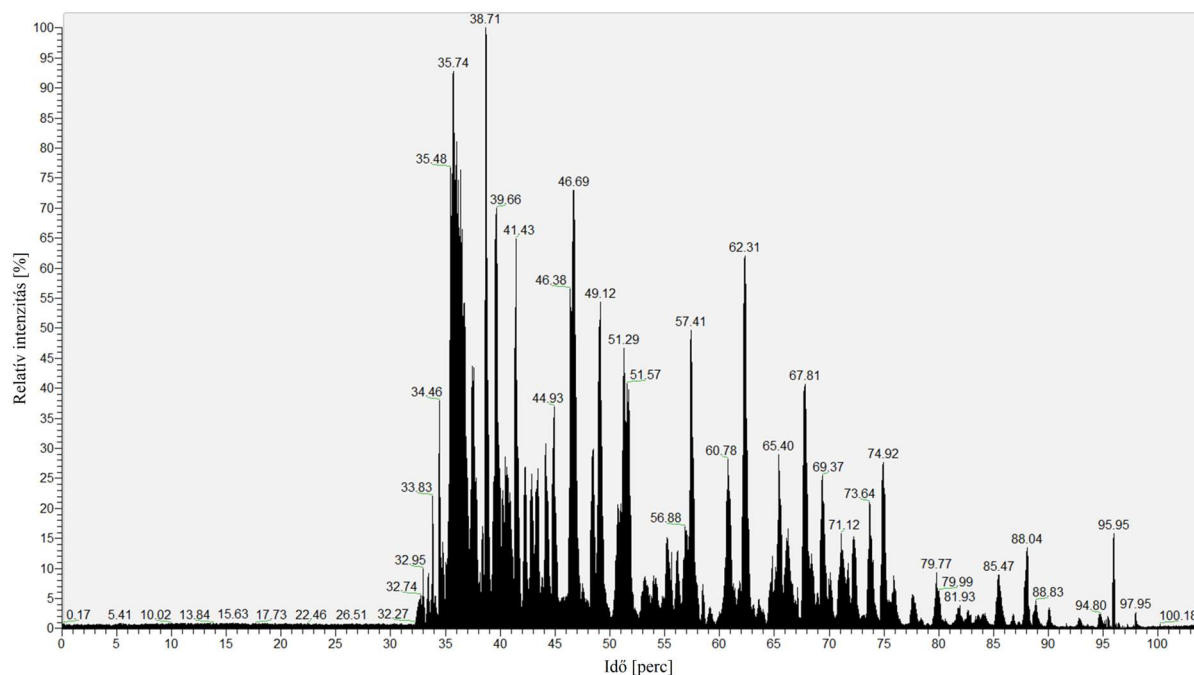
- [80] L. Li, F. Zhang, J. Zaia, and R. J. Linhardt, "Top-down approach for the direct characterization of low molecular weight heparins using LC-FT-MS," *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 20, pp. 8822-8829, **2012**, doi: 10.1021/ac302232c.
- [81] W. Mao, C. Thanawiroon, and R. J. Linhardt, "Capillary electrophoresis for the analysis of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-derived oligosaccharides," *Biomedical Chromatography*, vol. 16, no. 2, pp. 77-94, **2002**, doi: 10.1002/bmc.153.
- [82] A. Calabro, R. Midura, A. Wang, L. West, A. Plaas, and V. C. Hascall, "Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of glycosaminoglycans," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 9, pp. S16-S22, **2001**, doi: 10.1053/joca.2001.0439.
- [83] A. C. Robu, L. Popescu, D. G. Seidler, and A. D. Zamfir, "Chip-based high resolution tandem mass spectrometric determination of fibroblast growth factor—chondroitin sulfate disaccharides noncovalent interaction," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 53, no. 7, pp. 624-634, **2018**, doi: 10.1002/jms.4193.
- [84] X. Wang *et al.*, "GlycCompSoft: software for automated comparison of low molecular weight heparins using top-down LC/MS data," *PLOS ONE*, vol. 11, no. 12, p. e0167727, **2016**, doi: 10.1371/journal.pone.0167727.
- [85] L. Li, M. Ly, and R. J. Linhardt, "Proteoglycan sequence," *Molecular BioSystems*, vol. 8, no. 6, pp. 1613-1625, **2012**, doi: 10.1039/C2MB25021G.
- [86] J. Zaia, "Mass Spectrometry and Glycomics," *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, vol. 14, no. 4, pp. 401-418, **2010**, doi: 10.1089/omi.2009.0146.
- [87] J. Zaia, "On-line separations combined with MS for analysis of glycosaminoglycans," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 28, no. 2, pp. 254-272, **2009**, doi: 10.1002/mas.20200.
- [88] V. L. Gill, U. Aich, S. Rao, C. Pohl, and J. Zaia, "Disaccharide analysis of glycosaminoglycans using hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry," *Analytical chemistry*, vol. 85, no. 2, pp. 1138-1145, **2013**, doi: 10.1021/ac3030448.
- [89] R. M. Schowalter, D. V. Pastrana, and C. B. Buck, "Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry," *PLoS pathogens*, vol. 7, no. 7, p. e1002161, **2011**, doi: 10.1371/journal.ppat.1002161.
- [90] G. Tóth, K. Vékey, S. Sugár, I. Kovalszky, L. Drahos, and L. Turiák, "Salt gradient chromatographic separation of chondroitin sulfate disaccharides," *Journal of Chromatography A*, vol. 1619, p. 460979, **2020**, doi: 10.1016/j.chroma.2020.460979.
- [91] Y. Seo, M. J. Oh, J. Y. Park, J. K. Ko, J. Y. Kim, and H. J. An, "Comprehensive Characterization of Biotherapeutics by Selective Capturing of Highly Acidic Glycans

- Using Stepwise PGC-SPE and LC/MS/MS," *Analytical Chemistry*, vol. 91, no. 9, pp. 6064-6071, **2019**, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00603.
- [92] M. A. Lauber *et al.*, "Rapid Preparation of Released *N*-Glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent that Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection," *Analytical Chemistry*, vol. 87, no. 10, pp. 5401-5409, **2015**, doi: 10.1021/acs.analchem.5b00758.
- [93] S. Klapoetke, J. Zhang, S. Becht, X. Gu, and X. Ding, "The evaluation of a novel approach for the profiling and identification of *N*-linked glycan with a procainamide tag by HPLC with fluorescent and mass spectrometric detection," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 53, no. 3, pp. 315-324, **2010**, doi: 10.1016/j.jpba.2010.03.045.
- [94] L. Cao *et al.*, "Sample preparation for mass spectrometric analysis of human serum *N*-glycans using hydrophilic interaction chromatography-based solid phase extraction," *Analyst*, vol. 139, no. 18, pp. 4538-4546, **2014**, doi: 10.1039/C4AN00660G.
- [95] L. Cao, L. Yu, Z. Guo, A. Shen, Y. Guo, and X. Liang, "*N*-Glycosylation Site Analysis of Proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Based Enrichment, Parallel Deglycosylation, and Mass Spectrometry," *Journal of Proteome Research*, vol. 13, no. 3, pp. 1485-1493, **2014**, doi: 10.1021/pr401049e.
- [96] M. H. J. Selman, M. Hemayatkar, A. M. Deelder, and M. Wührer, "Cotton HILIC SPE Microtips for Microscale Purification and Enrichment of Glycans and Glycopeptides," *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 7, pp. 2492-2499, **2011**, doi: 10.1021/ac1027116.
- [97] L. R. Ruhaak *et al.*, "HILIC-based high-throughput sample preparation method for *N*-glycan analysis from total human plasma glycoproteins," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 15, pp. 6119-6126, **2008**.
- [98] I. J. Ji *et al.*, "Spatially-Resolved Exploration of the Mouse Brain Glycome by Tissue Glyco-Capture (TGC) and Nano-LC/MS," *Analytical Chemistry*, vol. 87, no. 5, pp. 2869-2877, **2015**, doi: 10.1021/ac504339t.
- [99] A. Törnkvist, "Aspects of Porous Graphitic Carbon as Packing Material in Capillary Liquid Chromatography," Doctoral thesis, comprehensive summary, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, 805, **2003**. [Online]. Available: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-3306>

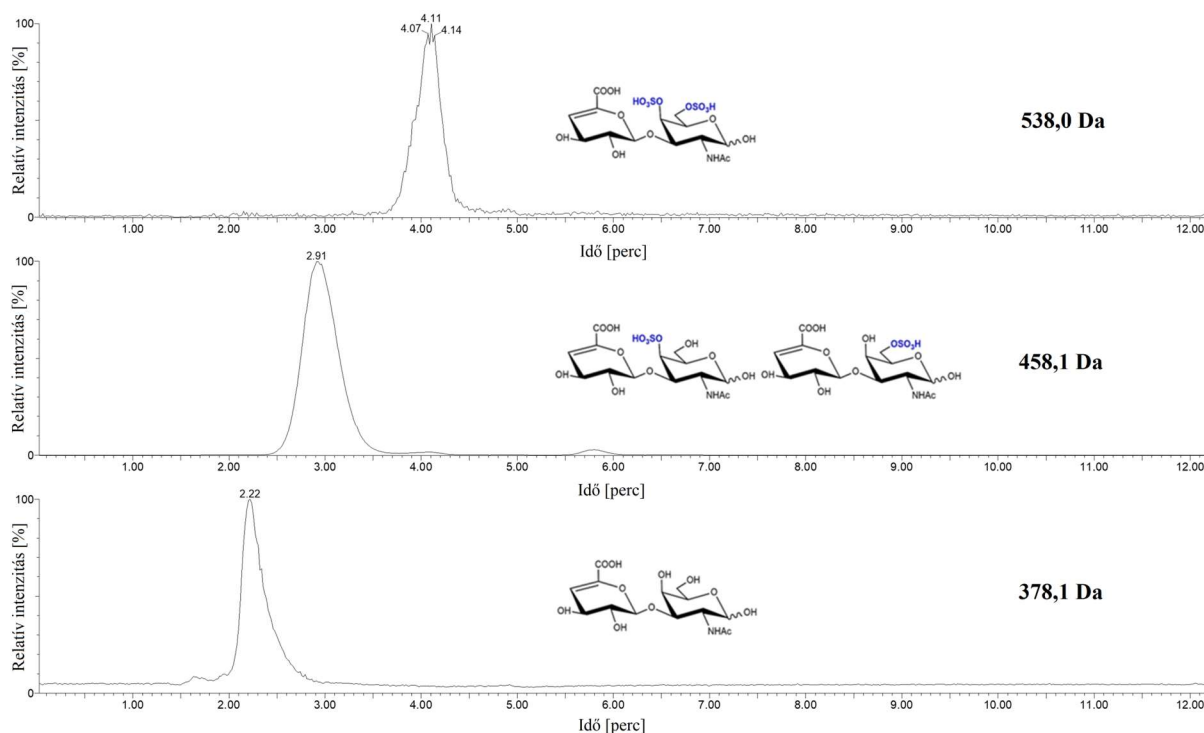
- [100] M.-C. Hennion, V. Coquart, S. Guenu, and C. Sella, "Retention behaviour of polar compounds using porous graphitic carbon with water-rich mobile phases," *Journal of Chromatography A*, vol. 712, no. 2, pp. 287-301, **1995**, doi: 10.1016/0021-9673(95)00562-2.
- [101] B. J. Bassler, R. Kaliszan, and R. A. Hartwick, "Retention mechanisms on metallic stationary phases," *Journal of Chromatography A*, vol. 461, pp. 139-147, **1989**, doi: 10.1016/S0021-9673(00)94283-3.
- [102] Z. Varga, M. Madai, G. Kemenesi, T. Beke-Somfai, and F. Jakab, "Single-particle detection of native SARS-CoV-2 virions by microfluidic resistive pulse sensing," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 218, p. 112716, **2022**, doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112716.
- [103] J.-L. Fraikin, T. Teesalu, C. M. McKenney, E. Ruoslahti, and A. N. Cleland, "A high-throughput label-free nanoparticle analyser," *Nature Nanotechnology*, vol. 6, no. 5, pp. 308-313, **2011**, doi: 10.1038/nnano.2011.24.
- [104] G. P. Tuszyński and R. F. Nicosia, "The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis," *BioEssays*, vol. 18, no. 1, pp. 71-76, **1996**, doi: 10.1002/bies.950180113.
- [105] E. Capone, S. Iacobelli, and G. Sala, "Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target," *Journal of Translational Medicine*, vol. 19, no. 1, p. 405, **2021**, doi: 10.1186/s12967-021-03085-w.
- [106] T. N. Wight, I. Kang, and M. J. Merrilees, "Versican and the control of inflammation," *Matrix Biology*, vol. 35, pp. 152-161, **2014**, doi: 10.1016/j.matbio.2014.01.015.
- [107] M. V. Nastase, M. F. Young, and L. Schaefer, "Biglycan: A Multivalent Proteoglycan Providing Structure and Signals," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 60, no. 12, pp. 963-975, **2012**, doi: 10.1369/0022155412456380.
- [108] S. S. Pinho and C. A. Reis, "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications," *Nature Reviews Cancer*, vol. 15, no. 9, pp. 540-555, **2015**, doi: 10.1038/nrc3982.
- [109] S. L. Bellis, C. A. Reis, A. Varki, R. Kannagi, and P. Stanley, "Glycosylation Changes in Cancer," 4th ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2022**.
- [110] Q. Zhang *et al.*, "Transfer of Functional Cargo in Exomeres," *Cell Reports*, vol. 27, no. 3, pp. 940-954.e6, **2019**, doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.009.

- [111] K. Muramoto, R. Tange, T. Ishii, K. Miyauchi, and T. Sato, "Downregulation of Transcription Factor Sp1 Suppresses Malignant Properties of A549 Human Lung Cancer Cell Line with Decreased β 4-Galactosylation of Highly Branched *N*-Glycans," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 40, no. 8, pp. 1282-1288, **2017**, doi: 10.1248/bpb.b17-00212.
- [112] B. A. Cobb, "The history of IgG glycosylation and where we are now," *Glycobiology*, vol. 30, no. 4, pp. 202-213, **2019**, doi: 10.1093/glycob/cwz065.
- [113] T. Vermassen *et al.*, "Release of urinary extracellular vesicles in prostate cancer is associated with altered urinary N-glycosylation profile," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 70, no. 10, p. 838, **2017**, doi: 10.1136/jclinpath-2016-204312.
- [114] M. K. Islam *et al.*, "Integrins are enriched on aberrantly fucosylated tumour-derived urinary extracellular vesicles," *Journal of Extracellular Biology*, vol. 1, no. 10, p. e64, **2022**, doi: 10.1002/jex2.64.
- [115] N. Khazamipour *et al.*, "Oncofetal Chondroitin Sulfate: A Putative Therapeutic Target in Adult and Pediatric Solid Tumors," *Cells*, vol. 9, no. 4, p. 818, **2020**, doi: 10.3390/cells9040818.
- [116] H. Z. Oo *et al.*, "Oncofetal Chondroitin Sulfate Is a Highly Expressed Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer," *Cancers*, vol. 13, no. 17, p. 4489, **2021**, doi: 10.3390/cancers13174489.
- [117] E. E. Vidal-Calvo *et al.*, "Tumor-agnostic cancer therapy using antibodies targeting oncofetal chondroitin sulfate," *Nature Communications*, vol. 15, no. 1, p. 7553, **2024**, doi: 10.1038/s41467-024-51781-0.
- [118] G. Li *et al.*, "Glycosaminoglycans and glycolipids as potential biomarkers in lung cancer," *Glycoconjugate Journal*, vol. 34, no. 5, pp. 661-669, **2017**, doi: 10.1007/s10719-017-9790-7.
- [119] D. Pál *et al.*, "Compositional Analysis of Glycosaminoglycans in Different Lung Cancer Types—A Pilot Study," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 8, p. 7050, **2023**, doi: 10.3390/ijms24087050.

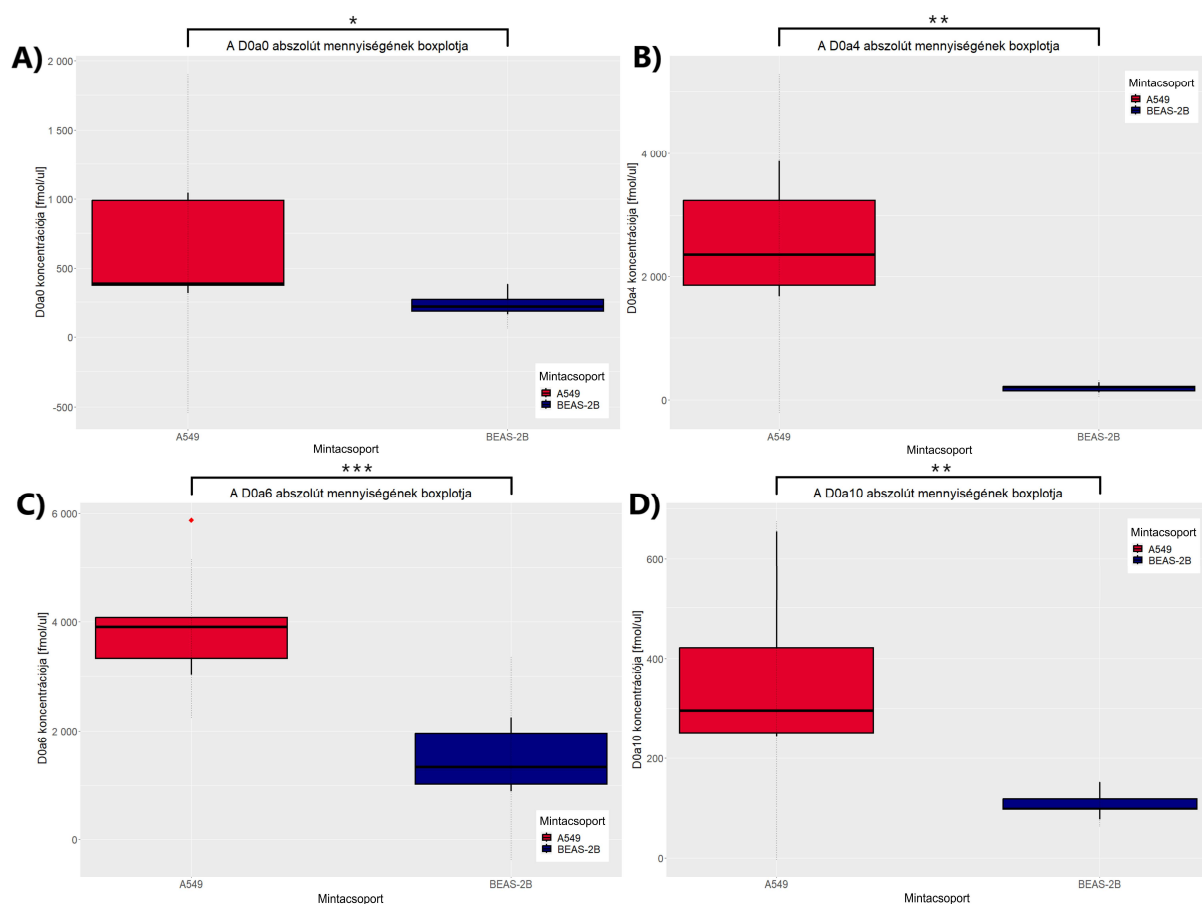
Függelék



F1. ábra – Egy N-glikopeptid minta kromatogramja

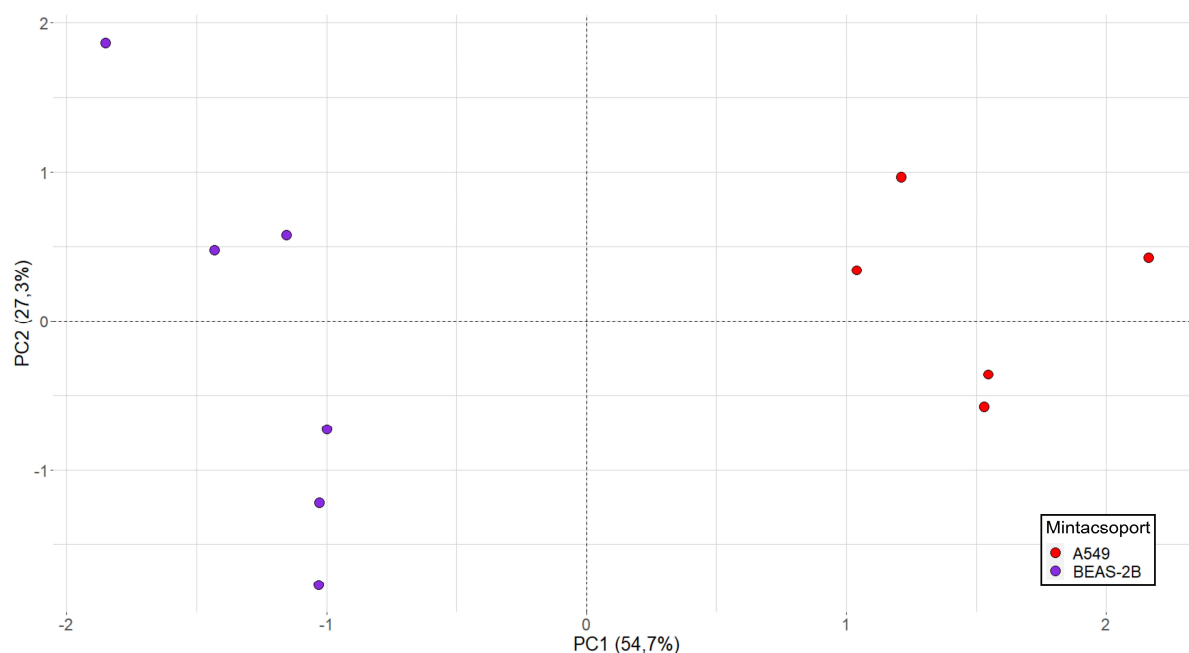


F2. ábra – Egy minta CS diszacharidjainak kromatogramjai

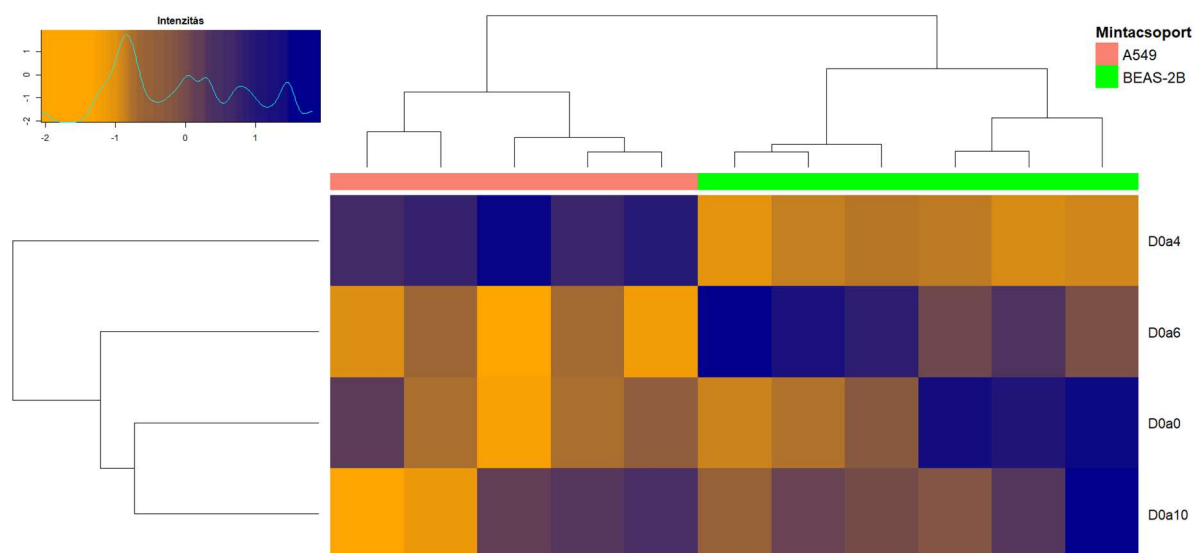


F3. ábra – A különböző szulfatáltságú CS diszacharidok abszolút mennyiségeinek boxplotjai

(*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)



F4. ábra – A relatív CS diszacharid mennyiségekre lefuttatott PCA eredménye



F5. ábra – A relatív CS diszacharid mennyiségekre vonatkozó hierarchikusan klaszterező hő térkép