



**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR**

**Vatta és grafitalapú szilárd fázisú
extrakciós rendszerek fejlesztése és
alkalmazása prosztata- és emlőtumoros
szövetek glükózaminoglikán tartalmának
vizsgálatára**

OTDK dolgozat

Szerző:

Fügedi Kata Dorina
MSc vegyészmérnök hallgató

Témavezetők:

Dr. Tóth Gábor
tudományos munkatárs
Dr. Turiák Lilla
tudományos főmunkatárs

Belső témavezető:

Dr. Horváth Viola
egyetemi docens

2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	- 6 -
2. Irodalmi áttekintés	- 8 -
2.1. Az extracelluláris mátrix.....	- 8 -
2.2. Proteoglikánok és glükózaminoglikánok szerkezete, funkciói	- 8 -
2.3. Glükózaminoglikánok műszeres analitikai vizsgálati módszerei	- 13 -
2.3.1. Glükózaminoglikánok vizsgálata tömegspektrometria alapú módszerekkel: “bottom-up” és “top-down” megközelítés	- 13 -
2.3.2. Kromatográfiás módszerek GAG-ok vizsgálatára.....	- 15 -
2.3.3. Mintatisztítási lehetőségek GAG diszacharidok vizsgálatához.....	- 17 -
2.4. Emlőrákos és prosztatatarákos megbetegedések	- 18 -
2.5. Glükózaminoglikánok szerepe és változása prosztatatarákban és emlőrákban. -	21 -
3. Kísérleti anyagok és módszerek	- 23 -
3.1. Felhasznált anyagok listája.....	- 23 -
3.2. Kapilláris nanoHPLC kolonnák készítése.....	- 24 -
3.3. Szilárd fázisú extrakciós módszerek és fejlesztésük	- 24 -
3.3.1. Módszerfejlesztés HS diszacharidok tisztítására.....	- 24 -
3.3.1.1. Vatta-HILIC módszer fejlesztése HS diszacharidok tisztítására	- 24 -
3.3.1.2. Különböző gyártójú grafitalapú állófázisok tesztelése és összehasonlítása HS diszacharidok tisztítására.....	- 28 -
3.3.1.3. HS diszacharidok tisztítására fejlesztett kombinált protokoll	- 29 -
3.3.2. Módszerfejlesztés CS diszacharidok tisztítására	- 30 -
3.3.2.1. Vatta-HILIC módszer fejlesztése CS diszacharidok tisztítására	- 30 -
3.3.2.2. Különböző gyártójú grafitalapú állófázisok tesztelése és összehasonlítása CS diszacharidok tisztítására.....	- 32 -
3.3.2.3. CS diszacharidok tisztítására fejlesztett kombinált protokoll.....	- 32 -
3.3.3. HS tisztítási módszer biológiai alkalmazhatóságának vizsgálata – HSBK, HSPIM -	33 -
3.3.4. CS tisztítási módszer biológiai alkalmazhatóságának vizsgálata – PCa	- 33 -
3.3.5. Kromatográfiás paraméterek	- 33 -
3.3.6. Tömegspektrometriás paraméterek	- 34 -
3.4. prosztatata- és emlőtumoros elváltozások vizsgálata	- 34 -
3.4.1. Minták kiválasztása	- 34 -
3.4.2. Szöveti minták vizsgálati munkafolyamata.....	- 36 -
3.4.3. Szövetmetszetek előkészítése az emésztési lépéshez	- 36 -
3.4.4. Heparán-szulfát láncok szövetfelületi emésztése	- 37 -
3.4.5. Kondroitin-szulfát láncok szövetfelületi emésztése	- 37 -

3.4.6. A minták szilárd fázisú extrakciós tisztítása	37 -
3.4.7. Kromatográfiás paraméterek	38 -
3.4.8. Tömegspektrometriás paraméterek	38 -
3.4.9. Proteoglikán vázfehérjék mennyiségének „shotgun” proteomikai elemzése ...	38 -
3.5. Mérési adatok értékelése.....	39 -
4. Eredmények és értékelésük	41 -
4.1. Szilárd fázisú extrakciós tisztítási módszer fejlesztése heparán-szulfát diszacharidokra	41 -
4.1.1. Vatta-HILIC módszerfejlesztés	41 -
4.1.1.1. Töltési folyamat és alkalmazhatósági teszt	41 -
4.1.1.2. Az állófázis anyagának és mennyiségének kiválasztása	42 -
4.1.1.3. Oldószertérfogatok optimalálása	44 -
4.1.1.4. Felviteli oldószer összetételének optimalálása	45 -
4.1.1.5. Hűtés és melegítés hatása a felvitel és elúció során, többlépéses elúció vizsgálata	46 -
4.1.1.6. Elúciós oldószerösszetétel vizsgálata	48 -
4.1.1.7. Összefoglalás.....	49 -
4.1.2. Grafit alapú módszerek fejlesztése	49 -
4.1.3. Kétlépéses kombinált módszer fejlesztése vatta-HILIC és grafit alapú állófázisok alkalmazásával.....	51 -
4.1.3.1. Kombinált módszer tesztelése: standard HS diszacharid keverék vizsgálata.....	51 -
4.1.3.2. Kombinált módszer tesztelése biológiai mintákon – HSBK, HSPIM	53 -
4.1.3.3. Összefoglalás.....	53 -
4.2. Szilárd fázisú extrakciós tisztítási módszer fejlesztése kondroitin-szulfát diszacharidokra	55 -
4.2.1. Vatta-HILIC módszerfejlesztés	55 -
4.2.1.1. Elúciós oldatösszetétel optimalálása	55 -
4.2.1.2. Felviteli lépés optimalálása	56 -
4.2.1.3. Összefoglalás.....	57 -
4.2.2. Grafit alapú módszerek fejlesztése	58 -
4.2.3. Kétlépéses kombinált módszer fejlesztése vatta-HILIC és grafit alapú állófázisok alkalmazásával.....	59 -
4.2.3.1. Kombinált módszer tesztelése: standard CS diszacharid keverék vizsgálata	59 -
4.2.3.2. Kombinált módszer tesztelése biológiai mintákon – PCa	59 -
4.2.3.3. Összefoglalás.....	60 -
4.3. Prosztata- és emlőtumoros szövetek GAG tartalmának összevetése	62 -
4.3.1. Heparán-szulfát és kondroitin-szulfát láncok összmennyisége	62 -
4.3.2. Heparán-szulfát láncok szulfatációja.....	64 -
4.3.3. Kondroitin-szulfát láncok szulfatációs mintázata	68 -

4.3.4. Eredmények összevetése, proteoglikán vázfehérjék mennyisége	- 71 -
5. Összefoglalás	- 74 -
6. Irodalomjegyzék	- 76 -
7. Függelék.....	- 82 -
7.1. Rövidítések, jelölések jegyzéke	- 82 -
7.2. A Lawrence kód értelmezése	- 84 -
7.3. prosztatatarakos és emlőrákos betegségek vizsgálatánál felhasznált szövetminták betegadatai	- 84 -
7.4. Prostata és emlő vizsgált szövetek páronkénti összehasonlítása során elvégzett statisztikai tesztek és próbákhoz tartozó p-értékek	- 87 -
7.5. HS és CS vatta-HILIC módszerfejlesztés	- 89 -
7.6. Proteomikai vizsgálatok.....	- 91 -
7.6.1. Fehérjék szövetfelületi emésztése és tisztítása	- 91 -
7.6.2. Fordított fázisú nanoUHPLC-MS/MS mérések	- 91 -
7.6.3. Proteomikai mérési eredmények adatértékelése.....	- 92 -

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani mindenekelőtt témavezetőimnek, Dr. Tóth Gábornak és Dr. Turiák Lillának, akik segítsége és iránymutatása nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka. Nagyra értékelem a rengeteg segítséget és támogatást, amit a gyakorlati munka és a dolgozat elkészítése során tőlük kaptam. Köszönöm Dr. Horváth Violának, hogy belső témavezetőként támogatta munkámat. Köszönöm Dr. Drahos Lászlónak a dolgozat átnézését, Sugár Simonnak pedig a dolgozat átnézését és a statisztikai eredmények kiértékelésében nyújtott segítségét. Köszönöm továbbá Bugyi Fanninak és Pál Domonkosnak a rengeteg támogatást. Hálás vagyok az MS Proteomika Kutatócsoport összes tagjának szakmai segítségükért és támogatásukért egyaránt. Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak és mindenkinek, aki hozzájárult ennek a munkának a létrejöttéhez, hogy végig támogattak.

A munka az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának ÚNKP-22-2-I-BME-135 pályázatának, a Bolyai János Kutatási Ösztöndíjnak, az OTKA PD 121187 és OTKA FK 131603 pályázatok támogatásával készült.

1. Bevezetés és célkitűzések

A tumoros elváltozások napjaink egyik legelterjedtebb betegségei közé tartoznak. Előfordulás tekintetében a prosztaták és az emlőrák egyaránt vezetőnek számít. Bár a kétféle betegség eltérő szervi eredetű és gyakoriságuk nemtől függő, a mögöttes biokémiai folyamatokban számos hasonlóság figyelhető meg. Ugyan rendelkezésre állnak különböző terápiás lehetőségek ezen betegségek kezelésére, az elváltozások biokémiai hátterének részletesebb megértése továbbra is kiemelt jelentőséggel bír a hatékonyabb diagnosztikus és terápiás lehetőségek felfedezéséhez.

A proteomika az élő szervezetek fehérjekészletével foglalkozó tudományág. A fehérjék számos fontos biológiai feladatot látnak el a szervezetünkben, amelyet a hozzájuk kötődő kémiai csoportok, a poszt-transzlációs módosulások (PTM-ek) nagymértékben befolyásolnak. A leggyakrabban vizsgált PTM a glikoziláció, mely során a fehérjéhez különböző méretű és szerkezetű szénhidrát molekulák kapcsolódnak. A daganatos megbetegedések során a szövetek proteomikai és glikomikai összetétele jelentősen megváltozik, amelyben központi szereppel bír az extracelluláris mátrix (sejtek közötti tér, ECM) átrendeződése.

Az ECM-ben lejátszódó folyamatok egy jelentős részét proteoglikánok (PG-k) irányítják, amelyek kitüntetett vázfehérjékhez kapcsolódó glükózaminoglikán (GAG) láncokból álló makromolekulák. A GAG-ok ismétlődő diszacharid egységekből felépülő, lineáris poliszacharid láncok, melyekhez különböző pozíciókban szulfátcsoportok kapcsolódhatnak. A GAG-okat a felépítő diszacharid egységek alapján négy osztályba sorolhatjuk, melyek közül a munkám során a kondroitin-szulfát (CS) és heparán-szulfát (HS) GAG osztályok vizsgálatával foglalkoztam. Az ezeket felépítő diszacharid egységek meghatározott pozíciókban szulfatálódhatnak (diszacharidonként akár 3 szulfátcsoport kapcsolódása is lehetséges), így erősen poláris makromolekulákat létrehozva, melyek intakt formában történő vizsgálata különösen nehéz feladat. Ebből adódóan a CS és HS láncok vizsgálatának elterjedt módszere azok enzimatisz emésztéssel diszacharid ismétlődő egységekre való bontása, majd a keletkező diszacharidok folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (HPLC-MS) vizsgálata. A mérési eredmények statisztikai feldolgozása során következtethetünk a GAG láncok szintjén lejátszódó átlagos változásokra, amelyek alapján következtethetünk a szövetekben lezajló biológiai folyamatokra.

A műszeres mérést megelőzően azonban szükség van a diszacharidokat kis mennyiségben tartalmazó emésztett minták tisztítására, eltávolítva ezzel a zavaró biológiai mátrixot valamint az emésztési maradványokat. Erre a lépésre az irodalomban kevesebb hangsúlyt fektetnek, hiszen a legtöbb ilyen tisztítási módszer bonyolult és drága, pedig alkalmazásuk jelentősen befolyásolja a mérési eredményeket. Egy új szilárd fázisú extrakciós (SPE) módszer

kialakítására alkalmasak lehetnek a grafitalapú és a hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC) típusú állófázisok. A HILIC és a grafitalapú módszereket is egyre elterjedtebben alkalmazzák GAG-ok kromatográfiás elválasztásához, így SPE állófázisokként is ígéretesek lehetnek. Ezen kívül a kétféle módszert elterjedten használják a tulajdonságaiban hasonló *N*-glikánok tisztítására és dúsítására is.

Kutatómunkám során célul tűztem ki kis mennyiségű biológiai mintákból kinyert HS és CS diszacharidok tisztítására alkalmas SPE módszerek fejlesztését, mindezt olcsó és környezetbarát módon megvalósítva. Ezután célom volt prosztatata- és emlődaganatos minták szöveti GAG tartalmának vizsgálata a kóros biokémiai mechanizmusokat leíró eltérések és hasonlóságok széleskörű feltérképezése érdekében.

2. Irodalmi áttekintés

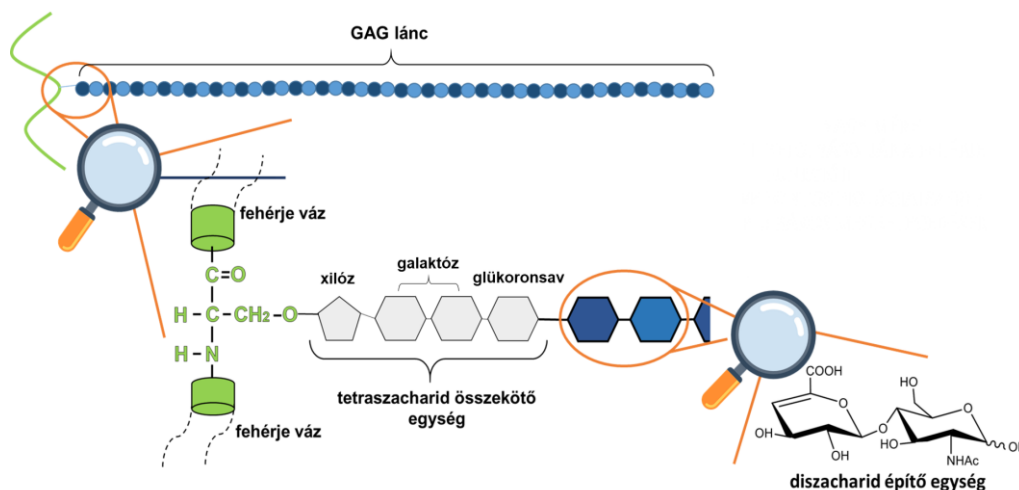
2.1. Az extracelluláris mátrix

Az extracelluláris mátrix (ECM) a szövetek és szervek közötti teret kitöltő nem sejtes alkotóelem, mely nem csupán alapvető fizikai stabilitást biztosít, hanem számos fontos biokémiai jelátviteli folyamat résztvevője is. Ezen folyamatok irányítják többek között a sejtnövekedést, morfogenezist, differenciálódást és homeosztázist [1–3]. Bár az ECM alapvetően vízből, fehérjékből és proteoglikánokból (PG-k) áll, minden szövetnek egyedi összetételű ECM-je van, amely a szövetfejlődés során alakul ki a különböző szövetek közötti dinamikus biokémiai és biofizikai kölcsönhatások révén. Az sejtek közötti kommunikáció miatt az ECM szerkezete, összetétele folyamatos átalakuláson megy keresztül, enzimatis és nem-enzimatis módosítások révén [1,4]. Az esetlegesen kialakuló rendellenességek azonban elősegíthetik a tumoros elváltozások kialakulását [4].

2.2. Proteoglikánok és glükózaminoglikánok szerkezete, funkciói

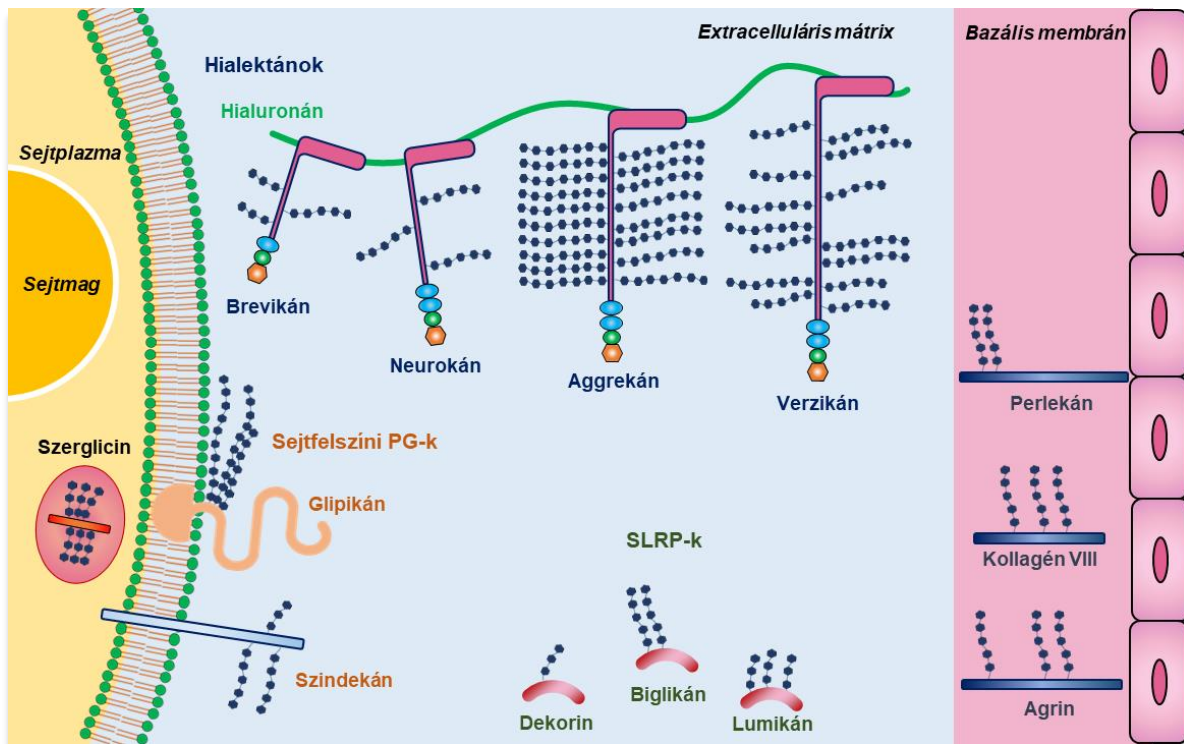
A fehérjék egyik leggyakrabban vizsgált poszt-transzlációs módosulása a glikoziláció, mely jelentősen befolyásolhatja a fehérjék biológiai funkcióit, a kapcsolódó poliszacharid típusa, mérete és kémiai tulajdonságai által. Az extracelluláris mátrixot alkotó főbb fehérjék a kollagén, elasztin, fibronectin és laminin [2]. A glikoziláció faj- és sejtspecifikus, amelyet a fehérjeváz szerkezete és a szénhidrát-kötőhely is meghatároz, ami azt jelenti, hogy bármely fehérje glikozilációja attól a sejtől vagy szövetből függ, amelyben termelődik [5–7].

A **proteoglikánok** (PG-k) a glikoproteinek egy alosztálya, melyek egy fehérje vázból és a hozzá egy tetraszacharid kötőegységen keresztül kovalensen kapcsolódó glükózaminoglikán (GAG) láncokból állnak (1. ábra) [8]. A PG-k osztályozása az elhelyezkedésük, a felépítő vázfehérjék szerkezete és a kapcsolódó GAG láncok alapján történik [9].



1. ábra A proteoglikánok általános szerkezeti felépítése.

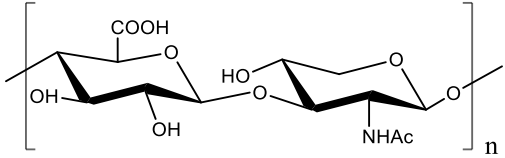
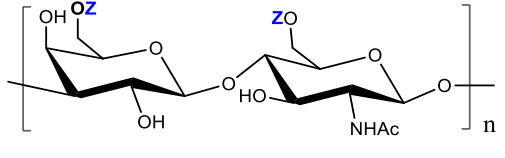
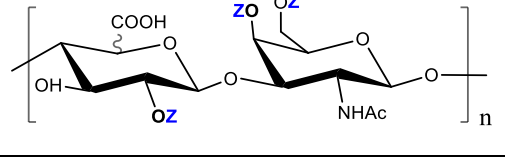
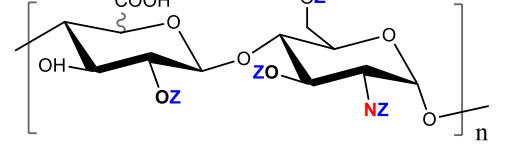
Lokalizációjuk alapján megkülönböztetünk intracelluláris (*szerglyicin*), sejt felszíni (*szindekán és glipikán családok*), extracelluláris (*pl. dekorin, verzikán*), és bazális membrán (*pl. perlekán*) proteoglikánokat (2. ábra) [10]. A proteoglikánok szabályozzák az extracelluláris mátrix jelátviteli folyamatait, például a morfogének és kemokinek eloszlását, és befolyásolják a sejt felszínen a jelátviteli folyamatokat, amik befolyásolják a sejtek életciklusát, proliferációját, adhézióját [9,11].



2. ábra A leggyakrabban vizsgált proteoglikánok csoportosítása és elhelyezkedése [10].

A fehérje vázhoz kötődő GAG láncok ismétlődő diszacharid egységekből felépülő lineáris poliszacharid láncok, mely egységek egy hexuronsavból vagy galaktózból és egy *N*-acetilhexózáminból állnak (HexA/Gal-HexNAc) (1. ábra) [12,13]. A diszacharid ismétlődő egységek alapján négy fő osztályba sorolhatók: keratán-szulfát, kondroitin/dermatán-szulfát és heparin/heparán-szulfát, hialuronsav (1. táblázat). Míg az első három osztály tartalmazhat szulfatációt, addig a hialuronsav csak nem-szulfatált formában fordul elő [8,14–16], továbbá nem kapcsolódik vázfehérjéhez. Ezek a molekulák rendkívül hidrofílek, és lineáris szerkezetüknek köszönhetően segítik a hidrogéles szerkezetek kialakítását, ami lehetővé teszi hogy mechanikai védelmet biztosítsanak nyomóerők ellen [1].

1. táblázat A GAG osztályok általános szerkezeti képlete és tradicionális rövidítése. Az ábrán késsel szedett Z jelölés a szulfatálás lehetséges helyét jelöli. Heparán-szulfát esetén a megjelenő N-szulfatálás (pirossal szedve) helyett lehetséges a többi osztályban megtalálható N-acetilálás is.

Szerkezeti képlet	Tradicionális rövidítés	Osztály elnevezése
	GlcA - GlcNAc	Hialuronsav (HA)
	Gal - GlcNAc	Keratán-szulfát (KS)
	GlcA/IdoA - GalNAc	Kondroitin-szulfát/dermatán-szulfát (CS/DS)
	GlcA/IdoA - GlcNAc	Heparán-szulfát/Heparin (HS/Hep)

A **heparán-szulfát (HS)** kiemelkedő szerkezeti sokszínűséggel rendelkezik és biológiai szempontból a legtöbb információt hordozó GAG osztálynak tartják [17]. A HS osztály építő diszacharid egységei egy *N*-acetil-glükózamin (GlcNAc) és glükuronsav (GlcA) vagy iduronsav egységből állnak [8]. A heparán-szulfát proteoglikánok (HSPG-k) egy vagy több HS láncot hordoznak, és három különálló osztályba sorolhatók: a *szindekánok*, amelyek egyetlen transzmembrán doménnel rendelkeznek, a *glipikánok*, amelyek a külső plazmamembránhoz kapcsolódnak, és a szekretált proteoglikánok sokféle csoportja, beleértve a *perlekánt*, *agrint* és a *kollagént*. A láncindítást követően a HS láncokat glikozil-transzferázok szintetizálják a Golgi készülékben. A láncok kezdetben csak *N*-acetil-glükózamint és glükuronsavat tartalmaznak, de a lánc szintézisének befejeztével további módosulások mennek végbe. Az *N*-deacetiláz/*N*-szulfotranszferáz enzim egyes régiókban a GlcNAc (*N*-acetil-glükózamin) egységeken az *N*-acetil-csoportokat *N*-szulfátokká alakítja. Az így kialakult *N*-szulfatált régiókban a C5-epimeráz enzim a közeli glükuronsavat módosítja iduronsavvá és a specifikus szulfotranszferázok további *O*-szulfatációt idézhetnek elő [11,12,18]. A leggyakoribb építőegységek így nem-szulfatált, egyszeresen, kétszeresen, valamint akár háromszorosan szulfatált diszacharidok. Ez a sokféle szerkezet lehetővé teszi a

HSPG-k számára, hogy a fehérjék széles skálájához kötődjenek [11]. Továbbá, szulfatációs motívumaik kulcsfontosságúak a HS láncok növekedési faktorokkal, citokinekkal és fehérjékkel való kölcsönhatásában, ezért szulfatációs mintázatuk információt adhat biológiai szerepükről [8].

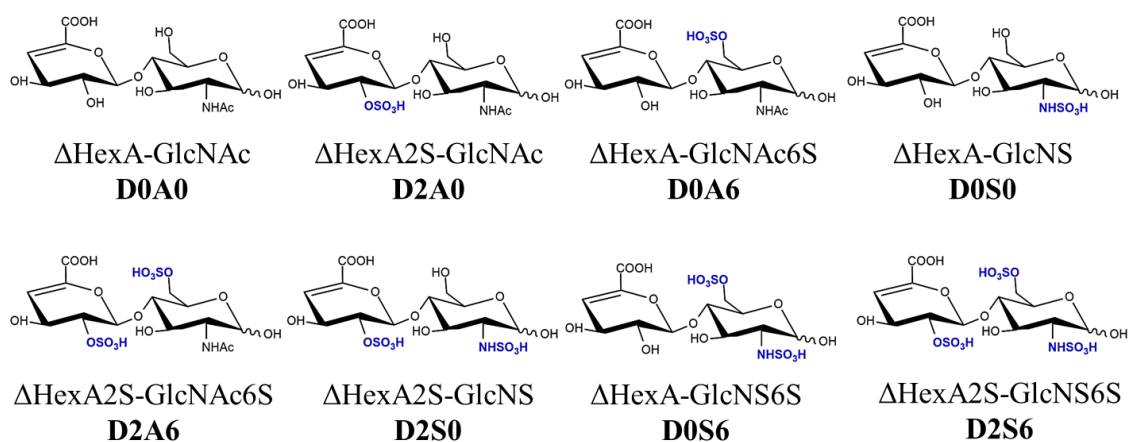
A **kondroitin-szulfát (CS)** az emberi szervezetben legnagyobb mennyiségben jelen lévő GAG, szintjének megemelkedését számos rákos megbetegedésnél mutatták ki korábban [19–21]. A CS láncok ismétlődő diszacharid egységei egy glükuronsavból (GlcA) és egy *N*-acetilgalaktózaminból (GalNAc) állnak [22]. A CS láncok a sejtfelszíneken és az extra/pericelluláris mátrixokban proteoglikánok formájában fordulnak elő leginkább. A kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG-k) nemcsak különféle normál fiziológiás folyamatokban (pl. citokinézis, morfogenezis) vesznek részt, hanem kóros folyamatokban is, beleértve a csontrendszeri rendellenességeket, valamint a vírusok és baktériumok által okozott fertőzéseket. A CS láncok szintézise endoplazmatikus retikulum/Golgi apparátusában történik, és a HS-hez hasonlóan a GAG–protein kötőrégió szintézise indítja, amely kovalens kötéssel kapcsolódik szerinen keresztül a vázfehérjéhez. A kötőrégió tetraszacharid szerkezete egyedi monoszacharid egységek egymás utáni, lépésenkénti hozzáadásával jön létre [23]. A tetraszacharid kötőegység nem redukáló terminális részére a GalNAc-transzferáz I kialakítja az első *N*-acetilgalaktózamin csoportot, ezáltal iniciálva a kondroitin váz szintézisét. A CS-re jellemző ismétlődő diszacharid régió a glükuronsav és egy *N*-acetilgalaktózamin csoportok váltakozó hozzáadásával szintetizálódik a GlcA transzferáz II és a GalNAc transzferáz II hatására [23]. A CS láncok a *N*-acetilgalaktózamin egység C4 és C6 pozíciójában egyaránt tartalmazhatnak szulfátcsoportokat, így nem-szulfatált, egyszeresen, valamint kétszeresen szulfatált ismétlődő egységekből épülnek fel [12].

A GAG-ok szerkezetének leghatékonyabb vizsgálati módszere a diszacharid alkotó elemeinek feltérképezése. A diszacharid analízishez a GAG láncok depolimerizálását bakteriális poliszacharid liáz enzimekkel vagy salétromsavval történő dezaminatív hasítással végzik [24–27]. A salétromsavval végzett kémiai bontás megőrzi a sztereokémiai információkat, de a hexózamin nitrogénjének szubsztituensével kapcsolatos információ elveszhet [25]. A poliszacharidok enzimatisz emésztése telítetlen C-C kettős kötések hoz létre a C-4 és C-5 között a hexuronsavmaradékok nem redukáló végén, ami az uronsav C-5 pozíciójának ismeretlen sztereokémiáját eredményezi [24]. Enzimatisz hasításhoz többféle **bakteriális liáz** található kereskedelmi forgalomban. Bár mechanizmusukban igen hasonlóak, mivel mindegyik enzim a GlcNAc/GlcN-HexA kötést hasítja, azonban a degradáció helye eltérő. A Heparinliáz I az iduronsavban gazdag *N*-szulfatált régiót hasítja, a Heparin-liáz III a glükuronsavban gazdag *N*-acetilált régiót hasítja, míg a Heparin-liáz II mindkét régiót hasítja,

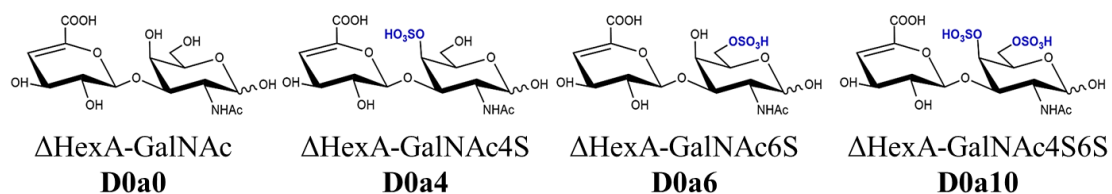
azonban kisebb aktivitással a másik kettőnél [24]. Abban az esetben, ha nem egy specifikus régió vizsgálata a cél, a részletezett különbségek miatt a három enzim keverékét szokás alkalmazni.

A **CS láncok emésztéséhez** általában Kondroitináz-ABC enzimet alkalmaznak. Ezt megfelelő pH-n és hőmérsékleten alkalmazva biztosítható a specifikus CS degradáció, ezzel elkerülve az emésztés alatt a nem kívánt dermatán-szulfát és hialuronsav GAG-ok degradációját [28]. A HS és CS láncok liáz emésztése során keletkező diszacharidok szerkezete, tradicionális nómenklatúrája, valamint Lawrence-kódos jelölése **3. ábrán** látható. A dolgozat további részében az egyes diszacharidok Lawrence-kódos jelölését fogom alkalmazni.

HS diszacharidok



CS diszacharidok



3. ábra A heparán-szulfát és kondroitin-szulfát GAG-ok bakteriális liáz emésztése során keletkező diszacharidok szerkezeti képlete, tradicionális, valamint Lawrence-kódos rövidítése. A Lawrence-kód értelmezését a 7. fejezet Függelékek F-1 ábrája mutatja be [29].

2.3. Glükózaminoglikánok műszeres analitikai vizsgálati módszerei

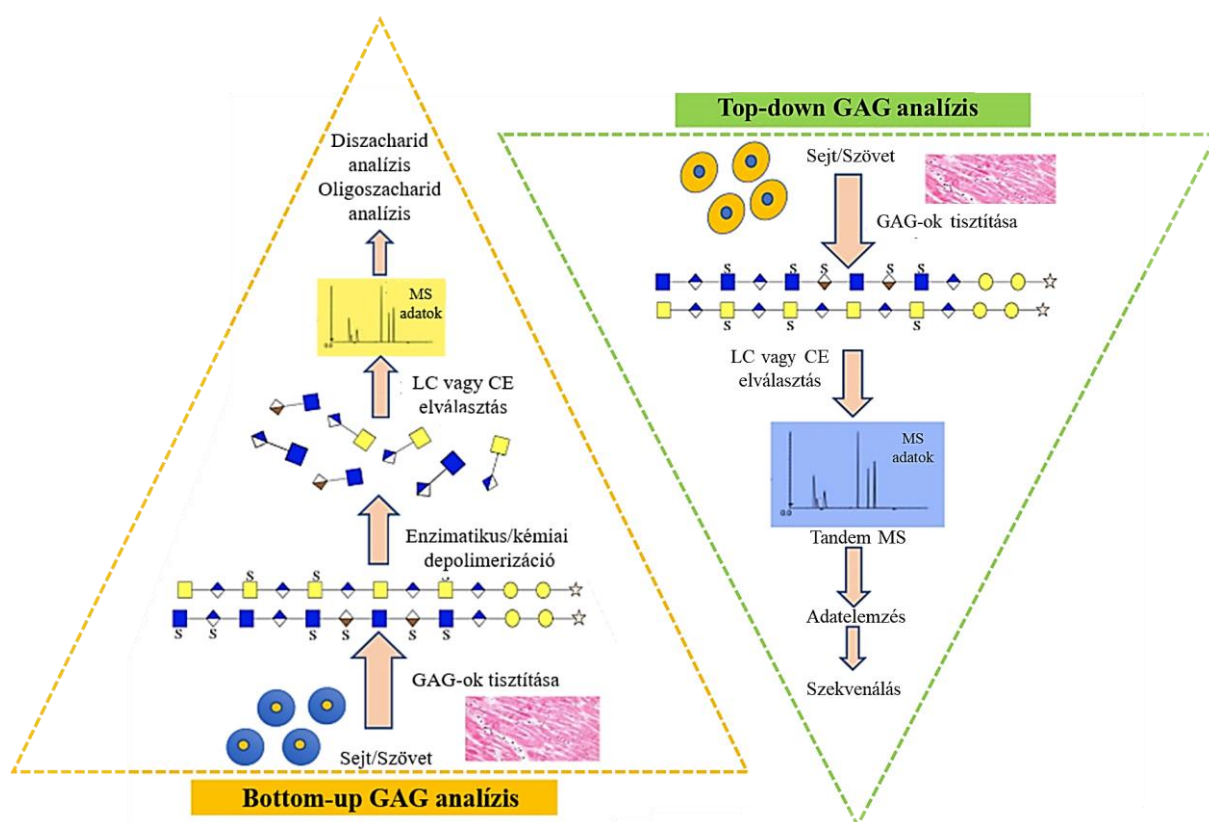
Ahogy a 2.2. fejezetben látható, a GAG-ok rendkívül összetett, heterogén szerkezetű poliszacharidok, amelyek olyan alapvető biológiai folyamatokat modulálnak, mint például a sejtnövekedés és a sejtek közötti jelátvitel [6]. Annak érdekében hogy jobban megérthessük ezen biológiai folyamatok lefolyását, szükség van a GAG-ok minőségi és mennyiségi analízisére, ami azonban szerkezeti sokszínűségük miatt nagy kihívást jelent. Az alapváz polaritása mellett különös nehézséget jelent a különböző mértékű szulfatáció miatti jelentős polaritáskülönbség is, amely kifejezetten nehezíti az összes GAG építőegység egyidejű vizsgálatát.

Jelenleg a GAG-ok szerkezeti elemzésének általános stratégiája több lépést foglal magába, amelyek a PG-k szövetekből vagy tenyésztett sejtekből történő izolálásával kezdődik. A GAG láncokat ezután kémiai vagy enzimatisz módszerekkel szabadítják fel. A teljes láncszerkezet az intakt GAG-ok vagy azok részleges enzimatisz depolimerizációjával előállított nagyobb oligoszacharid- vagy diszacharid-fragmensek elemzésével térképezhető fel. Egyetlen analitikai módszer sem biztosít önmagában teljeskörű szerkezeti és mennyiségi leírást a GAG-struktúrákról. Ezért szükséges különböző analitikai technikák, például a tömegspektrometria (MS), a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia, a folyadékkromatográfia (LC) vagy kapilláris elektroforézis (CE) kombinációjával létrehozott kapcsolt analitikai technikák alkalmazása [13].

2.3.1. Glükózaminoglikánok vizsgálata tömegspektrometria alapú módszerekkel: “bottom-up” és “top-down” megközelítés

A GAG-ok elemzését “bottom-up” (alulról felfelé), mind “top-down” (fentről lefelé) megközelítéssel végzik (4. ábra). A **top-down megközelítés** során az intakt (teljes) GAG-poliszacharidok elemzése részletes információt nyújthat az intakt GAG-lánc szekvenciájáról és a különböző régiók struktúrájáról. Az NMR-spektroszkópia fontos szerepet játszik az intakt láncok analízisében, és részletes információkat szolgáltat a sztereokémiáról, valamint a monoszacharidok összetételének elemzéséről [30], azonban milligram mennyiségű tiszta mintát igényel a GAG poliszacharidok teljes szerkezeti elemzéséhez, mely sok esetben azonban nem áll rendelkezésre [13]. Intakt és oligomer GAG-ok elválasztására alkalmas továbbá a gélelektroforézis és a kapilláris elektroforézis is [31,32]. Az olyan hatékony elválasztási technikák, mint a fordított fázisú ionpároképzésen alapuló kromatográfia [33] és a hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC) [34] MS-sel kombinálva szintén alkalmasak a heterogén GAG-ok hatékony szerkezeti azonosítására. A HPLC–MS alapú technikák azonban csupán a kisméretű GAG-láncok analízisére korlátozódott, mint például a bikunin

(~ 25 kDa), mivel a nagyobb makromolekulák vizsgálata méretükből adódóan egy jelentősen nehezebb feladat [35].



4. ábra A „bottom-up” és „top-down” GAG analízis megközelítésmódok munkafolyamatai [13].

Az ezzel ellentétes elvet alkalmazó technika az ún. **bottom up** analízis. A folyamat során a GAG poliszacharidokat kémiai vagy enzimatis hasítással kisebb diszacharidokra/oligoszacharidokra bontják (lásd 2.2. fejezet), majd általában HPLC vagy CE elválasztást követően tömegspektrometriával elemzik. Ezen túl, ezt a megközelítést alkalmazva általában szükséges kiterjedt minta-előkészítési lépések alkalmazása még a műszeres vizsgálatok előtt [36,37]. Ezt a módszert széleskörben alkalmazzák, mivel a kisméretű diszacharidok mérése jelentősen könnyebb analitikai feladat az intakt GAG-ok mérési lehetőségeihez képest. A módszer alkalmas a diszacharidok azonosítására és mennyiségi meghatározásukra, azonban az egyes GAG-láncok elsődleges szerkezetének vagy szekvenciájának megállapításához szükséges információk elvesznek. [13].

A tömegspektrometria (MS) egy hatékony analitikai technika, amely lehetővé teszi a diszacharid összetétel, az oligoszacharid hossz, a molekulatömeg, a szubsztituensek, például a szulfátcsoportok számának és típusának megállapítását. Számos ionizációs és detektálási technika áll rendelkezésre a tömegspektrometriás mérések elvégzéséhez, azonban GAG-ok analízisére szigorú követelményeknek kell megfelelni. Elektronütközéses és kémiai ionizációs technikákat alkalmazva a GAG-okon lévő kémiai labilis szulfátcsoportok leszakadhatnak,

ezzel információvesztést okozva. A lágy ionizációs technikák, mint az elektropray ionizáció (ESI) és a mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció (MALDI), elmúlt évtizedekben történő térhódításával azonban egyre elterjedtebben alkalmazzák a GAG-ok elemzésére is [13,38,39]. Ezen vegyületek MALDI ionizációval történő vizsgálatához, azonban különleges technikák használata szükséges például anionos MALDI mátrix-módosítók [40] vagy hűtött/nagy nyomású MALDI forrás [41], mivel ezek nélkül jelentős a diszacharidok szulfátvesztése a forráson belüli disszociáció miatt. Így elsődlegesen ESI ionforrást alkalmaznak amelyben negatív ionizációt és megfelelő beállításokat alkalmazva, minimalizálható a szulfátvesztés mértéke [42].

Az izomerek MS-alapú megkülönböztetésére ütközés indukált disszociációt alkalmazó **tandem tömegspektrometriás módszerek alkalmazása az elterjedt**, azonban felhasználhatósága korlátozott a fellépő szulfátvesztések miatt [13,43]. Emellett izomerek elválasztására alkalmas lehet HILIC típusú kromatográfia is, például CS izomereket sikeresen választottak szét ZIC-HILIC állófázist alkalmazva [44]. Ezen kívül a porózus grafit állófázist (PGC) alkalmazó kromatográfias módszerek is alkalmasak GAG diszacharid izomerek és enantiomerek elválasztására diasztereomer komplexek kialakítása révén [45]. Izomerek megkülönböztetésére alkalmas továbbá az ionmobilitás tömegspektrometria is, amellyel lehetséges például a HS izomerek elválasztása elhanyagolható szulfátvesztés mellett [46].

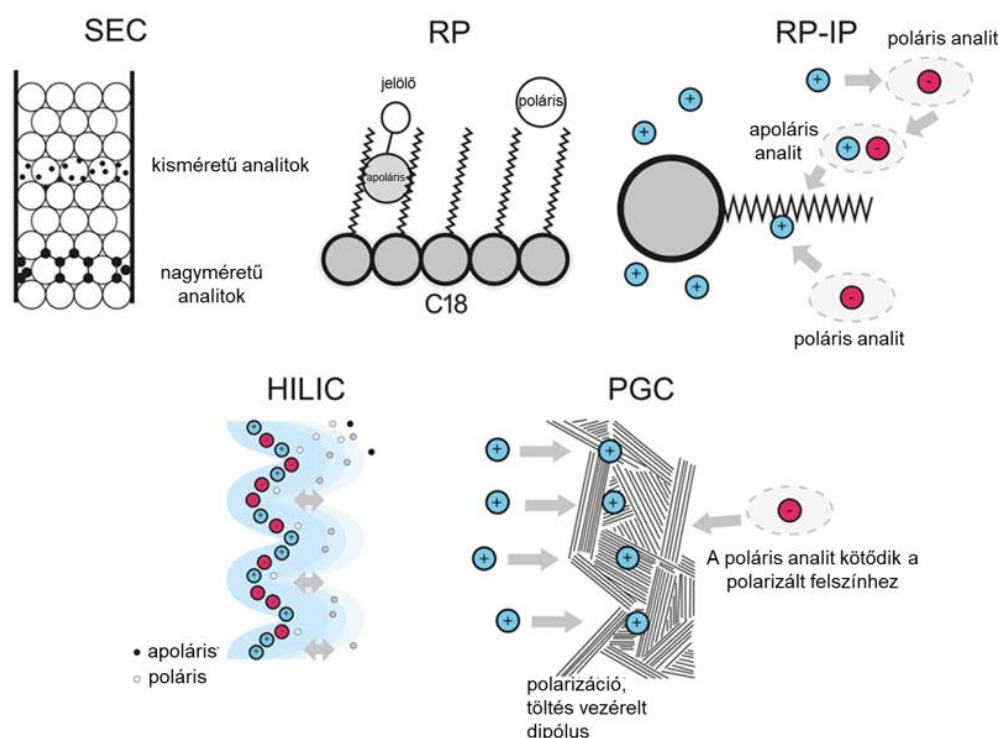
2.3.2. Kromatográfias módszerek GAG-ok vizsgálatára

Kromatográfias módszereket is elterjedten alkalmaznak diszacharid-analízisre UV-, fluoreszcencia- vagy MS-detektálását egyaránt alkalmazva. Az UV-detektálás alacsonyabb érzékenységet biztosít a fluoreszcens vagy MS-detektáláshoz képest [13]. A fluoreszcens detektálás érzékeny és szelektív módszer, azonban a GAG-ok nem hordoznak természetes fluorofór csoportokat, ezért azok kialakítása érdekében egy további jelölési lépésre van szükség [47]. Az elmúlt években egyre gyakrabban alkalmazzák az MS-alapú módszereket a legújabb fejlett MS-technológiák miatt, amelyek a diszacharidprofilok ultraérzékeny feltérképezését teszik lehetővé még kismennyiségű mintákban is [13].

Az alkalmazott kromatográfias módszerek elsődleges technikái (5. ábra) a fordított fázisú kromatográfia, a fordított fázisú ionpár kromatográfia, a porózus grafit állófázist használó kromatográfia és a hidofil interakciós folyadékkromatográfia [13].

A fordított fázisú kromatográfia (RP) natív (módosítás nélküli) diszacharidok meghatározására nem alkalmas, mivel poláris jellegük miatt nincs visszatartásuk ezen az állófázison. A módszer alkalmazhatósága származékképzés (hidrofób csoportok bevitele a molekulákba) alkalmazásával biztosítható, melyek közül a leggyakrabban alkalmazott reagens

a 2-aminoakridon [20,47,48]. A diszacharidok fordított fázisú analízisére egy másik megoldást jelenthet az **ionpárképző (RP-IP)** anyagok alkalmazása. Az ionpárképző anyagok ionpárt képezve a diszacharidokkal semlegesítik azok töltését apolárisabbá téve azokat, így megnövelve retenciójukat a fordított fázisú állófázisokon. Alkalmazott ionpárképző ágensek, például a tributil-amin vagy n-pentilamin [49–51]. A **porózus grafit kromatográfia (PGC)** kevésbé elterjedt GAG-ok analízisére, stabilitási problémái miatt, valamint hogy a háromszorosan szulfatált diszacharidok nem vagy nehezen eluálthatók az állófázisról [32,52,53]. A molekulatömeg alapján való megkülönböztetéshez használnak **méretkizárásos kromatográfiát (SEC)** is GAG-ok analízisére, egészen diszacharidoktól 8–10 monoszacharidból álló egységig [54], azonban a robosztussága és megbízhatósága ellenére hátránya az alacsony felbontás [55]. A **hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC)** szintén alkalmasnak bizonyult GAG-ok elemzésére, mivel hatékonyan választja el a poláris vegyületeket, és könnyen összekapcsolható MS-el, különösen ESI ionforrást alkalmazva [34,56]. A kutatócsoportunkban kifejlesztettek egy HILIC és gyenge anioncsere (WAX) retenciós mechanizmusok új kombinációját alkalmazó módszert GAG diszacharidok érzékeny mérésére [57–59]. TDK munkám során én is ezen módszereket alkalmaztam.



5. ábra GAG-ok analíziséhez elterjedten alkalmazott kromatográfiás módszerek.

SEC: méretkizárásos kromatográfia, **RP:** fordított fázisú kromatográfia, **RP-IP:** fordított fázisú ionpár kromatográfia, **HILIC:** hidrofil interakciós kromatográfia, **PGC:** porózus grafitalapú kromatográfia [27].

2.3.3. Mintatisztítási lehetőségek GAG diszacharidok vizsgálatához

A minták HPLC-MS mérése előtt szükség van egy **tisztítási lépésre**, amely során eltávolítjuk a mérést zavaró biológiai mátrixot és az emésztési maradványokat. Az irodalomban azonban kis számban találhatók erre irányuló módszerfejlesztések. A leggyakoribb példa, hogy méret alapján választják el a keletkező GAG diszacharidokat vagy oligoszacharidokat az emésztőenzimektől valamint további fehérjéktől centrifugális molekula szűréssel (3000 Da) [49,51,60], poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) [61], vagy méretkizárásos kromatográfia alkalmazásával [62]. Emellett található példa anioncserés kromatográfia alkalmazására is [47,63], azonban ennek tömegspektrometriás mérések előtti létjogosultsága megkérdőjelezhető. A legtöbb esetben azonban elhanyagolt terület a minták tisztítása, mivel a rendelkezésre álló módszerek drágák (pl. méretkizárásos kromatográfia) vagy bonyolultak és további minta-előkészítési lépéseket igényelnének (PAGE). Ezért célom volt egy olyan tisztítási módszer kifejlesztése, ami olcsó és könnyen kivitelezhető a diszacharidok hatékony tisztítására.

A **szilárd fázisú extrakció (SPE)** egy hatékony minta-előkészítési módszer a komplex mintákban lévő különféle vegyületek elválasztására, frakcionálására, ezáltal tisztítására és dúsítására. A tisztítás során első lépésben **aktiválni** kell az állófázis funkciós csoportjait, amit az állófázis **ekvilibrálása** követ. Miután az állófázist alkalmassá tesszük a tisztítás elvégzéséhez, a vizsgálandó minta **felvitele** következik, amely során a mintakomponensek megkötődnek az állófázis felületén. Ezután egy **mosási** lépésben eltávolítjuk a szennyező diszacharidokat, miközben a vizsgálandó molekulák az állófázison megkötött formában maradnak. Végül a megfelelő oldószerrel **eluáljuk** a megkötött diszacharidokat [64].

Glikomikai elemzések során az SPE elengedhetetlen lépés a szennyeződések eltávolítására és a nyomokban található glikánok dúsítására a HPLC vagy HPLC-MS analízis előtt [65]. Ilyen SPE állófázisnak alkalmasak a konvencionális HILIC állófázisok [66,67], valamint cellulóz és gyapot szintén HILIC állófázisként való alkalmazása, mely módszert alkalmazták *N*-glikánok szelektív dúsítására [68]. Ezen kívül porózus grafit állófázisú SPE-t széles körben alkalmaznak natív glikánok dúsítására [65,68,69]. Az *N*-glikánokhoz hasonló tulajdonságaik révén, valamint a kromatográfiás elválasztásban megfigyelhető eredmények (2.2.2. fejezet) alapján, **GAG-ok SPE tisztítására két ígéretes alternatíva lehet szintén a HILIC és a grafitalapú rendszerek alkalmazása.**

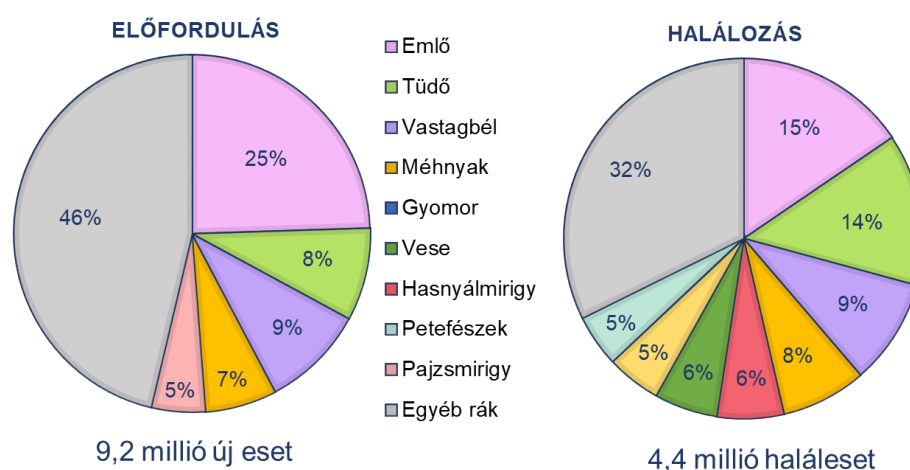
A **HILIC** módszerek alkalmazásával poláris vegyületek poláris állófázisokon választhatók el vízzel elegyedő szerves oldószerek felhasználásával [56]. HILIC körülmények között a poláris állófázis felületén kialakuló stabil, vízben gazdag réteg elősegíti a hidrofíl glikánok visszatartását, míg a kisebb hidrofilitású molekulák (például peptidek) megoszlása a

szerves mozgófázisban nagyobb, és könnyebben eluálódnak. A módszer GAG diszacharidokon való alkalmazhatóságát igazolja, hogy a HILIC egyre fontosabbá válik a szénhidrátok és ezen belül a GAG-ok elválasztásában is [42,56,70].

A **PGC** poláris és hidrofób kölcsönhatások kialakítására is alkalmas, így képes a poláris glikánok megkötésére [65,71]. A grafit állófázis alapvetően apoláris felülete miatt elsősorban a hidrofób vegyületek elválasztására alkalmas, azonban a fellépő diszperziós kölcsönhatás erőssége nagymértékben függ attól, hogy a molekula mennyire illeszkedik a lapos grafitfelülethez. [72]. A grafiton lévő pi-elektronok és a grafit nagy polarizálhatósága azonban erős poláris kölcsönhatások kialakítását is lehetővé teszi [73,74], ami a többszörösen szulfatált hidrofíl glikánok permanens megkötését is eredményezheti. Ezen kívül képes diasztereomer komplexek képzésén keresztül elválasztani például izomereket és enantiomereket [45]. Bár a kölcsönhatási mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak, a PGC mindenképp egy ígéretes anyag lehet GAG diszacharidok SPE állófázisként való alkalmazására.

2.4. Emlőrákos és prosztatatarákos megbetegedések

Az emlőrák a nők körében a leggyakrabban előforduló rosszindulatú daganat (6. ábra). A korai emlőrák – vagyis az a rák, amely a mellben található, vagy csak a hónalj nyirokcsomóira terjedt ki – gyógyíthatónak tekinthető, amivel szemben az előrehaladott (áttétes) betegség nem tekinthető annak. A jelenleg rendelkezésre álló terápiás lehetőségekkel azonban kezelhető az utóbbi eset is, amelynél a terápia fő célja a túlélés meghosszabbítása és a tünetek csökkentése a kezeléssel összefüggő alacsony toxicitás mellett az életminőség fenntartására vagy javítására [75].

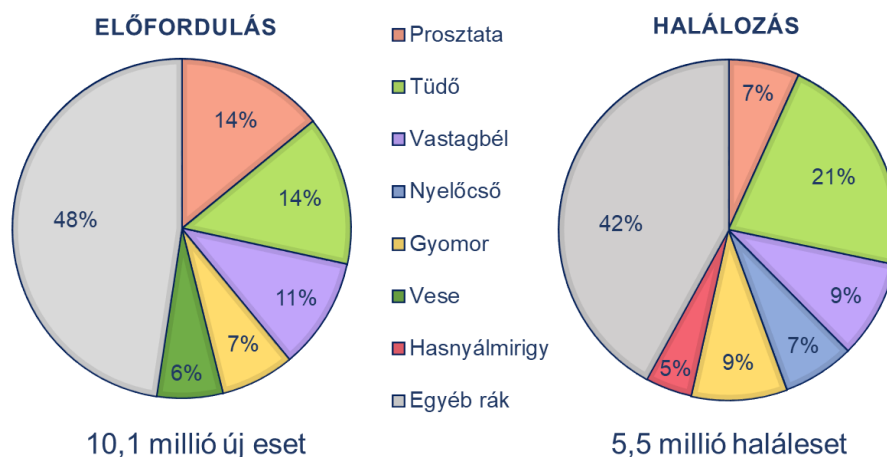


6. ábra Különböző szöveti eredetű rákos megbetegedések előfordulási és halálozási aránya nők körében [76].

Az emlőrák diagnosztizálása hármas teszten alapul, amely klinikai vizsgálatot, képalkotást (általában mammográfiát és/vagy ultrahangot) és tűbiopsziát tartalmaz, figyelembe

véve a betegek jellemzőit, panaszait [77]. Az emlőkarcinogenezis osztályozására jelenleg a klinikai gyakorlat jellemzően öt altípusból álló osztályozást alkalmaz a szövettani és molekuláris jellemzők alapján [75]. A mammográfiás szűrés egyik legnagyobb hátránya a gyakori álpozitív visszahívás, valamint a túlkezelések [78]. Molekuláris szinten a mellrák igen heterogén betegség. A molekuláris jellemzők közé tartozik a humán epidermális növekedési faktor receptor (*HER2*, *ERBB2* által kódolt) aktiválása, a hormonreceptorok aktiválása (ösztrogén receptor és progeszteron receptor) és/vagy a *BRCA* mutációk. A *BRCA1* és *BRCA2* mutációk például a mellrák kialakulásának kockázatával járnak együtt 80 éves korig [79]. Az emlőrák kezelésének több lehetősége van, mint például a sebészeti beavatkozás, gyógyszeres kezelés, kemoterápia, sugárkezelés, valamint hormonterápia [80]. A kezelési döntéseket az emlőrák szövettani és molekuláris jellemzői nagymértékben befolyásolják, így egy speciális, multidiszciplináris csapat által végzett kezelés javítja a túlélési esélyt és az életminőséget a korai és áttétes emlőrákban szenvedő betegeknél.

A **prosztatarák** a második leggyakoribb rosszindulatú daganat (a tüdőrák után) férfiak körében (7. ábra) [76]. Előfordulási gyakorisága és mortalitása összefüggésbe hozható az életkorral (a diagnózis időpontjában az átlagos életkor 66 év), valamint étrend és a fizikai aktivitás fontos szerepet játszik a prosztatatarák kialakulásában és progressziójában. A prosztatatarák korai stádiumában tünetmentes lehet, és gyakran enyhe lefolyású és sok esetben minimális kezelést igényelhet, vagy egyáltalán nem igényel kezelést. A leggyakrabban előforduló panasz a vizeelési nehézség, a gyakoribb vizezés melyek azonban jóindulatú prosztatata megnagyobbodásból (BPH) is származhatnak [81]. A prosztatatarákot legtöbb esetben a prosztatata-specifikus antigén (PSA) megnövekedett plazmaszintje alapján mutatják ki, amely glikoprotein általában a prosztataszövetben expresszálódik. A 4 ng/mL alatti PSA-szint normálisnak tekinthető, 4–10 ng/mL közötti szint „gyanús”, a 10 ng/mL fölötti szint pedig a „veszélyes” kategóriába esik, azonban az alapszintet általában korrigálják életkorsávokkal [82].



7. ábra Különböző szöveti eredetű rákos megbetegedések előfordulási és halálozási aránya férfiak körében [76].

Mivel azonban számos egyéb elváltozásnál, például BPH és gyulladásos folyamatoknál is emelkedhet a PSA vérszintje, így az alkalmazása magas téves pozitív arányhoz és jelentős túldiagnosztizáláshoz vezet, így a szövetbiopszia a standard eljárás a rák jelenlétének megerősítésére [83]. Az alacsony kockázatú tumorok esetén a leggyakoribb kezelés az aktív megfigyelés, a nagyobb kockázatú rákok kezelésére pedig általában különböző sebészeti beavatkozásokat (pl. radikális prosztatatektómia) valamint kemoterápiás kezelést alkalmaznak [84].

A prosztatarák osztályozására az úgynevezett Gleason pontszámot alkalmazzák, ami a sejtek differenciáltsága alapján történő besorolást jelenti. Egy ötfokozatú skálán határozzák meg a két legnagyobb mértékben jelen lévő differenciáltsági szintet (mintázatot), ehhez egy-egy számmal Gleason grádust rendelnek [85]. A génkapcsolati vizsgálatok hét különböző génen mutatják ki a prosztata karcinómára való főbb érzékenységet. Az egyik ilyen gén a *HPC1*, ami a ribonukleáz L enzimet kódolja, ami fontos szerepet játszik például az apoptotikus sejthalál szabályozásában [81]. A *HPC* egy részhalmaza a *BRCA1*- és 2-mutációval rendelkező férfiakban fordult elő, amelyek a prosztatarák klinikailag agresszív formáját mutatták [86]. Ezenkívül a *BRCA2* mutációk a prosztatarák magasabb előfordulási gyakoriságával is korreláltak [87].

A prosztatarák és az emlőrák között több jelentős hasonlóság figyelhető meg. Az emlő- és prosztatadaganat közös jellemzője, hogy fejlődésük bizonyos szakaszában hormonfüggő rákos megbetegedések, ezért a hormonterápia egy hatásos terápiás megközelítés lehet [88]. Vizsgálták szteroid hormonok szabályozó hatását a mell- és prosztatarák növekedésére és fenntartására, amelyek sok esetben mindkét rák esetében közösnek bizonyultak. A szteroid hormonok szintézisének és hatásmechanizmusának alaposabb megértése az emlő- és prosztatarák progressziójának minden szakaszában lehetőséget teremt új terápiás megközelítésekre, amelyek ígéretesnek bizonyulnak [88]. Ezen kívül mindkét ráktípusra jellemző a különböző *BRCA* mutációk megjelenése, melyek közötti összefüggések kutatás alatt állnak. Egy tanulmányban vizsgálták az emlő és prosztatarák mutációk közötti hasonlóságot, ahol a *BRCA*-hoz hasonló *PALB2* mutáció valószínűsíthetőleg egyaránt növelheti a mellrák és prosztatarák kockázatát [86]. Ezek az eredmények mind alátámasztják, hogy a prosztatarák és az emlőrák sok szempontból hasonlóságot mutat, így ezek összehasonlítása és közös tendenciák keresése igen fontos a folyamataik alaposabb megismeréséhez.

2.5. Glükózaminoglikánok szerepe és változása prosztatatarákban és emlőrákban

Az extracelluláris mátrix proteoglikánjai szerkezeti molekulákként működnek a sejtközi kollagénnel együtt, míg a pericelluláris proteoglikánoknak szerepet tulajdonítottak a sejt-sejt adhézióban, a sejtmátrix adhézióban és a sejtszintű migrációban és embriológiai morfogenezisben [10,89,90]. Az egyes proteoglikán fajtáknak egymással ellentétes szerepük lehet, így a szövetben a proteoglikánok egyensúlyában bekövetkezett bármilyen változás elősegítheti vagy gátolhatja a tumor progresszióját. Fontos, hogy a daganat proteoglikán összetétele a tumorsejtek és a stromasejtek szintetikus és lebontó aktivitásának összege [10].

A különböző daganatok GAG tartalmában mennyiségi és minőségi módosulásokat egyaránt találtak. Egyöntetű változás nem mutatható ki, de visszatérő megállapítások közé tartozik a HS csökkenő mértékű szulfatációja és a megnövekedett CS tartalom. A GAG-tartalom változása nem korlátozódik a rosszindulatú daganatokra [89]. Különböző vizsgálatok kimutatták a jóindulatú elváltozások, például az emlő fibroadenoma és a jóindulatú prosztata hiperplázia GAG-tartalmának változását. Az emlő esetében például a 4- és 6-szulfatált kondroitin-szulfátok szintje magas volt a rákos szövetben, a daganat progressziójával a hialuronsav mennyisége lecsökkent. Heparán-szulfát mennyiségben nem találtak számottevő különbséget [91]. A prosztatatarákban kimutatták CS, DS, HS és HA jelenlétét a normál felnőtt prosztatában, valamint a CS megnövekedett szintjét BPH-ban [92]. A proteoglikánok GAG oldalláncainak szintjében és szerkezetében bekövetkezett változások, mint például a CS fokozott expressziója és a HS deszulfatálódása, összefüggésbe hozható a rosszindulatú daganatok kialakulásával és progressziójával különböző szövetekben [93,94]. Kevésbé ismert azonban a proteoglikánok és a hozzájuk kapcsolódó GAG oldalláncok szerepe a prosztatatarák progressziójában.

A CS potenciálisan hasznos marker lehet, mivel ismert, hogy befolyásolja a sejtek növekedését és differenciálódását, és befolyásolhatja a rosszindulatú progressziót. Kimutatták, hogy a prosztatatarák esetében a CS GAG-ok emelkedett szintje a betegség progressziójával járt együtt, valamint hogy az emelkedett stromális CS és a műtét előtti PSA-koncentráció erősen összefügg a korai stádiumú daganatokban [90]. Ezen kívül a verzikán mennyisége növekszik BPH és prosztatatarák (PCa) esetén, és hozzájárul a betegség patológiai lefolyásához [95]. A prosztataszövet GAG tartalmát vizsgálták cellulóz-acetát-elektroforézissel is. A jóindulatú prosztata-megnagyobbodásos és a prosztatatarákos mintákban szignifikánsan magasabb CS tartalom volt kimutatható, mint a normál prosztata szövetekben, miközben a dermatán-szulfát mennyisége lecsökkent. A HS kismértékben, de szignifikánsan csökkent prosztatatarákban a BPH-s és normál szövetekhez képest [89]. A perlekán esetén tumoros elváltozást gyorsító

funkciót találtak, mivel a magas perlekán szint magas Gleason pontszámmal és gyors sejproliferációval járt együtt [96].

Számos tanulmány vizsgálta a GAG szerkezetének vagy expressziós szintjének változásait és a mellrák közötti kapcsolatot is. A talált összefüggések között szerepelt a magas HS-szint és a tumorok közötti összefüggés [97], valamint a CS GAG-tartalom jelentős növekedése emlődagatanokban [98]. A rákos szövetekben bekövetkező szerkezeti változásokat jellemzően a normál környező szövethez viszonyítva állapítják meg [99]. A mellrák különböző régióit vizsgálva a központi karcinómás területeken a kondroitin-szulfát és az uronsav tartalom jelentősen megnőtt, a dermatán-szulfát-tartalom pedig szignifikánsan csökkent a fibroadenómához képest. A környező karcinómás szövet kondroitin-szulfát tartalma pedig szignifikánsan magasabb volt, mint a nem érintett szövetekben [100]. GAG-ok szerkezetét vizsgálva normál környező szövetcsoport valamint két emlőrákos betegcsoport összehasonlításával, a tapasztalatok alapján a rákos szövet típusától függetlenül, a tumor kialakulásával magasabb a CS 6S-szulfatációja, amit összefüggésbe hoztak a sejtproliferációval [101]. Az emlőtumorhoz köthető halálozás daganatos és normál szöveti régiók esetén egyaránt összefüggésbe hozható alacsonyabb HS szulfatációval, amit a 6S szulfatáció csökkenése és szulfatálatlan diszacharid egységek mennyiségének növekedése okoz [99].

Bár az irodalomban található több példa is emlőtumoros és prosztatatarákos szövetek glükózaminoglikán analízisére, hiányos azonban a két betegség GAG tartalmának diszacharid szintű szerkezeti összehasonlítása. Mivel az emlőrák és prosztatatarák között számos biológiai hasonlóságot mutattak ki (*lásd 2.4 fejezet*) mindeképp érdekesnek találtuk a kétféle szervi eredetű betegség GAG tartalmának részletes elemzését és összehasonlítását, amit munkám során meg is valósítottam.

3. Kísérleti anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok listája

- Acetonitril: VWR, LC-MS grade
- Ammónium-acetát: Sigma-Aldrich
- Ammónium-formiát: Sigma-Aldrich
- aro kozmetikai vattakorong 60% pamut 40% viszkóz
- dm ebelin BIO Watte-Pads 100% pamut
- Eppendorf Tubes® Protein LoBind Tubes
- Etanol, abszolút: VWR, LC-MS grade
- Formamid: Next Advance, Inc.
- Fused szilika kapilláris: Polymicro technologies, „optornis polymicro polyamid coated persilylated” szilika kapilláris 250 µm *i.d.*
- Glygen Corp, TopTip C18 + Carbon 10–200 µL centrifugális SPE rendszer
- GoldenGate Bioscience 200 µL LFR Steril pipettahegy
- Hangyasav: Sigma-Aldrich
- HILIC-WAX töltet: GlycanPac™ AXH-1 1,9 µm; analitikai kolonnából (2,1x100mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- HSPIM: Heparán-szulfát, sertés bélhámából izolált: Iduron Ltd., Manchester, UK
- HSBK: Heparán-szulfát, szarvasmarha veséből izolált: Sigma-Aldrich
- Heparán-szulfát diszacharidok: Iduron Ltd., Manchester, UK
- Heparináz I, II and III enzim: Iduron Ltd., Manchester, UK
- Kalcium-hidroxid: Sigma-Aldrich
- KASIL® 1: kálium-szilikát 29,1 tömegszázalékos vizes oldata; Next Advance, Inc.
- KASIL® 1624: kálium-szilikát 24,0 tömegszázalékos vizes oldata; Next Advance, Inc.
- Kék pille vatta 100% pamut
- Kondroitin-szulfát diszacharidok: Iduron Ltd., Manchester, UK
- Kondroitináz ABC: Sigma-Aldrich
- Lys-C+Tripszin keverék: Promega
- Metanol: VWR, Chromasolv® for gradient elution
- Nivea vattakorong 100% pamut
- Pierce™ Graphite Spin Columns centrifugális SPE rendszer
- Spar S-Budget kozmetikai vattakorong 100% vatta
- Thermo HyperSep MicroTip Hypercarb 1–10 µL
- Tripszin Gold: Promega
- Ultratiszta víz: VWR, LC-MS grade
- Xilol izomerkeverék: VWR

3.2. Kapilláris nanoHPLC kolonnák készítése

A nanoHPLC-MS mérésekhez egy saját töltésű kapilláris kolonnát alkalmaztam, mely töltési folyamatát a csoportban dolgozták ki [57]. A folyamat során 250 μm átmérőjű kapillárist vágtam le 20–30 cm hosszú nagyságban. A méretrevágást követően a kapilláris egyik végén frit töltettartó réteget alakítottam ki. A frit elkészítéséhez a kapilláris végét Kasil® 1 és formamid 3:1:1 arányú keverékébe mártottam, majd ezután a kapillárist 4 órán keresztül 80°C-on termosztáltam. A folyamat végén kialakult az eluens átengedéséhez megfelelően porózus, de az állófázis megtartásához elegendő nagy teherbírású frit, melyet a holtterfogát minimalizása érdekében 2 mm hosszúra vágtam. Ezt egy metanolos mosás követte, valamint elkészítettem 1 mg/ μL töménységű HILIC-WAX töltetszuszpenciót acetonitril és víz 3:1 arányú keverékében. Az elkészített szuszpenziót egy nagynyomású cellába behelyezve 2000 psi nyomású nitrogén gázzal jutattam a kapillárisba, amely során a töltetszemcsék felgyülemlenek a frit réteg mögött az általam kívánt magasságig. Ezt követően a megfelelő kolonnatömörtség érdekében, 6000 psi nyomást alkalmazva egy tömörítési lépést végeztem.

3.3. Szilárd fázisú extrakciós módszerek és fejlesztésük

A szövetfelületről kinyert emésztményt mérés előtt szükséges megtisztítani, hogy eltávolítsam a zavaró biológiai mátrixot vagy emésztési maradványokat, annak érdekében, hogy a kis mennyiségben jelen lévő GAG diszacharidok is jól mérhetőek legyenek. HS és CS diszacharidok tisztításához kétféle, általam fejlesztett szilárd fázisú extrakciós módszert alkalmaztam. A fejlesztési kísérletek során a biológiai eredetű minták kivételével standard HS és CS diszacharid keveréket alkalmaztam mérendő mintaként, amely minden diszacharidot 10 pmol mennyiségben tartalmazott. Kontroll mintaként a visszanyerések számításához tisztítatlan, standard HS és CS diszacharid keveréket használtam, amely minden diszacharidot szintén 10 pmol-ban tartalmazott. A tisztítási kísérleteket beállításokként több párhuzamos (általában négy darab) minta előkészítésével és mérésével végeztem. A módszerfejlesztés folyamatát és a végleges módszereket a következő fejezetekben részletezem.

3.3.1. Módszerfejlesztés HS diszacharidok tisztítására

3.3.1.1. Vatta-HILIC módszer fejlesztése HS diszacharidok tisztítására

A vatta-HILIC szilárd fázisú extrakciós módszer fejlesztése során (lásd 4.1.1 fejezet) a 2. táblázatban látható paraméterek felhasználásával térképeztem fel a módszer alkalmazhatóságát. Ezt követően számos kísérletsorozatot végeztem mind az állófázis, mind az oldószerek paramétereinek változtatásával. Vizsgáltam a vatta mennyiségének, összetételének a hatását a különböző lépésekben felhasznált oldószerek összetételének és hőmérsékletének valamint az SPE módszert kiegészítő lépés hatását, melyek egyes kísérletsorozatnál alkalmazott

pontos beállításait a 4-5. táblázatban tüntettem fel. A végső, optimált vatta-HILIC protokoll pedig a 3. táblázatban látható.

2. táblázat Kiindulási vatta-HILIC módszer HS diszacharidok tisztítására.

	térfogat	összetétel	ismétlés
felületaktiválás	50 µL	60% ACN (H ₂ O)	-
kondicionálás	50 µL	0,1% FA; 95% ACN (H ₂ O)	2x
felvitel	50 µL	0,1% FA; 95% ACN (H ₂ O)	-
újrafelvitel	-	-	2x
mosás	50 µL	0,1% FA; 95% ACN (H ₂ O)	-
elúció	50 µL	0,1% FA(H ₂ O)	-
vatta márka	dm		
vatta mennyisége	2-3 mm-es magasságba töltve 10 µL-es pipettahegybe		
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min		

3. táblázat Optimált vatta-HILIC módszer HS diszacharidok tisztítására.

	térfogat	összetétel	ismétlés
felületaktiválás	50 µL	60% ACN (H ₂ O)	-
kondicionálás	50 µL		2x
felvitel	30 µL	1% TFA; 95% ACN (H ₂ O)	-
újrafelvitel	-	-	2x
mosás	50 µL	1% TFA; 95% ACN (H ₂ O)	-
elúció	10 µL	5% NH ₃ , 40°C	2x
vatta márka	dm		
vatta mennyisége	2-3 mm-es magasságba töltve 10 µL-es pipettahegybe		
centrifugálási paraméterek	2500 rpm, 1min		

4. táblázat HS fejlesztés során alkalmazott kísérletsorozatok 1-4. Zölddel kiemelve láthatók az adott kísérletsorozat alapján a továbbiakban rögzített paraméterek.

módszer paraméterek	1. kísérletsorozat					2. kísérletsorozat			3. kísérletsorozat			4. kísérletsorozat	
vatta márka	dm	Spar	Kék pille	Nivea	aro	dm			dm			dm	
vatta mennyisége	kis (2–3 mm)					kis (2–3 mm)	közepes (3-szoros)	nagy (10-szeres)	kis (2–3 mm)			kis (2–3 mm)	
felületaktiválás	50 µL 60:40 v/v ACN:H ₂ O					50 µL 60:40 v/v ACN:H ₂ O			50 µL 60:40 v/v ACN:H ₂ O			50 µL 60:40 v/v ACN:H ₂ O	
kondicionálási, felviteli, mosási ACN mennyiség	95%					95%			95%			95%	98%
kondicionálási, felviteli, mosási savminőség	0,1% FA					0,1% FA			0,1% FA			TFA	FA
felviteli oldószer hőmérséklete	RT					RT			RT			RT	
újrafelviteli lépések száma	2					2			2			2	
felvitel oldat térfogata	50 µL					50 µL			50 µL	30 µL	10 µL	30 µL	
mosási oldat térfogata	50 µL					50 µL			50 µL	30 µL	10 µL	50 µL	
elúciós oldat térfogata	50 µL					50 µL			50 µL	30 µL	10 µL	10 µL	
elúciós oldószer hőmérséklete	RT					RT			RT			RT	
elúciós lépések száma	1					1			1			1	
elúciós összetétel	0,1 FA (H ₂ O)					0,1 FA (H ₂ O)			0,1 FA (H ₂ O)			0,1 FA (H ₂ O)	
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min					2500 rpm 1min			2500 rpm 1min			2500 rpm 1min	

5. táblázat HS fejlesztés során alkalmazott kísérletsorozatok 5-7. Zölddel keimelve láthatók az adott kísérletsorozat alapján a továbbiakban rögzített paraméterek.

módszer paraméterek	5. kísérletsorozat	6. kísérletsorozat	7. kísérletsorozat
vatta márka	dm	dm	dm
vatta mennyisége	kis (2-3 mm)	kis (2-3 mm)	kis (2-3 mm)
felületaktiválás	50 µL 60:40 v/v ACN:H ₂ O	50 µL 60:40 v/v ACN:H ₂ O	50 µL 60:40 v/v ACN:H ₂ O
kondicionálási, felviteli, mosási ACN mennyiség	95%	95%	95%
kondicionálási, felviteli, mosási savminőség	TFA	TFA	TFA
kondicionálási, felviteli, mosási TFA mennyiség	0,1% 0,5% 1% 5%	1%	1%
felviteli oldószer hőmérséklete	RT	4°C RT	RT
újr felviteli lépések száma	2	2	2
felvitel oldat térfogata	30 µL	30 µL	30 µL
mosási oldat térfogata	50 µL	50 µL	50 µL
elúciós oldat térfogata	10 µL	10 µL	10 µL
elúciós oldószer hőmérséklete	RT	40°C RT	40°C
elúciós lépések száma	1	1 2	2
elúciós összetétel	0,1 FA (H ₂ O)	1x 0,1%FA 2% FA 1. 0,1%FA; 2. 100% H ₂ O	2x 10% ACN 2x 10%MeO H 2x 5% NH ₃ 1. 0,1% FA; 2. 2% HCl
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min	2500 rpm 1min	2500 rpm 1min

3.3.1.2. Különböző gyártójú grafitalapú állófázisok tesztelése és összehasonlítása HS diszacharidok tisztítására

Kiválasztottunk három, a kutatócsoportban is alkalmazott, kereskedelmi forgalomban kapható grafitalapú SPE állófázist (Thermo: Hypersep Hypercarb, Pierce: Graphite Spin Columns, Glygen: TopTip grafit + C18), melyeket teszteltem GAG diszacharidok tisztítására való alkalmazhatóságának szempontjából. A legjobb összehasonlítás érdekében a kísérletek során mindhárom gyártó által ajánlott protokollt kombináltam mindhárom állófázissal. Az alkalmazott kísérleti beállításokat 6-8. táblázatban tüntettem fel. A kiválasztott legjobban teljesítő módszer paraméterei pedig a 9. táblázatban láthatók.

6. táblázat Hypersep Hypercarb oldószerrendszerben alkalmazott oldószerösszetételek, térfogatok és ismétlésszámok.

	térfogat	összetétel	ismétlés
aktiválás	20 µL	0,1% FA 70% ACN (H ₂ O)	5
kondicionálás	20 µL	0,1% FA (H ₂ O)	5
felvitel	20 µL	0,1% FA (H ₂ O)	20
mosás	20 µL	0,1% FA (H ₂ O)	5
elúció	20 µL	0,1% FA 70% ACN (H ₂ O)	20
állófázisok	Hypersep Hypercarb Tips, Pierce, TopTip Grafit + C18		

7. táblázat Pierce oldószerrendszerben alkalmazott oldószerösszetételek, térfogatok és ismétlésszámok.

	térfogat	összetétel	ismétlés	további paraméterek
aktiválás1	100 µL	2% NH ₃ (H ₂ O)	2	
aktiválás 2	100 µL	100% ACN (H ₂ O)	-	
kondicionálás	100 µL	1% TFA (H ₂ O)	2	
felvitel	50 µL	1% TFA (H ₂ O)	-	+ 2 perc inkubálás
újrafelvitel	-	-	-	
mosás	100 µL	1% TFA (H ₂ O)	3	
elúció	50 µL	0,1% FA 50% ACN (H ₂ O)	3	
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min			
állófázisok	Hypersep Hypercarb Tips, Pierce, TopTip Grafit + C18			

8. táblázat TopTip grafit + C18 oldószerrendszerben alkalmazott oldószerösszetétek, térfogatok és ismétlésszámok.

	térfogat	összetétel	ismétlés
aktiválás	100 µL	0,1% FA (H ₂ O) 80% ACN (H ₂ O)	2
kondicionálás	100 µL	100% víz	3
felvitel	50 µL	100% víz	-
újrafelvitel	-	-	-
mosás	50 µL	100% víz	-
elúció	50 µL	0,05% TFA 40% ACN (H ₂ O)	3
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min		
állófázisok	Hypersep Hypercarb Tips, Pierce, TopTip Grafit + C18		

9. táblázat Kiválasztott optimált grafit alapú módszer HS diszacharidok tisztítására.
TopTip grafit + C18 oldószerrendszer Pierce állófázist alkalmazva.

	térfogat	összetétel	ismétlés
aktiválás	100 µL	0,1% FA 80% ACN (H ₂ O)	2
kondicionálás	100 µL	100% víz	3
felvitel	50 µL	100% víz	-
újrafelvitel	-	-	-
mosás	50 µL	100% víz	-
elúció	50 µL	0,05% TFA 40% ACN (H ₂ O)	3
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min		
állófázis	Pierce		

3.3.1.3. HS diszacharidok tisztítására fejlesztett kombinált protokoll

A kísérleti eredmények alapján a fejlesztett vatta-HILIC és kiválasztott grafit alapú módszerek kiegészítik egymást, mivel a két módszer kombinálásával tudtam a lehető legmagasabb visszanyeréseket és legkisebb torzítást elérni (lásd 4.1.3 fejezet). A kombinált módszer során első lépésként elvégeztem a vatta-HILIC tisztítási módszert (3. táblázat), mely során külön frakcióként összegyűjtöttem a felviteli és mosási átesőt és külön frakcióként az elúciót. Ezt követően a második lépésben a felviteli+mosási átesőt oldószercsere után tovább tisztítottam a TopTip módszer Pierce állófázist alkalmazó kiválasztott módszerrel (9. táblázat), majd ennek elúcióját egyesíttem a vatta-HILIC módszer elúciójával. Az injektálási oldószerre történő oldószercsere követően az egyesített frakcióból történik a műszeres HPLC-MS mérés.

3.3.2. Módszerfejlesztés CS diszacharidok tisztítására

3.3.2.1. Vatta-HILIC módszer fejlesztése CS diszacharidok tisztítására

A CS diszacharidokra alkalmazandó vatta-HILIC szilárd fázisú extrakciós módszer fejlesztése során (lásd 4.2.1 fejezet) alapul a HS módszerfejlesztési tapasztalatokat vettem. Kiindulási módszerként a 3. táblázatban látható végső HS vatta-HILIC módszert alkalmaztam. Ezt követően többféle kísérletsorozatot végeztem, azonban csupán a HS fejlesztések során meghatározó paramétereket változtattam, minden más paramétert a HS módszer végső beállításai alapján rögzítettem. A vizsgálatok hangsúlya a különböző lépésekben felhasznált oldószerek összetételének kiválasztása volt. Az egyes kísérletsorozatnál alkalmazott pontos beállításokat a 11. táblázatban tüntettem fel, a végső, optimált vatta-HILIC protokoll pedig a 10. táblázatban látható.

10. táblázat Optimált vatta-HILIC módszer CS diszacharidok tisztítására.

	térfogat	összetétel	ismétlés
felületaktiválás	50 µL	60% ACN (H ₂ O)	-
kondicionálás	50 µL	1% TFA 95% ACN (H ₂ O)	2x
felvitel	30 µL	1% TFA 95% ACN (H ₂ O)	-
újrafelvitel	-	-	2x
mosás	50 µL	1% TFA 95% ACN (H ₂ O)	-
elúció	10 µL	1% NH ₃ (H ₂ O) 40°C	2x
vatta márka	dm		
vatta mennyisége	2–3 mm-es magasságba töltve 10 µL-es pipettahegybe		
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min		

11. táblázat CS fejlesztés során alkalmazott kísérletsorozatok. Zölddel keimelve láthatók az adott kísérletsorozat alapján a továbbiakban rögzített paraméterek.

módszer paraméterek	1. kísérletsorozat						2. kísérletsorozat			3. kísérletsorozat
vatta márka	dm						dm			dm
vatta mennyisége	kis (2–3 mm)						kis (2–3 mm)			kis (2–3 mm)
felületaktiválás	50 µL 60 % ACN (H ₂ O)						50 µL 60 % ACN (H ₂ O)			50 µL 60 % ACN (H ₂ O)
kondicionálási, felviteli, mosási ACN mennyiség	95%						92%	95%	98%	95%
kondicionálási, felviteli, mosási savminőség	TFA						TFA	FA	HFBA	TFA HFBA
kondicionálási, felviteli, mosási TFA mennyiség	1%						0,2%	1%	5%	1%
felviteli oldószer hőmérséklete	RT						RT			RT
újrafelviteli lépések száma	2						2			2
felvitel oldat térfogata	30 µL						30 µL			30 µL
mosási oldat térfogata	50 µL						50 µL			50 µL
elúciós oldat térfogata	10 µL						10 µL			10 µL
elúciós oldószer hőmérséklete	40°C						40°C			40°C
elúciós lépések száma	2						2			2
elúciós összetétel	0,1% NH ₃	1% NH ₃	5% NH ₃	10% NH ₃	25mM NH ₄ FA	0,1% FA	1% NH ₃			1% NH ₃

3.3.2.2. Különböző gyártójú grafit alapú állófázisok tesztelése és összehasonlítása CS diszacharidok tisztítására

A HS fejlesztésénél kiválasztott három, kereskedelmi forgalomban kapható grafit alapú SPE állófázist (Thermo: Hypersep Hypercarb, Pierce: Graphite Spin Column, Glygen: TopTip grafit + C18), teszteltem CS diszacharidok tisztítására. A HS fejlesztésénél szerzett tapasztalatok alapján a TopTip oldószerrendszer alkalmazásával végeztem a három állófázis összehasonlítását (lásd 8. táblázat). Ezen kívül ezen oldószerrendszer kismértékű változtatásával teszteltük az ammónia hatását is az elúció hatékonyságára (5% (H₂O) elúciós oldószer). A kiválasztott legjobban teljesítő módszer paraméterei pedig a 12. táblázatban láthatók.

12. táblázat Kiválasztott optimált grafit alapú módszer CS diszacharidok tisztítására.
TopTip grafit + C18 oldószerrendszer Pierce állófázist alkalmazva.

	térfogat	összetétel	ismétlés
aktiválás	100 µL	0,1% FA; 80% ACN(H ₂ O)	2
kondicionálás	100 µL	100% víz	3
felvitel	50 µL	100% víz	-
újrafelvitel	-	-	-
mosás	50 µL	100% víz	-
elúció	50 µL	0,05% TFA; 40% ACN(H ₂ O)	3
centrifugálási paraméterek	2500 rpm 1min		
állófázisok	Pierce		

3.3.2.3. CS diszacharidok tisztítására fejlesztett kombinált protokoll

A kísérleti eredmények alapján ebben az esetben is kiegészítik egymást a fejlesztett vatta-HILIC és kiválasztott grafit alapú módszerek. A két módszer kombinálásával tudtam a lehető legmagasabb visszanyeréseket és legkisebb torzítást elérni (lásd 4.1.3 fejezet). A kombinált módszer során első lépésként elvégeztem a vatta-HILIC tisztítási módszert (10. táblázat), mely során külön frakcióként összegyűjttem a felviteli és mosási átesőt és külön frakcióként az elúciót. Ezt követően a második lépésben a felviteli+mosási átesőt oldószercserével után tovább tisztítottam a TopTip módszer Pierce állófázist alkalmazó kiválasztott módszerrel (12. táblázat), majd ennek elúcióját egyesíttem a vatta-HILIC módszer elúciójával. Az injektálási oldószerre történő oldószercserét követően az egyesített frakcióból történt a műszeres HPLC-MS mérés.

3.3.3. HS tisztítási módszer biológiai alkalmazhatóságának vizsgálata – HSBK, HSPIM

Sertésbélhamból (PIM) és a marhaveséből (BK) izolált HS láncok vizsgálatával teszteltem a HS diszacharidokra fejlesztett SPE módszer biológiai alkalmazhatóságát. Három emésztendő oldatot készítettem 60 ng/μL koncentrációban tartalmazva a mintákat, minden esetben 600 ng mintát felhasználva, HSBK, HSPIM és a kettő 1:1 arányú keverékéből. A három minta emésztéséhez 5 μL 10 mU/μL heparin liáz I-et, 1 μL 10 mU/μL heparin liáz II-öt, és 1 μL 10 mU/μL heparin liáz III-at kevertem össze 17 μL H₂O-el, mely enzimdattól emésztési lépésként 4 μL-t adtam a mintákhoz. Az emésztési puffer (pH = 7,5) összetétele pedig: 20 mM Tris HCl puffer, 50 mM nátrium-klorid, 4 mM-os kalcium-klorid voltak. Az emésztést két ciklusban végeztem az első 4 μL enzimdattal hozzáadása után 37°C-on inkubáltam 24 óráig, majd ismételt 4 μL enzimdattal adagolása után újabb 24 óras inkubálás következett. Végül az emésztést 80°C-os melegítéssel (5 min) állítottam le, majd az emésztett oldatot 60 ng-os mintákra osztottam szét, majd pároltam be a tisztítás elvégzéséig.

3.3.4. CS tisztítási módszer biológiai alkalmazhatóságának vizsgálata – PCa

A CS tisztítási módszer alkalmazhatóságának tesztelésre 13 db prosztatarákos mintát és azok környező normál szöveteit vizsgáltam, felületi emésztést alkalmazva. A szövetekben lévő CS láncok emésztéséhez készített vizes emésztési oldat összetétele: 20 mM Tris, 2,5 mM ammónium-acetát, 10% glicerín, 2 mU/μL kondroitináz ABC. Az enzimdattal öt ciklusban adagoltam az alábbiak szerint: 3 μL emésztőoldatot pipettáztam a felületre majd 37°C-on inkubáltam 40 percig egy ciklus során. Az emésztés során keletkező diszacharidokat 5x2 μL 0,3% ammónia oldat felcseppentésével és lepipettázásával vontam ki a felületről.

3.3.5. Kromatográfiai paraméterek

A módszerfejlesztésekhez alkalmazott készülék a Waters nanoAcquity UPLC (Milford, MA) volt. A tisztított diszacharidok mérésére 10,5 cm hosszú, 250 μm átmérőjű kapilláris nanoUHPLC kolonnát használtam, melyen 8 μL/min áramlási sebességet alkalmaztam. A mintákat tisztítás után bepároltam, majd 8 μL injektálási oldószerben (10 mM ammónium-formiát 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4) oldottam fel, amelyből 2 μL-t injektáltam.

A HS diszacharidok mérése során felhasznált eluensek: A eluens: 10 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4), B eluens: 65 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4). A mérések során alkalmazott gradiensprogram: 0,5 min 6% B eluents tartalmazó izokratikus szakasz majd 3 perc alatt 70% B-re emelés, ezután 1 perc alatt 90% B-re emelés. Ezt követően 4 percen keresztül 100% B alkalmazásával mostam a kolonnát,

majd 1,5 perc alatt a kiindulási oldószerösszetételre tért vissza ami mellett 9 percig ekvilibráltam a kolonnát.

A CS diszacharid mérése során alkalmazott eluensek: A eluens: 10 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4), B eluens: 65 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4). A beállított gradiensprogram: 6% B kezdő oldószerösszetételről 0,5 perc alatt 12% B-re emeltem, majd 4,5 perc alatt tovább emeltem 60% B-re. Végül 4 perces 100% B összetételű mosás után ekvilibráltam a kolonnát 5 percig.

3.3.6. Tömegspektrometriás paraméterek

Az alkalmazott készülék a szilárd fázisú extrakciós módszerfejlesztések során Waters Q-TOF Premier hibrid kvadrupól-repülési idő analizátoros tömegspektrométer volt, negatív ionizációs módban. Az alkalmazott ionforrás ESI volt, melyben a kapilláris feszültséget 2,5 kV-ra állítottam. A forrás hőmérséklete 80°C-re volt állítva, porlasztógázt pedig 0,5 bar nyomással alkalmaztam. A kúp feszültséget és az „extraction cone” 15 eV-ra és 5 V-ra állítottam.

A spektrumokat HS diszacharidok mérésekor 180–600 m/z tartományon, CS diszacharidok mérésekor 200–600 m/z tartományon rögzítette a készülék. A CS diszacharidok esetében izomerpárok mérésére 22 eV ütközési energiát és N₂ ütközőgázt alkalmaztam az MS/MS lépésben.

3.4. Prostatata- és emlőtumoros elváltozások vizsgálata

3.4.1. Minták kiválasztása

A prosztatatarákat (PCa-t) és jóindulatú prostata megnagyobbodást (BPH-t) összehasonlító vizsgálatokhoz egy a kutatócsoportunkban elvégzett kísérletsorozatból választottunk ki 8-8 db BPH és PCa mintát úgy, hogy a vizsgált csoportok kiegyensúlyozottak legyenek az emlőnél vizsgált csoportokkal a kétféle szövettípus összehasonlíthatósága érdekében (8/A ábra). A kiválasztás során figyelembe vett beteg adatok az életkor, patológiai grádus, valamint a tumoros sejtarány voltak. A vizsgált prostata szövetmetszeteket az Esseni Egyetemi Kórházban gyűjtötték. A vonatkozó etikai engedély kibocsátója: Esseni Egyetem Etikai Bizottság, száma: 21-9991-BO. A vizsgált szövetekhez tartozó beteg adatok az 13-14. táblázatban láthatók, részletes információk pedig a 7. fejezet Függelékek F-1, F-3. táblázatában találhatók.

A vizsgált emlő szövetmetszeteket (8/B ábra) a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben gyűjtötték. A vonatkozó etikai engedély kibocsátója: Semmelweis Egyetem Egyetemi Etikai Bizottság. A HS és CS kohort 8-8 db környező normál

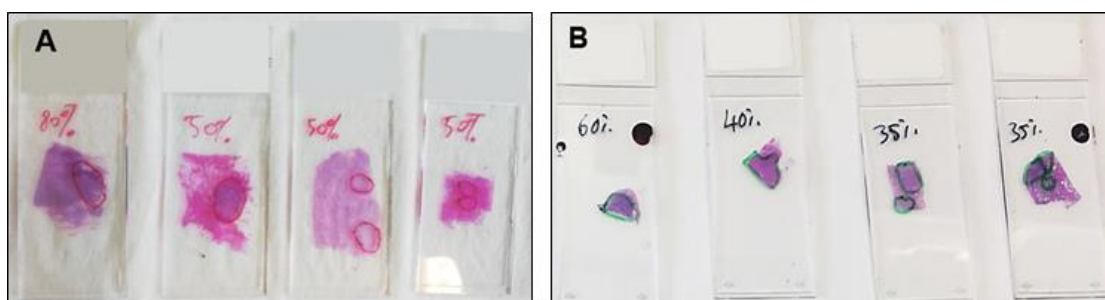
és 8-8 db emlőrákos mintából állt. A vizsgált szövetekhez tartozó betegadatok az 13-14. táblázatban láthatók, részletes információk pedig a 7. fejezet Függelék F-2, F-4 táblázatában láthatók.

13. táblázat Összesített betegadatok a HS vizsgálatsorozat során alkalmazott mintákhoz.

	BPH	PCa	ADNB	BCa
Életkor a	-	64,5 év	61 év	67,5 év
diagnóziskor		(58 év – 74 év)	(45 év – 88 év)	(60 év – 88 év)
Grádus				
Grádus 2	-	5 db	-	4 db
Grádus 3	-	3 db	-	4 db
Tumoros sejtarány	-	55%	-	55%
		(35% – 70%)		(40% – 80%)

14. táblázat Összesített betegadatok CS vizsgálatsorozat során alkalmazott mintákhoz.

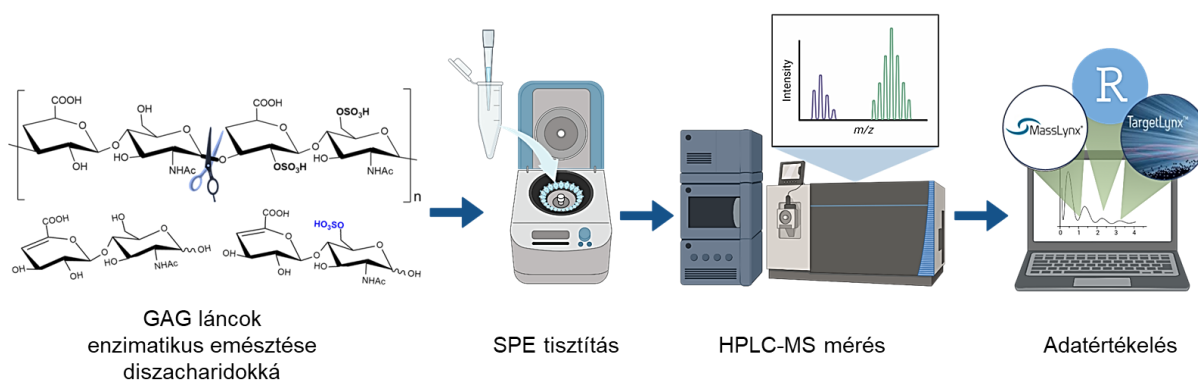
	BPH	PCa	ADNB	BCa
Életkor a	-	66 év	57 év	67,5 év
diagnóziskor		(58 év- 74 év)	(35 év-88 év)	(60 év-88 év)
Grádus				
Grádus 2	-	3 db	-	4 db
Grádus 3	-	5 db	-	4 db
Tumoros sejtarány	-	55%	-	55%
		(35%-85%)		(40%-80%)



8. ábra Hematoxillin-eozin festett emlő (A) és prosztata (B) szövetmetszetek. Piros színnel bekarikázva a BCa tumoros régiók, míg zöld színnel bekarikázva a tumoros PCa régiók láthatók.

3.4.2. Szöveti minták vizsgálati munkafolyamata

A tárgylemezekre felhelyezett szövetmetszetek úgynevezett formalin-fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) állapotban érkeztek. Mind a formalin fixálás, mind a paraffinba ágyazás a szövetek tartósítására, eltarthatóságának növelésére szolgál. A megfelelő emésztési hatékonyság eléréséhez szükséges a paraffin réteg eltávolítása és a formalin keresztkötések felbontása, hogy az enzim hozzáférhessen az emésztendő területekhez. Első lépésben eltávolítottam a kiválasztott metszetekről a paraffin réteget és ezzel együtt a szövetben lévő lipideket. Ezt egy antigén előhívási lépés követte, mely során felbontottam a fehérjék között a formalin keresztkötéseket, ezzel elősegítve a felületi emésztés hatékonyságát. A szövetek előkészítése után az enzimatis emésztés következett, mely során megfelelő enzimkeveréket a szövet felületére cseppentve a HS vagy CS láncokat diszacharid építőegységeire bontottam. A diszacharidokat tartalmazó emésztmény felületről történő kivonása után szilárd fázisú extrakcióval tisztítottam azt a zavaró biológiai mátrix és emésztési maradványok eltávolítása érdekében. Ezt követően HPLC-MS/MS mérések következtek, mely eredményeiből meghatároztam az egyes diszacharidok mennyiségét a mintákban, végül az így kapott adatokat statisztikailag elemeztem (9. ábra). Az egyes lépések részletes paramétereit a következő fejezetek során ismertetem.



9. ábra A szövetmetszetek vizsgálata során alkalmazott munkafolyamat.

3.4.3. Szövetmetszetek előkészítése az emésztési lépéshez

Első lépésben a **paraffin réteget távolítottam el**, melyhez növekvő polaritású oldószersorban történő áztatást alkalmaztam. Egy korábban publikált módszert alkalmazva a tárgylemezt xilollal, etanollal majd vízzel mostam [102]. A részletes protokoll a 15. táblázatban látható. A következő lépésben **antigén előhívást** végeztem. A folyamat során a mintákat hőkezeltam, aminek hatására felbomlottak a formalin fixálás során kialakított keresztkötések a nukleinsavak és fehérjék között. Az eljárás során, 80–85 °C hőmérsékleten 0,1 M nátrium-citrátot és 0,02 M citromsavat tartalmazó, (pH=6,0) pufferben 30 percen keresztül végeztem a minták hőkezelését.

15. táblázat *Deparaffinezéshez felhasznált oldatok inkubálási idői.*

Alkalmazott oldat	Inkubálási idő
xilol	5 perc
xilol	5 perc
100% etanol	3 perc
100% etanol	3 perc
90% etanol - 10% víz	3 perc
70% etanol - 30% víz	3 perc
10 mM ammónium-acetát vizes oldata	5 perc
100% víz	1 perc

3.4.4. Heparán-szulfát láncok szövetfelületi emésztése

Az HS láncok emésztéséhez az alábbi összetételű vizes emésztési oldatot készítettem: 20 mM Tris, 2,5 mM Ca(OH)₂, 10% glicerin, 0,5 mU/μL heparin-liáz I, 0,1 mU/μL heparin-liáz II, 0,1 mU/μL heparin-liáz III. Az enzimoldatot öt ciklusban adagoltam az alábbiak szerint: 2 μL emésztőoldatot pipettáztam a felületre, az első nap 3 ciklusban adagolva, a második nap pedig 2 ciklust elvégezve. A szöveteket az enzim újraadagolási lépések között párás légterű dobozban inkubáltam 37 °C-on. Ezt követően az első adagolási lépéstől számított 48 óra után, az emésztés során keletkező diszacharidokat 5x2 μL, 1% ammónia oldat felcseppentésével és lepipettázásával vontam ki a felületről, a 4. kivonási lépés előtt 2 perces inkubálást alkalmazva.

3.4.5. Kondroitin-szulfát láncok szövetfelületi emésztése

Az emlő szövetekben lévő CS láncok emésztéséhez készített vizes emésztési oldat összetétele: 20 mM Tris, 2,5 mM ammónium-acetát, 10% glicerin, 2 mU/μL kondroitináz ABC. Az enzimoldatot öt ciklusban adagoltam az alábbiak szerint: 2 μL emésztőoldatot pipettáztam a felületre majd 37°C-on inkubáltam 60 percig egy ciklus során. Az emésztés során keletkező diszacharidokat 5x2 μL 1% ammónia oldat felcseppentésével és lepipettázásával vontam ki a felületről.

3.4.6. A minták szilárd fázisú extrakciós tisztítása

A szövetekről kinyert, diszacharidokat tartalmazó emésztési keverék tisztítását az általam kifejlesztett kombinált módszert alkalmazó szilárd fázisú extrakcióval végeztem el. HS diszacharidok esetében lásd 3.3.1 fejezet *Módszerfejlesztés HS diszacharidok tisztítására* fejezet, CS diszacharidok esetében lásd. 3.3.2 fejezet *Módszerfejlesztés CS diszacharidok tisztítására*.

3.4.7. Kromatográfiás paraméterek

Az emlő és prosztataelváltozások HS és CS tartalmának vizsgálata során Waters Acquity I-class UPLC (Milford, MA) készüléket alkalmaztam. A mintákat tisztítás után bepároltam, majd 8 μL injektálási oldószerben (10 mM ammónium-formiát 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4) oldottam fel, amelyből 2 μL -t injektáltam.

A HS tartalom vizsgálatánál a kolonna saját töltésű, 20–30 cm hosszú, 250 μm átmérőjű kapilláris nanoUHPLC kolonna volt, melyen 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ áramlási sebességet alkalmaztam. A mérések során felhasznált eluensek: A eluens: 10 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4), B eluens: 65 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4). A mérések során alkalmazott gradiensprogram: 0,5 min 6% B izokratikus szakasz majd 1 perc alatt 100% B-re emelés, 7 perc tartás, ezután 1 perc alatt 90% B-re emelés. Ezt követően 4 percen keresztül 100% B alkalmazásával mostam a kolonnát, majd 1,5 perc alatt a kiindulási oldószerösszetételre tértem vissza ami mellett 9 percig ekvilibráltam a kolonnát.

A CS tartalom vizsgálatánál a kolonna saját töltésű, 10,5 cm hosszú, 250 μm átmérőjű kapilláris nanoUHPLC kolonna volt, melyen 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ áramlási sebességet alkalmaztam. A mérések során alkalmazott eluensek: A eluens: 10 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4), B eluens: 65 mM ammónium-formiát, 75:25 v/v ACN:víz (pH = 4,4). A beállított gradiensprogram: izokratikus 6% B eluens alkalmazása után 0,5 perc alatt 12% B-re emeltem, majd 4,5 perc alatt tovább emeltem 60% B-re. Végül 4 perces 100% B összetételű mosás után ekvilibráltam a kolonnát 5 percig.

3.4.8. Tömegspektrometriás paraméterek

Az alkalmazott készülék a szöveti minták mérése során Waters Select Series Ciklikus ionmobilitás tömegspektrométer (Milford, MA) volt. Alacsony áramlásos ESI forrást alkalmaztam, amelyben a kapilláris feszültség 1,9 kV, a kúp feszültség 20 eV, a forráshőmérséklet 120 °C volt. A HS diszacharidok esetén MS1 módban végeztem a méréseket 180–620 m/z tartományban, míg a CS diszacharidok esetében MS1 200–600 m/z tömegtartományban, valamint MS/MS módban mértem. Az egyszeresen-szulfatált izomerek (D0a4 és D0a6) mérését 32 eV-os fragmentációval végeztem a transzferben.

3.4.9. Proteoglikán vázfehérjék mennyiségének „shotgun” proteomikai elemzése

A kutatócsoportban egy párhuzamosan futó teljes proteomikai kísérletsorozat során vizsgáljuk emlőrákos és prosztatatarakos szövetek fehérjetartalmát. A szövetek triptikus emésztését és nanoUHPLC-MS mérését a kutatócsoportban optimált módszerek alkalmazásával végezték [103]. A szövetmintákban detektálható összes fehérje mennyiségi

meghatározását MaxQuant szoftver segítségével végezték el. A részletes módszerparaméterek és szoftveres beállítások a *Függelékek 7.6. fejezetében* található. A vizsgált minták megegyeztek a 3.4.1. fejezetben részletezettekkel. A **kvantifikált fehérjék listáját leszűkítettem** azon **proteoglikán vázfehérjékre**, amelyek detektálhatók voltak az összes általam vizsgált szövettípusban annak érdekében, hogy összetvethessem a HS és CS diszacharid-elemzés eredményeivel.

3.5. Mérési adatok értékelése

A GAG-omikai mérési adatok értékelése során az intenzitás értékeket a kiválasztott egyedi ion kromatogramok integrálásával végeztem el a Waters MassLynx 4.2 vezérlő szoftver QuanLynx beépített kiértékelő egységének segítségével. A vizsgált ionok és a hozzájuk tartozó m/z értékek 16. és 17. táblázatban láthatók.

Az adatok feldolgozása és ábrázolása Microsoft Excel segítségével készült. A biológiai minták értékelését R környezetben az RStudio 1.4.1106 alkalmazásával végeztem. A boxplotokat az R szoftver ggplot2 kiegészítő csomagjának segítségével ábrázoltam. A statisztikai vizsgálatok során, az adatok normalitását pedig Saphiro tesztel vizsgáltam. Az egyes szövettípus csoportok közti szignifikáns eltérések megállapítására Student- és, Welch t-teszteket valamint Wilcoxon-féle rangösszeg próbát alkalmaztam. Az alkalmazott statisztikai tesztek a 7. fejezet Függelék, F-5, F-6 táblázataiban, a p értékek a 7. fejezet Függelék F-7, F-8 táblázataiban található.

16. táblázat HS diszacharidok vizsgált m/z értékei negatív módban.

Lawrence-kód	Vizsgált ion	Vizsgált m/z
D0A0	[M-H] ⁻	378,10
D2A0	[M-H] ⁻	458,10
	[M-3H+K] ²⁻	247,50
D0A6	[M-H] ⁻	458,10
	[M-3H+K] ²⁻	247,50
D0S0	[M-H] ⁻	416,10
	[M-2H+Na] ⁻	438,10
	[M-2H] ²⁻	207,50
D2A6	[M-H] ⁻	538,05
	[M-2H+Na] ⁻	560,05
	[M-2H+K] ⁻	576,00
	[M-2H] ²⁻	268,50
D2S0	[M-H] ⁻	496,00
	[M-H-SO ₃] ⁻	416,10
	[M-2H] ²⁻	247,50
D0S6	[M-H] ⁻	496,00
	[M-H-SO ₃] ⁻	416,10
	[M-2H] ²⁻	247,50
D2S6	[M-H] ⁻	576,00
	[M-3H+K] ²⁻	306,50
	[M-3H+Na] ²⁻	298,50
	[M-2H-SO ₃] ⁻	247,50
	[M-3H] ³⁻	191,33

17. táblázat CS diszacharidok vizsgált m/z értékei negatív módban és a szulfatációs pozíciók meghatározásához alkalmazott MS/MS átmenetek.

Lawrence-kód	Vizsgált ion	Vizsgált m/z	Vizsgált MS/MS átmenet
D0a0	$[M-H]^-$	378,10	
D0a4	$[M-H]^-$	458,10	458,10 $\rightarrow$ 300,10
	$[M-3H+K]^{2-}$	247,50	
D0a6	$[M-H]^-$	458,10	458,10 $\rightarrow$ 282,10
	$[M-3H+K]^{2-}$	247,50	
D0a10	$[M-H]^-$	538,05	
	$[M-2H+Na]^-$	560,05	
	$[M-2H+K]^-$	576,00	
	$[M-2H]^{2-}$	268,50	

4. Eredmények és értékelésük

Munkám során HS és CS GAG diszacharidok tisztítására alkalmas szilárd fázisú extrakciós módszerek fejlesztésével foglalkoztam. A módszerfejlesztés első részében kereskedelmi vatta, mint HILIC típusú módszer alkalmazhatóságát teszteltem. A felhasznált pipettahegyeket saját magam töltöttem meg a kereskedelmi vattával, valamint részletesen feltérképeztem a különböző alkalmazandó paraméterek hatásait, mint az állófázis összetétele, mennyisége, valamint a felhasznált oldószerek mennyisége és összetétele. A módszerfejlesztés második részében három különböző kereskedelmi forgalomban kapható grafitalapú SPE rendszer részletes összehasonlítását valósítottam meg. Ezután a fejlesztett módszerekkel karakterizáltam és összehasonlítottam prosztata- és emlő- tumoros szövetek HS és CS tartalmát.

4.1. Szilárd fázisú extrakciós tisztítási módszer fejlesztése heparán-szulfát diszacharidokra

A fejlesztési kísérletek során standard HS diszacharid keveréket alkalmaztam (kivétel a biológiai eredetű minták) mérendő mintaként, amely minden diszacharidot 10 pmol mennyiségben tartalmazott. Az átlagos visszanyeréseket azonos összetételű tisztítatlan minták mérési eredményeihez viszonyítva számítottam. A tisztítási kísérleteket beállításonként több párhuzamos (általában négy darab) minta mérésével végeztem melyek eredményeiből szórás számoltam.

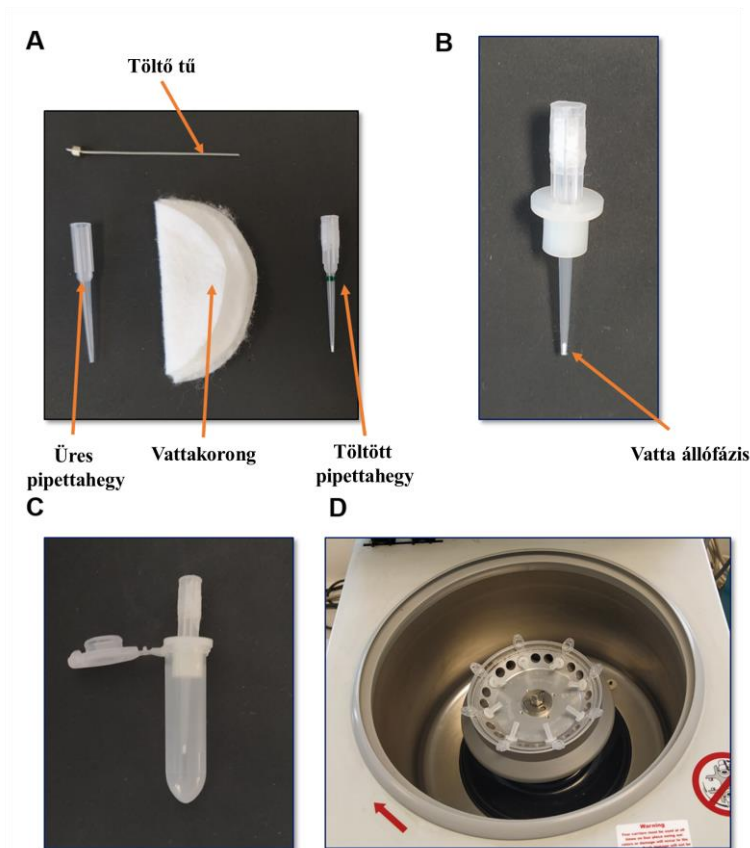
4.1.1. Vatta-HILIC módszerfejlesztés

A vatta-HILIC módszerfejlesztés során célom volt a lehető legmagasabb visszanyerésű és lehető legkisebb torzítású módszer megalkotása. Kezdeti oldószerszisztemként egy egyszerű hangyasavtartalmú rendszert vettem alapul (2. táblázat), majd számos paraméter hatását vizsgáltam az egyes lépések optimalása érdekében. Az állófázis esetében teszteltem többféle márkájú és mennyiségű vatta töltetet, valamint vizsgáltam az egyes lépéseknél alkalmazott oldószerek térfogatát, összetételét és hőmérsékletét, valamint kiegészítő lépések alkalmazását is.

4.1.1.1. Töltési folyamat és alkalmazhatósági teszt

Kereskedelmi forgalomban kapható 100% pamut tartalmú vattát töltöttem 10 µL-es pipettahegyekbe 2–3 mm-es magasságban. A töltés során az üres pipettahegyet kimeneti nyílásával lefelé, sík felületre támasztottam, majd egy megfelelően vastag tű segítségével sikerült a vattát beletöltenem. A tűnek elég vastagnak kellett lenni ahhoz, hogy tömörítő hatást tudjak kifejteni vele, azonban ahhoz elég vékonynak, hogy beleférjen a szűk pipettahegy végébe. Ezután enyhe nyomást kifejtve, tömörítések között a pipettahegyet forgatva végeztem a vatta töltését. A megtöltött pipettahegyeket ezután egy erre kialakított tartóegység

segítségével 2 mL-es Eppendorf csőbe helyeztem. Az így elkészített összeállítás már alkalmas volt a centrifugális SPE rendszerben való alkalmazásra. A töltéshez és centrifugáláshoz felhasznált anyagok a 10. ábrán láthatók.



10. ábra A vattatöltéshez és centrifugáláshoz felhasznált anyagok (A) és a kísérleti elrendezés (B-D).

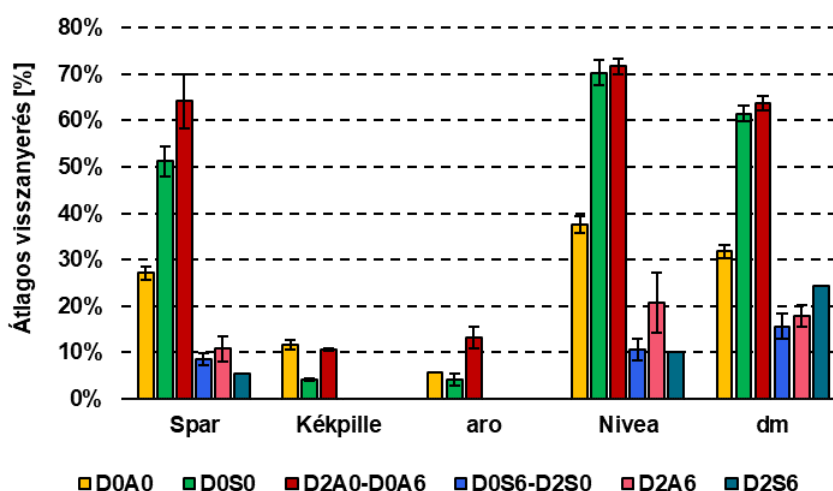
A vatta, mint SPE állófázis, alkalmazhatóságának tesztelésére egy előkísérletet végeztem (2. táblázat). Ennek során azt vizsgáltam, hogy a vatta a pipettahegyben marad-e tartóréteg (ún. frit) alkalmazása nélkül a minta-előkészítés centrifugálási lépései során. Emelett biztosítania kellett használt oldatok átengedését, valamint a diszacharidok állófázison való megkötődését, majd eluálhatóságát. A minta-előkészítés alatt a centrifugálási lépések végrehajtását követően is helyén maradt a töltet a vatta szálak szerkezetének köszönhetően. A felviteli-mosási egyesített és az elúciós frakciókban egyaránt mérhetőek voltak HS diszacharidok, az elúcióban nagyobb intenzitást mérve. Ezek alapján alkalmasnak ítéltam a vattát HS diszacharidok tisztítására alkalmazott SPE állófázisnak, és módszerfejlesztésbe kezdtem.

4.1.1.2. Az állófázis anyagának és mennyiségének kiválasztása

A módszerfejlesztés első lépéseként eltérő márkájú és összetételű vatták alkalmazhatóságát vizsgáltam. Öt különböző gyártó által előállított vattát teszteltem, amelyek közül négy 100% pamut tartalmú (Spar, Kék pille, Nivea, dm), egy pedig 60% pamut, 40%

viszkóz tartalmú (aro) volt. Mind a négy esetben 2–3 mm-es magasságban töltöttem a vattát 10 μ L-es pipettahegyekbe, majd elvégeztem az 1. kísérletsorozatot (4. táblázat) alapján a tisztítást.

A dm márkás vatta alkalmazásával magas visszanyerést értem el a többi beállításhoz képest alacsonyabb szórás mellett, így ezt választottam alkalmazandó állófázisnak (11. ábra). Mindemellett, a Spar és Nivea márkás vattákkal egyaránt sikerült dm vattához hasonló nagyságú visszanyeréseket elérni, így a Kék pille kivételével a 100% pamutot tartalmazó vattákkal jelentősen magasabb visszanyerések voltak elérhetők, mint a viszkózt is tartalmazó aro márkájú esetében. Ez alapján megállapítható, hogy bár felfedezhetők különbségek az eltérő gyártástechnikájú vatták között, azonban a vatta összetétele meghatározóbb a visszanyerések tekintetében. Megállapítottam továbbá, hogy a kezdeti módszer leginkább a kevésbé hidrofíll, nem-szulfatált (D0A0) és egyszeresen szulfatált (D0S0, D2A0-D0A6) diszacharidok tisztítására alkalmas, ahol 30–60%-os visszanyerések voltak elérhetők. A hidrofílebb kétszeresen és háromszorosan szulfatált diszacharidok esetében alacsonyabb visszanyerések voltak tapasztalhatók (~20%).

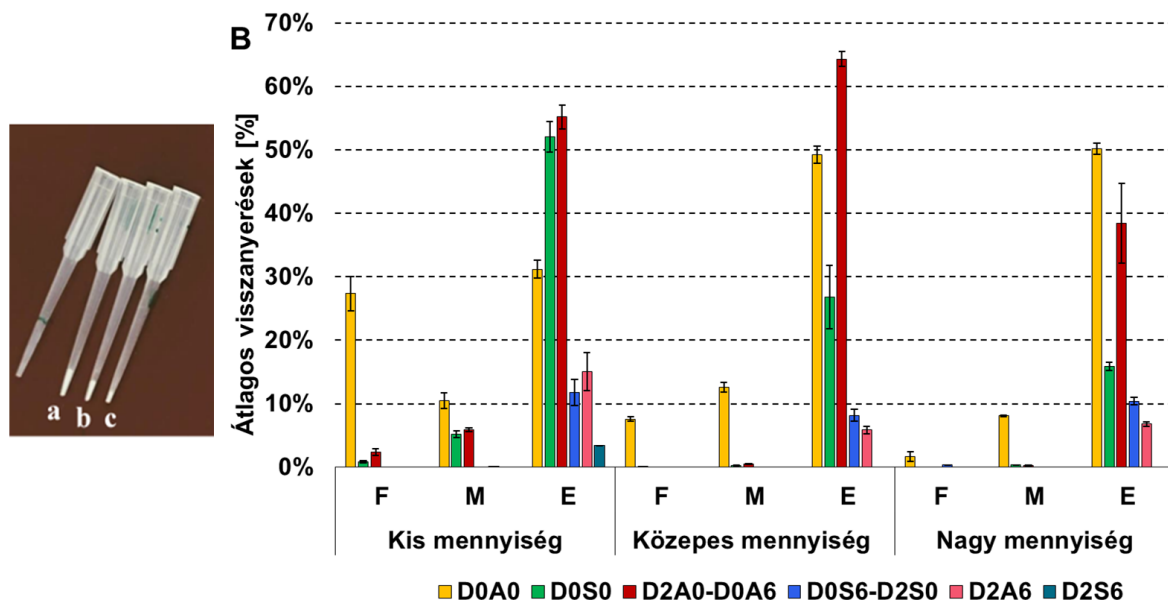


11. ábra Különböző gyártójú vatta alkalmazásával egyes HS diszacharidokra nyert átlagos visszanyerések. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

A következő lépésként a vatta mennyiségének hatását vizsgáltam három beállítás mellett (4. táblázat): kis (az előkísérletben használt 2–3 mm-es magasságban töltött), közepes (~3x a kis mennyiség), nagy (~10x a kis mennyiség) (12/A ábra).

Az elúció visszanyerési értékei csökkenő tendenciát mutattak a növekvő vatta tartalommal, míg a felviteli és mosási fázisnál pont ennek ellentéte volt látható (12/B ábra). Ez azzal magyarázható, hogy az állófázis mennyiségét megnövelve megnőtt az interakcióra alkalmas kötőhelyek száma és ezáltal nehezebben eluálhatóak a diszacharidok. Kisebb vattamennyiség alkalmazásával a kötőhelyek mennyisége is csökken, így a mintában található molekulák nagyobb részhányada esett át az állófázison. A legmagasabb visszanyeréseket így a

kis mennyiségű állófázist tartalmazó összeállítással sikerült elérni, mely paramétert rögzítettem a módszerben. Továbbá, ebben az esetben is megjelenik az előzőekben tapasztalt mintázat, miszerint a kevésbé hidrophil diszacharidok visszanyerései jelentősen magasabbak a hidrophilebb diszacharidokéhoz képest, azonban egy részük átesik a felviteli és mosási lépések során. A többszörösen szulfatált diszacharidok jelentős része pedig nem eluálódott az állófázisról.



12. ábra A: Kereskedelmi vatta pipettahegyekbe töltve a vizsgált három különböző mennyiségben a) nagy, b) közepes, c) kicsi, **B:** Különböző mennyiségű vatta alkalmazásával az egyes HS diszacharidokra nyert átlagos visszanyerések. (F: felviteli áteső, M: mosási áteső, E: elúció átlagos visszanyerései). A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.1.1.3. Oldószertérfogatok optimalálása

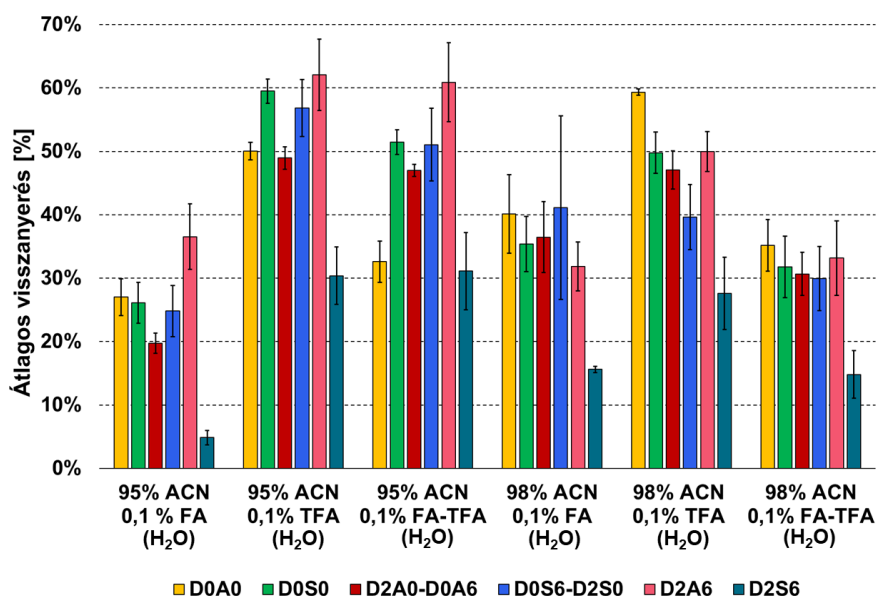
Ezt követően a felviteli, mosási és elúciós lépések térfogatának optimalálását végeztem el. A kísérleti pontokat Box-Behnken kísérlettervnek megfelelően választottam meg (7. fejezet Függelék F-9 táblázat). Három térfogati beállítás mellett (10 μ L, 30 μ L, 50 μ L) vizsgáltam a módszerek teljesítőképességét a felviteli, mosási és elúciós oldószerek térfogatát változtatva. Megállapítottam, hogy 10 μ L felviteli oldószer alkalmazása mellett alacsonyabbak a visszanyerések a többi esethez képest, azonban összességében az egyes lépésekben alkalmazott oldószertérfogatok nagyságának nem volt meghatározó szerepe a visszanyerésekre, így a kísérletterv részletes értékelését nem végeztem el (7. fejezet Függelék F-2 ábra). A legmagasabb visszanyeréseket 30 μ L felviteli, 50 μ L mosási és 10 μ L elúciós oldószertérfogatok alkalmazásával értem el, így ezt a beállítást rögzítettem (4. táblázat).

4.1.1.4. Felviteli oldószer összetételének optimalizálása

Savminőség és acetonitril tartalom vizsgálata

A módszerfejlesztést a felviteli lépés összetételének optimalizálásával folytattam, amely során első lépésként hangyasav, ecetsav és 1:1 arányú keverékük (minden esetben 0,1%-os savtartalom), valamint 95% és 98% acetonitril tartalom hatását vizsgáltam a visszanyerésekre. A savak sőt képeznek a diszacharidok bizonyos mértékű protonálásával (4. táblázat). Ideális esetben elérhető a diszacharidok azonos protonáltsági szintje az oldatban, ami kiküszöböli az esetleges retenciós mechanizmusbeli különbségeket így egyszerűsítve a módszerfejlesztést. A HILIC hatásmechanizmus esetében a diszacharidok megoszlása az állófázis és egy vékony vízréteg, valamint a szerves mozgó fázis között megy végbe, így a felviteli oldószerek ebben az esetben alacsony víztartalmúak és magas ACN tartalmúak (gyenge eluens).

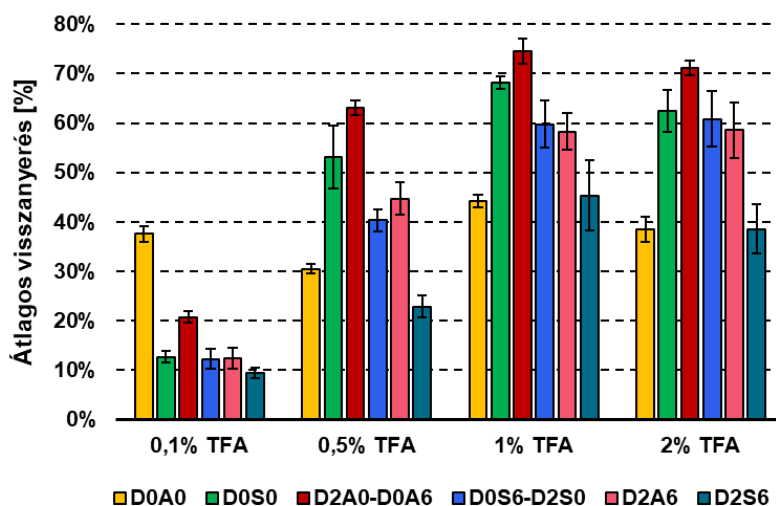
A kísérleteket elvégezve a 13. ábrán látható visszanyerések voltak mérhetőek az elúciós frakciókban, amelyek közül a legmagasabb visszanyeréseket 95% ACN tartalom és TFA alkalmazásával értem el. Látható, hogy 95% és 98% ACN tartalom alkalmazása során egyaránt TFA alkalmazásával voltak elérhetőek a legmagasabb visszanyerések szinte minden HS diszacharid esetén. Magas visszanyerést tapasztaltam még a 95% ACN és FA-TFA 1:1 arányú keverékének alkalmazásával. Mivel azonban a 95% ACN tartalmú minták nem különülnek el egyértelműen a 98%-os tartalmúaktól, arra következtethettem, hogy a sav hatása nagyobb mértékben befolyásolja a mechanizmust mint az oldószer hatása. A továbbiakban a TFA-t tartalmazó 95% ACN felviteli oldószert rögzítettem a módszerben.



13. ábra Különböző ACN tartalmú és különböző savminőségű felviteli oldószerek alkalmazásával az egyes HS diszachardiokra nyert átlagos visszanyerések. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

Az előző kísérletsorozatból kiválasztott TFA koncentrációjának vizsgálatával folytattam a kísérleteinket. Négyféle savkoncentráció mellett teszteltem a TFA mennyiség hatását a visszanyerésekre: 0,1%, 0,5%, 1% 2% (5. táblázat). Megállapítottam, hogy a savkoncentráció függvényében egy maximumos görbét ír le minden HS diszacharid visszanyerése (14. ábra). 1% TFA koncentráció alkalmazása mellett mértem a legmagasabb visszanyeréseket, ennél kisebb és nagyobb koncentrációk esetén is alacsonyabb visszanyerések voltak tapasztalhatók. Mivel az 1% TFA alkalmazása bizonyult a legjobb módszernek, így 1%-ban rögzítettem a TFA koncentrációt (14. ábra).

Érdemes kiemelni még, hogy az előző méréssorozathoz képest ebben az esetben jóval alacsonyabb visszanyerések voltak tapasztalhatók 0,1% TFA tartalom felhasználásával. Ez azt mutatja, hogy ilyen alacsony koncentrációt alkalmazva nem jó a módszer ismételhetősége. Az 1% TFA esetében azonban további kísérleteink során nem jelentkezett ez az ismételhetőségbeli probléma.



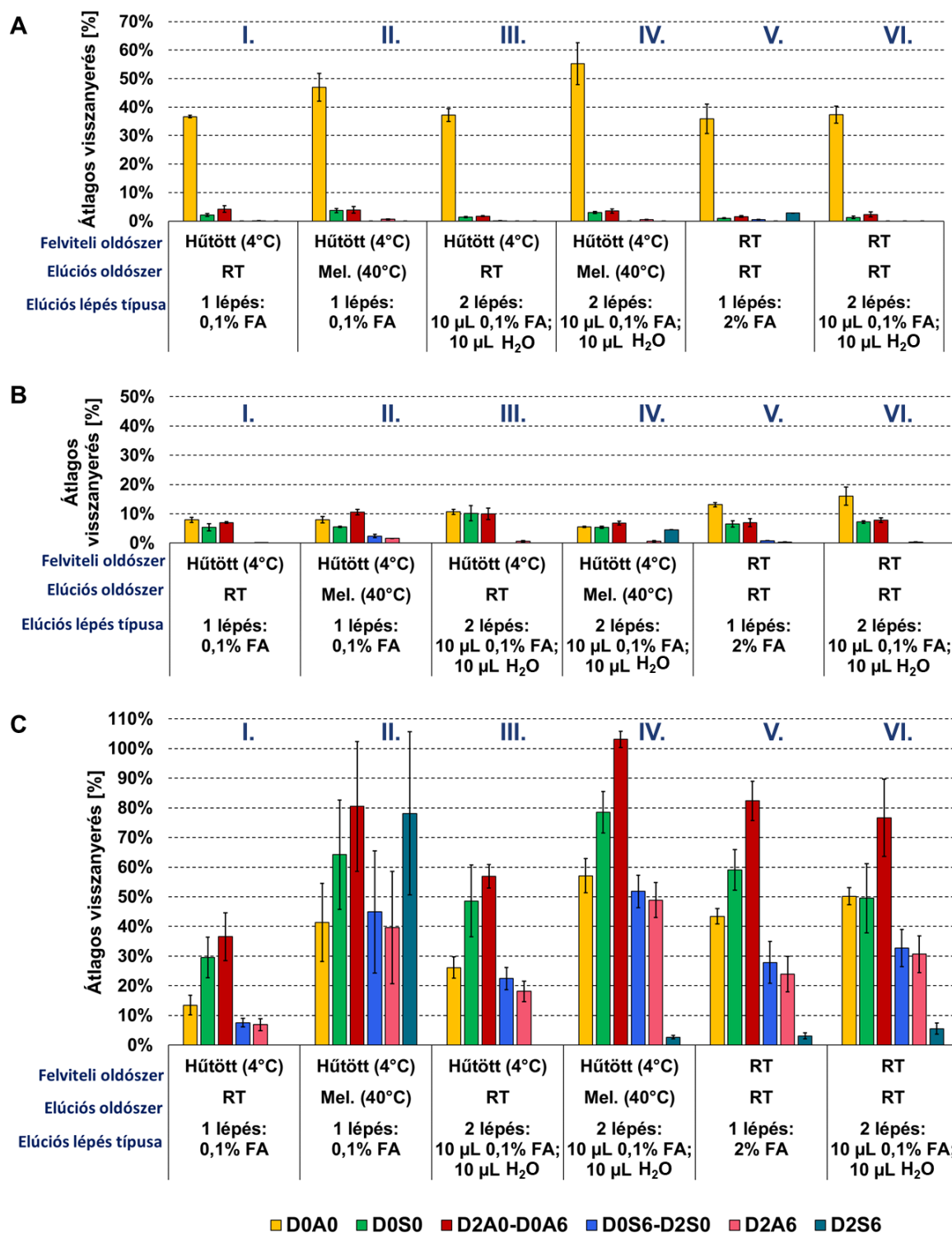
14. ábra Különböző TFA tartalmú felviteli oldószerek alkalmazásával az egyes HS diszacharidokra nyert átlagos visszanyerések. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.1.1.5. Hűtés és melegítés hatása a felvitel és elúció során, többlépéses elúció vizsgálata

Vizsgáltam a hőmérséklet hatását is a felviteli és elúciós lépésekre (5. táblázat). A felviteli oldószert hűtőszekrényben tárolva hűtöttem egészen felhasználásig, mivel korábbi a kutatócsoportban végzett kísérletek alapján a hűtés elősegítheti a molekulák megkötődését a felviteli lépésben [104]. Az elúció elősegítése érdekében pedig 40°C-on termosztáltam az oldószereket szintén felhasználásig, valamint egy második elúciós lépés hatását is vizsgáltam. Ezen paramétereket különböző kombinációkban egyesítettem, és a következtetéseket az egyes módszerek közti különbségek alapján vontam le.

A hűtésnek negatív, míg a melegítésnek és a második elúciós lépésnek pozitív hatása volt a visszanyerésekre. Ez jól megfigyelhető a I. és II. módszer összehasonlításával

(15/C ábra), ugyanis a két módszer annyiban különbözik egymástól, hogy a II. módszernél alkalmaztam melegítést az elúciós lépésnél, míg az I-es módszernél szobahőmérsékleten tároltam az oldószereket. A visszanyerések jól láthatóan a II. módszernél magasabbak voltak a többi módszernél tapasztaltakhoz képest.



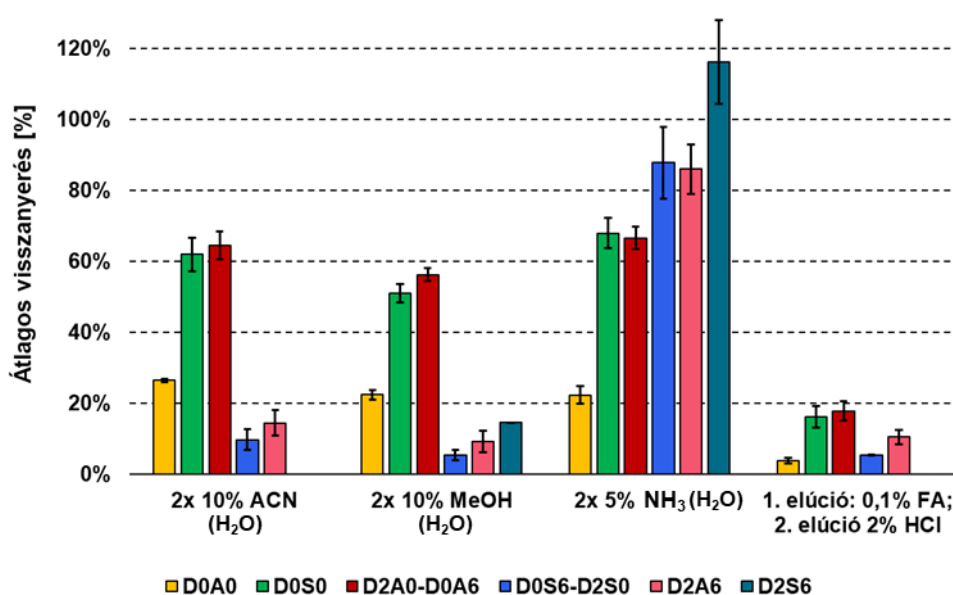
15. ábra A hőmérséklet variálás és különböző elúciós lépésekkel nyert átlagos visszanyerések az egyes diszacharidok esetében, **A:** felviteli frakciók, **B:** mosási frakciók, **C:** elúciós frakciók. (RT: szobahőmérséklet). A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

A második elúció hatása pedig jól szemléltethető a I. és III. módszer összehasonlításával, ahol is a III. módszernél nagyobb visszanyerések láthatók az I.-höz képest, amelynél nem alkalmaztam második elúciós lépést (ugyanaz a jelenség megfigyelhető a II. és IV. módszer összehasonlításával). A III. módszernél pedig a hűtés negatív hatása figyelhető meg a VI. módszerrel összehasonlítva, hiszen ugyancsak jeletősen alacsonyabb visszanyerések voltak elérhetők az első, hűtést is alkalmazó esetben. A fentiek figyelembevételével az elúciós oldószer 40°C-ra való termosztálását és a második elúciós lépés elvégzését rögzítettem a módszerben. Ez a két paraméter hozzájárult a diszacharidok hatékonyabb eluálásához, míg a hűtés ezzel ellentétes hatást fejtett ki.

4.1.1.6. Elúciós oldószerösszetétel vizsgálata

A módszerfejlesztés utolsó lépéseként többféle polaritású és kémhatású oldatot vizsgáltam az elúciós lépés hatékonyságának növelése érdekében (5. táblázat). Teszteltem acetonitril, metanol, ammónia és hangyasav-sósav keverék hatását (16. ábra). Az 5% ammóniatartalmú elúció kimagaslott a többi beállítással kapott visszanyerések közül, mely beállítást rögzítettem is a módszerben. A jelenség magyarázható azzal, hogy a bázikus oldószer növeli a GAG diszachridok vízdoldhatóságát és ezáltal elősegíti azok elúcióját. Ez a folyamat érvényesül a felületi emésztést követő ammóniás kivonás során is, ahol a szintén megnövekedett vízdoldhatóságnak köszönhetően nagyobb hatékonysággal lehet a megemésztett diszacharidokat a felületről eltávolítani.

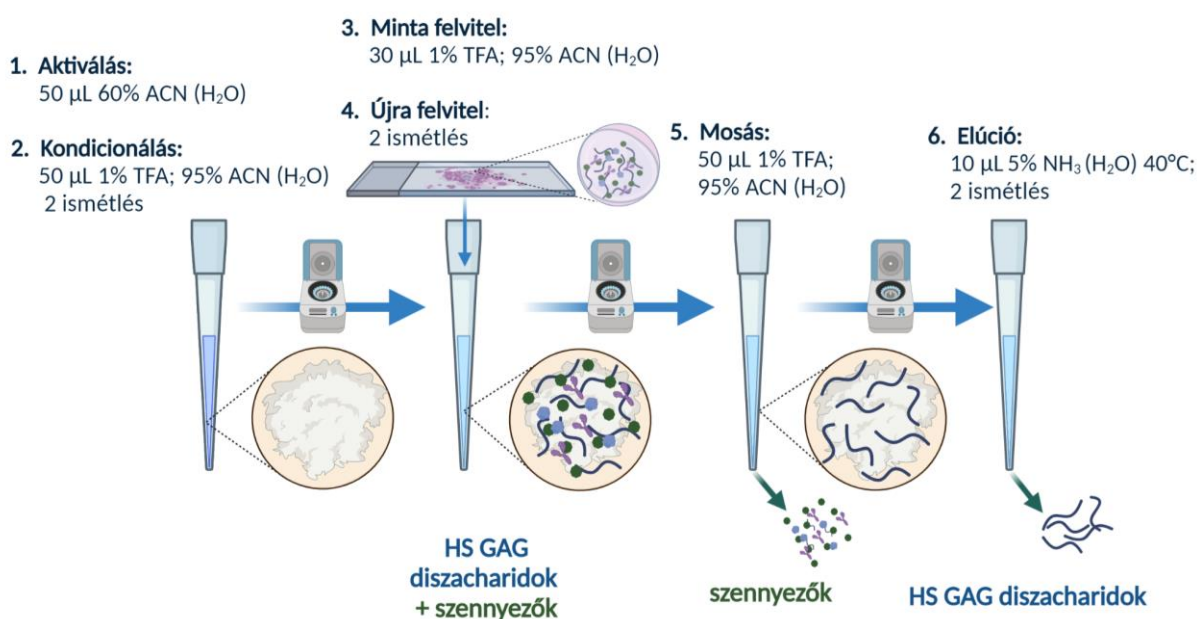
Megállapítható továbbá, hogy a kevésbé hidrofíl karakterű diszacharidok egy része nem kötődik meg megfelelő mértékben és átesik a felviteli és mosási lépésnél, a hidrofílebb karakterű diszacharidok azonban jól megkötődnek és eluálhatóak.



16. ábra Különböző elúciós összetételek alkalmazásával elért átlagos visszanyerések az egyes HS diszacharidok esetében. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.1.1.7. Összefoglalás

A vatta-HILIC módszerfejlesztés eredményeül megalkottam egy saját töltésű állófázist tartalmazó SPE módszert (17. ábra), mely alkalmas HS diszacharidok tisztítására (3. táblázat). A módszer során azonban a kevésbé poláris nem-szulfatált (D0A0), és egyszeresen szulfatált diszacharidok (D0S0 és D2A0-D0A6) 75%-a, illetve kb 25%-a átesik a felviteli és mosási lépéseknél, így a módszer a jóval polárisabb kétszeresen szulfatált (D0S6-D2S0, D2A6) és háromszorosan szulfatált (D2S6) diszacharidok tisztítására alkalmasabbnak bizonyult.



17. ábra Az optimált Vatta-HILIC SPE tisztítási módszer folyamata.

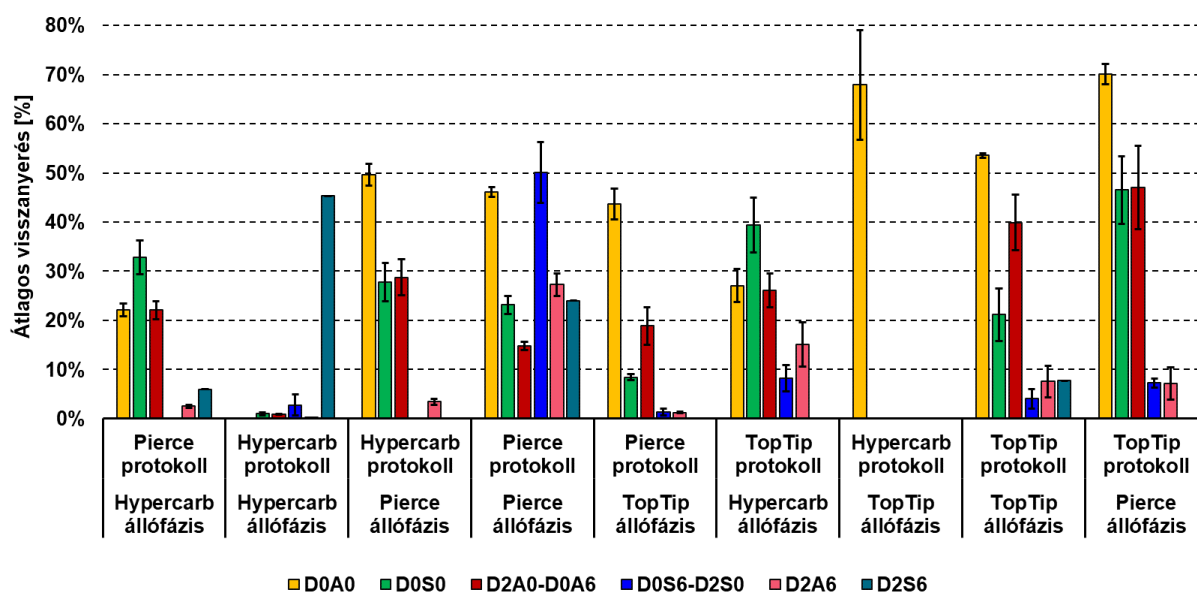
4.1.2. Grafitalapú módszerek fejlesztése

Grafitalapú állófázisok alkalmazása előnyös lehet számos kedvező tulajdonsága alapján, mint például porózus szerkezetükből adódó nagy fajlagos felületük, valamint széles pH és nyomástartományon való alkalmazhatóságuk. Munkám során teszteltem három különböző kereskedelmi forgalomban kapható grafitalapú SPE állófázist: Pierce, TopTip grafit+C₁₈ és Hypersep Hypercarb (6-8. táblázat). A kísérleteket a gyártók által ajánlott protokollok és a három állófázis összes lehetséges kombinálásával végeztem el (9 beállítás). Így kívántam tesztelni a különböző gyártók által grafitalapú állófázisaikra fejlesztett módszerek és az állófázisok kialakításának egymásra gyakorolt hatását.

Általánosan elmondható, hogy grafitalapú állófázisok alkalmazásával a kevésbé hidrofíl karakterű diszacharidok visszanyerése a nagyobb, és ezek között is a legnagyobb visszanyeréseket a TopTip oldószeres módszer Pierce állófázison való alkalmazásával értem el (18. ábra). Emellett megfigyelhető, hogy a TopTip protokollt alkalmazva mindhárom állófázissal megfelelő visszanyerések voltak elérhetők, valamint a Pierce állófázis is jól teljesített mindhárom protokollal kombinálva. A módszerek közül a Hypercarb

oldószerrendszer alkalmazása nyújtotta a leggyengébb teljesítményt. Érdekes eredmény, hogy TopTip állófázissal alkalmazva egyedül az apolárisabb karakterű, nem-szulfatált (D0A0) diszacharid esetében értem el magas visszanyerést, míg Hypercarb állófázis esetén csak a poláris háromszorosan szulfatált (D2S6) diszacharidnak volt magas visszanyerése (18. ábra).

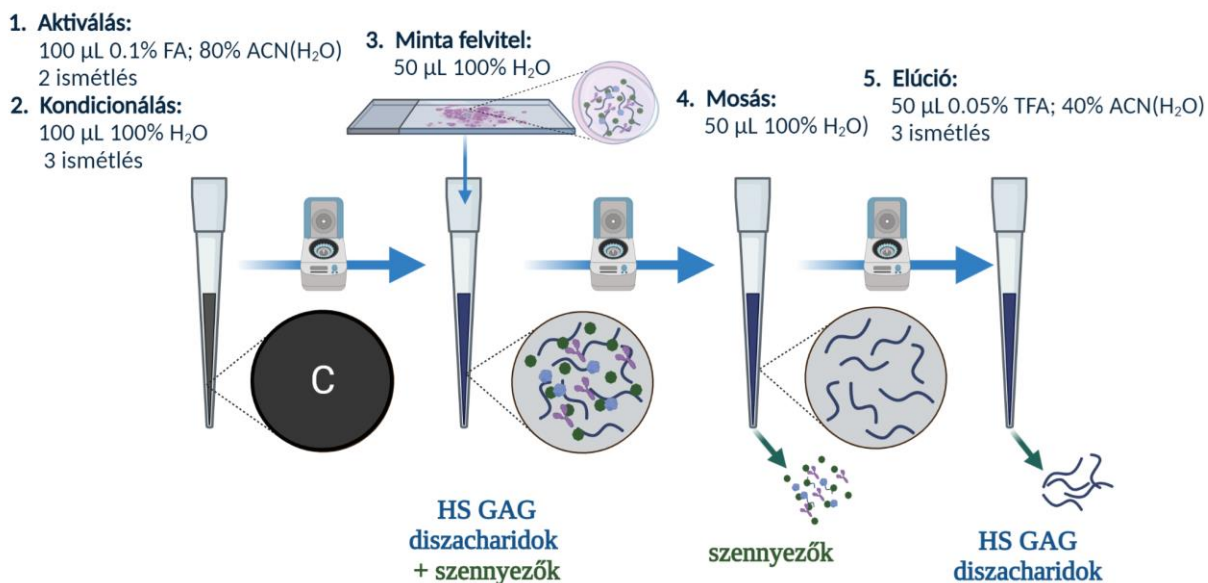
A polárisabb GAG diszacharidok, azaz a kétszeresen szulfatált (D2A6 és D2S0-D0S6) és háromszorosan szulfatáltak (D2S6) visszanyerése azonban jelentősen alacsonyabb (~10%), visszanyerést mutat, valamint ezek a diszacharidok nem voltak detektálhatók a felviteli-mosási frakcióban, tehát nem tudtam megfelelően eluálni őket az állófázisról. A porózus grafit megkötődési mechanizmusai bonyolultak és még nem teljes mértékben megértettek. Bár a felülete apoláris grafitból áll, azonban több kísérleti eredmény azt mutatta, hogy retenciós mechanizmusa mégis eltérő a fordított fázishoz képest. Az apoláris molekulák diszperziós kötése mellett poláris, például savas karakterű molekulák is erős kölcsönhatásba tudnak lépni a grafit nagymértékű polarizálhatósága miatt. Ezen kívül π -elektronjaival, poláris elektrópár donor és akceptor kölcsönhatásokat képesek kialakítani, ezzel permanensen kötődve az állófázishoz [65,73,74].



18. ábra Három kereskedelmi forgalomban kapható grafit alapú SPE állófázis és a gyártói protokollok kombinációjából adódó 9 módszer alkalmazásával nyert visszanyerések az egyes HS diszacharidok esetében. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

Ez a jelenség pont ellentétes a vatta-HILIC módszernél tapasztaltakkal, mivel amíg a vattával a hidrofilebb kétszeresen D2A6 és D2S0-D0S6 és háromszorosan szulfatált D2S6 diszacharidokra értem el nagyobb visszanyeréseket, addig a grafit alapú módszerek a D0A0 és D0S0, D2A0 diszacharidok tisztítására alkalmasabbak. Ezek alapján, a lehető legmagasabb visszanyerések és legkisebb mértékű torzítás érdekében a két módszer kombinálására lenne szükség, amit a későbbiekben meg is valósítottam.

Összefoglalva a különböző grafitalapú állófázisok tesztelésnek eredményeül kiválasztottam a TopTip oldószerrendszert Pierce állófázist alkalmazó módszert (19. ábra), mely a kevésbé poláris HS diszacharidok tisztítására alkalmazható (9. táblázat). A nem- és egyszeresen szulfatált HS diszacharidok visszanyerése jelentősen magasabb a kétszeresen és háromszorosan szulfatált HS diszacharidokéhoz képest, mely polárisabb diszacharidokat nem tudtam elégségesen eluálni az állófázisról.



19. ábra Az optimált grafitalapú SPE módszer folyamata.

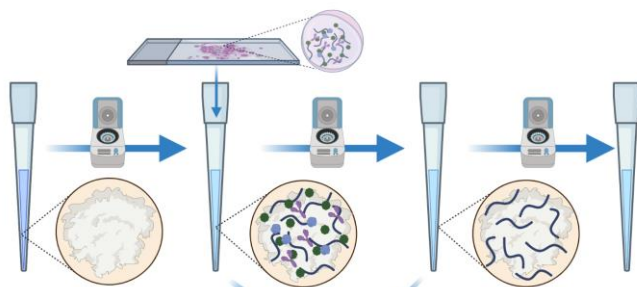
4.1.3. Kétlépéses kombinált módszer fejlesztése vatta-HILIC és grafitalapú állófázisok alkalmazásával

4.1.3.1. Kombinált módszer tesztelése: standard HS diszacharid keverék vizsgálata

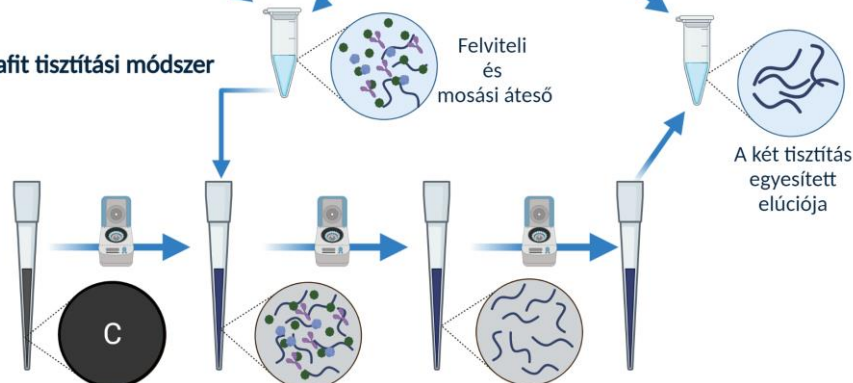
A vatta-HILIC és grafitalapú módszerek fejlesztéseinek eredményeként arra a következtetésre jutottam, hogy a két módszer kiegészíti egymást, így a legjobb eredmény elérése érdekében kombináltam a két módszert (20. ábra).

A tisztítás első része során elvégeztem a vatta-HILIC optimált módszert (3. táblázat), külön frakcióként gyűjtve a felviteli és mosási lépés együttes átesőjét valamint az eluátumot. Ezután mindkét frakciót bepároltam, majd a felvitel + mosási áteső frakciót tovább tisztítottam az optimális grafitalapú protokoll alapján. (9. táblázat). Ezek után egyesítettem a grafitalapú és vattás módszer elúcióját, amit oldószercsere utáni mérés követett.

1. lépés: vatta-HILIC tisztítási módszer

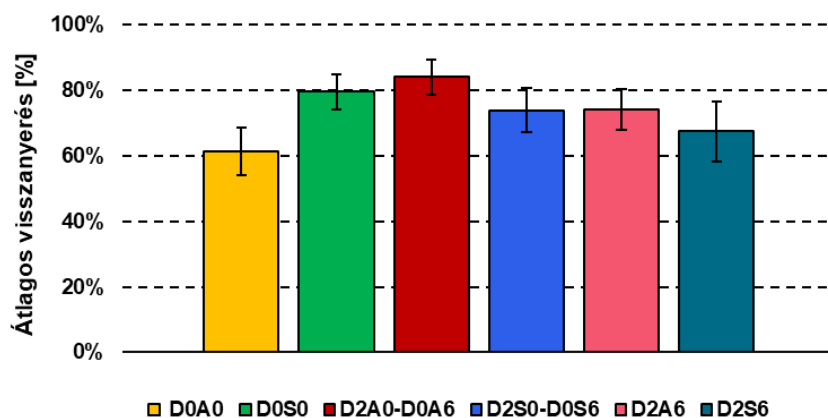


2. lépés: grafit tisztítási módszer



20. ábra A kombinált tisztítási módszer folyamata.

A fejlesztett kombinált módszerrel sikeresen értem el 60% feletti visszanyerést minden HS diszacharid esetében (21. ábra). Ez az érték alacsonynak tűnhet például egy preparatív munka során kapott visszanyerés értékhez képest, azonban ez az eredmény ebben az esetben megfelelő, ugyanis korábbi kísérletek alapján a bepárlási lépések egyenként 10–20%-os veszteséget okozhatnak [105]. Mivel a kombinált módszer két bepárlást is tartalmaz, ennél jelentősen nagyobb visszanyeréseket nem lennék képesek elérni. Mindezentúl, a HS diszacharidok visszanyerési értékeiben nem tapasztalható nagymértékű eltérés, így a módszer szulfatációs mintázatbeli torzítása nem jelentős.

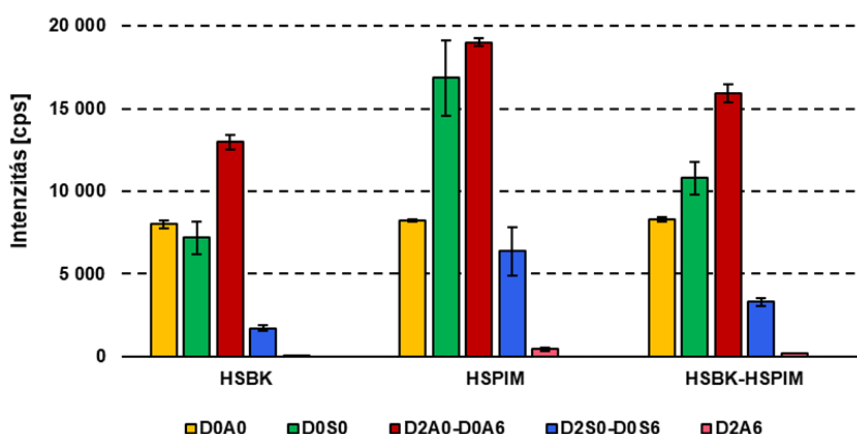


21. ábra A kombinált módszerrel nyert átlagos visszanyerések az egyes HS diszacharidok esetében. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.1.3.2. Kombinált módszer tesztelése biológiai mintákon – HSBK, HSPIM

A kombinált módszer biológiai alkalmazhatóságának tesztelése érdekében kereskedelmi forgalomban kapható, sertés bélhából és marhaveséből izolált HS láncok, valamint a kettő 1:1 arányú keverékének emésztményét vizsgáltam a kombinált tisztítási módszer végrehajtását követően (22. ábra).

Az HSPIM-ben található diszacharidok mennyisége összességében magasabbnak bizonyult a HSBK-hez képest. Ezen kívül mintázatbeli különbségek és hasonlóságok is megfigyelhetők a két minta között, például az egyszeresen szulfatált D2A0-D0A6 vagy D0S0 aránya nem-szulfatált D0A0-hoz viszonyítva nagyobb a sertésbélhából izolált mintában mint a marhaveséből származóéban. A két egyszeresen szulfatált diszcharid intenzitásában is megfigyelhetők eltérések, mivel amíg a HSBK esetében a D2A0-D0A6 intenzitása közel kétszerese a D0S0-énak, addig a HSPIM-nél a két diszacharid intenzitásában csupán kis különbség figyelhető meg.



22. ábra A HS kombinált módszer biológiai alkalmazhatósága marhaveséből (HSBK) és sertés bélhából (HSPIM) izolált HS láncok vizsgálatával. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

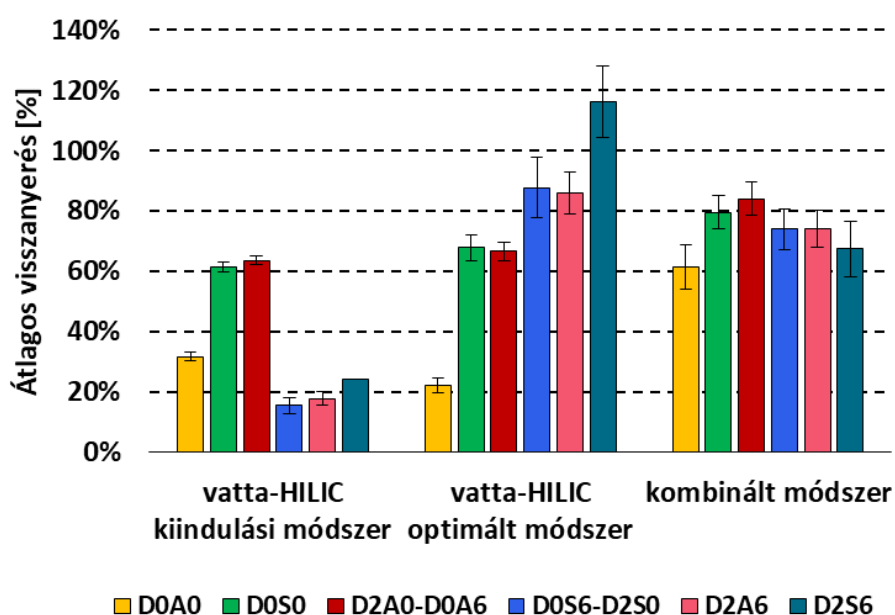
Hasonlóság, hogy mindkét eredetű mintánál megfigyelhető a D2A6 kis mennyisége. A módszer alkalmazhatóságát igazolja az is, hogy a kétféle eredetű minta esetén az összes HS diszacharid intenzitása az elvárásoknak megfelelően az egyedi mérési eredmények közé esik. A háromszorosan szulfatált diszacharid mennyisége mindkét esetben kimutatási határ alatt volt. A fentebb részletezett tulajdonságokat figyelembe véve alkalmasnak ítélem a módszert biológiai minták vizsgálatára.

4.1.3.3. Összefoglalás

Összefoglalva, sikeresen fejlesztettem ki egy kombinált módszert kis mennyiségű, biológiai mintákból kinyert HS diszacharidok tisztítására. A módszerfejlesztés során megalkottam egy saját töltésű, vatta állófázist alkalmazó HILIC típusú tisztítási módszert, valamint három grafitalapú állófázisú SPE módszert kombinálva és összehasonlítva,

kiválasztottam a közülük legjobban teljesítőt. A két, egymást kiegészítő módszer kombinálásával sikerült magas (60–80%) visszanyerésű és alacsony torzítású tisztítási módszert megalkotni, mely alkalmasnak bizonyult biológiai minták tisztítására.

A 23. ábrán a kiindulási és optimált HS vatta-HILIC módszert hasonlítottam össze a HS kombinált módszerrel. Jól látható, hogy a vatta-HILIC fejlesztés végére jelentősen megnöveltem a polárisabb kétszeresen (D0S6-D2S0, D2A6) és háromszorosan (D2S6) szulfatált diszacharidok visszanyeréseit, amelyek kismértékben lecsökkentek a kombinált módszer alkalmazásával, azonban sikerült ezzel együtt jelentősen jobb torzítatlanságot elérnem, ami elengedhetetlen a pontos mennyiségi értékelésekhez.



23. ábra A kiindulási és optimált vatta-HILIC módszerekkel és a kombinált módszerrel elért átlagos visszanyerések az egyes HS diszacharidokra. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.2. Szilárd fázisú extrakciós tisztítási módszer fejlesztése kondroitin-szulfát diszacharidokra

A fejlesztési kísérletek során a biológiai eredetű minták kivételével standard CS diszacharid keveréket alkalmaztam mérendő mintaként, amely minden diszacharidot 10 pmol mennyiségben tartalmazott. A visszanyerés értékeit diszacharidokat szintén 10 pmol mennyiségben tartalmazó tisztítatlan minták mérési eredményeihez viszonyítva számítottam. A tisztítási kísérleteket beállításokként több párhuzamos (általában négy darab) minta előkészítésével és mérésével végeztem és párhuzamosok eredményeiből számoltam szórást.

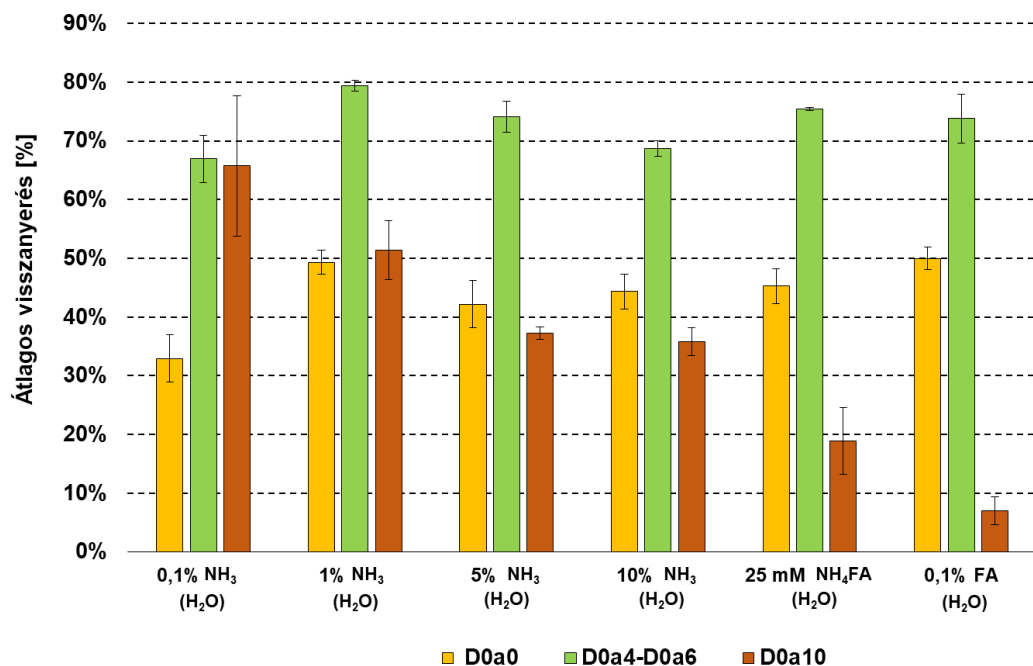
A CS és HS diszacharidok jelentős szerkezeti hasonlóságának köszönhetően tulajdonságaikban is hasonlóságot mutatnak. Ennek alapján a CS diszacharidokra alkalmazható tisztítási módszer alapjául vettem a HS módszerfejlesztésnél tapasztaltakat. A fejlesztés során az előzőekben legmeghatározóbb paraméterek hatásait vizsgáltam meg, és a vatta márkát, vatta mennyiséget, optimált oldattérfogatokat, hőmérsékletet és 2. elúciós lépést a HS végső protokollnak megfelelően rögzítettem. A módszerek teljesítőképességét a nem-szulfatált (D0a0), egyszeresen szulfatált (D0a4 és D0a6 izomerpárok összegezve) és kétszeresen szulfatált (D0a10) CS diszacharidok visszanyerése alapján végeztem.

4.2.1. Vatta-HILIC módszerfejlesztés

4.2.1.1. Elúciós oldatösszetétel optimalálása

A HS diszacharidokra alkalmazandó optimalálási folyamatnál azt tapasztaltam, hogy az elúciós oldószer kémhatása és összetétele jelentősen befolyásolja a módszerrel elérhető visszanyerések értékeit, így ebben az esetben az elúciós oldatösszetétel hatásának vizsgálatával kezdtem az optimalálást. A kísérlet során különböző anyagi minőségű és pH-jú oldatokat alkalmaztam: ammónia oldat, ammónium-formiát oldat és hangyasav oldat (11. táblázat). Mivel a HS módszerfejlesztésnél az ammónia tartalmú oldattal kiemelkedő eredményeket tudtam elérni, ezért ebben az esetben többféle összetételnél is vizsgáltam az ammónia hatását.

A legnagyobb visszanyeréseket a CS esetében is az ammóniatartalmú elúciós oldószer alkalmazásával értem el. Az ammóniás kísérleti eredményeken belül továbbá megfigyelhető egy maximumot mutató tendencia, amely maximum pontja az 1% ammóniát tartalmazó elúciónál volt megfigyelhető (24. ábra), így ezt az értéket rögzítettem a protokollban.



24. ábra Különböző elúciós összetétel alkalmazásával elért átlagos visszanyerések az egyes CS diszacharidok esetében. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.2.1.2. Felviteli lépés optimalizálása

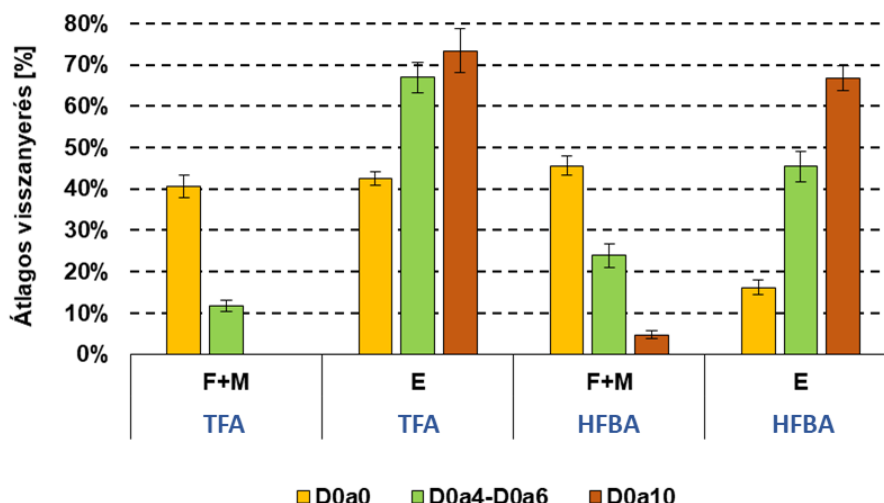
Az elúció után a felviteli lépéssel folytattam a kísérletsorozatot (11. táblázat). Előkísérletnek Box-Behnken kísérleti terv pontjainak megfelelő tervet állítottam össze (7. fejezet Függelék F-10 táblázat) melyben háromféle savat és összetételüket, valamint az acetonitril tartalmat változtattam.

A legnagyobb visszanyeréseket HFBA és TFA savak használatával, valamint 95%-os ACN tartalom mellett sikerült elérni. A savkoncentrációknál nem volt egyértelmű tendencia megfigyelhető. Mivel azonban ennél az esetnél sem voltak jelentős különbségek megfigyelhetők (7. fejezet Függelék F-3 ábra), így a kísérletterv értékelése helyett a legjobb paramétereket választottam ki.

Ennek folytatásaként további kísérletet végeztem, mely során rögzítettem a 95% ACN tartalmat, valamint a HS módszerfejlesztésnél optimálisnak ítélt 1%-os savtartalom mellett végeztem el a HFBA és TFA összehasonlítását (11. táblázat).

A kísérleti eredmények alapján a 95% ACN 1% TFA alkalmazásával sikerült nagyobb visszanyeréseket elérni, mindamelllett, hogy az átesőben bekövetkező veszteségek is kisebbek ebben az esetben (25. ábra). Ezek alapján a 95% ACN, 1% TFA felviteli oldatösszetételt rögzítettem a protokollban.

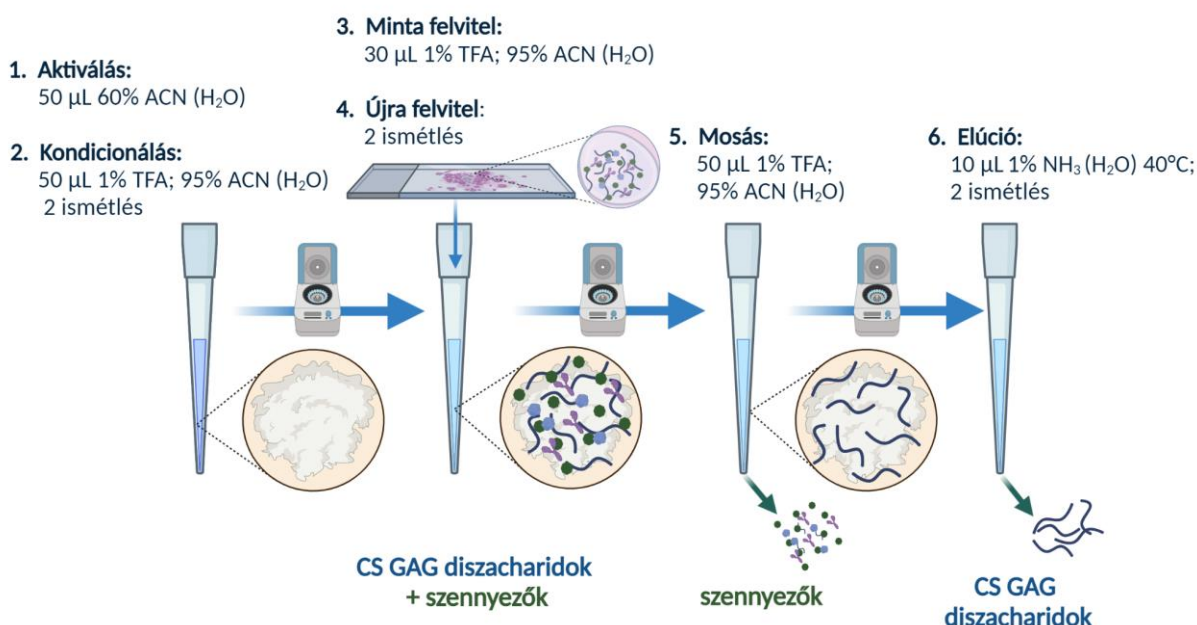
Ezen kívül megfigyelhető, hogy ebben az esetben is, a HS vatta fejlesztés végén tapasztalt tendencia a jellemző, miszerint a hidrofílebb CS diszacharidok D0a4-D0a6, D0a10 visszanyerése a magasabb, így ezekre jobb a módszer alkalmazhatósága.



25. *ábra* Különböző összetételű felviteli oldószer alkalmazásával elért átlagos visszanyerések az egyes CS diszacharidokra. (F+M: felviteli és mosási áteső, E: elúció). A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.2.1.3. Összefoglalás

A vatta-HILIC módszerfejlesztés eredményeül ebben az esetben is megalkottam egy saját töltésű állófázist alkalmazó SPE módszert (26. *ábra*), mely alkalmas CS diszacharidok tisztítására (10. táblázat). A módszer során a HS fejlesztési eredményeknél tapasztalatokhoz hasonlóan, a kevésbé hidrofíl D0a0 CS diszacharid egy része átesik a felviteli és mosási lépéseknél, így a módszer a polárisabb egyszeresen szulfatált (D0a4-D0a6) és kétszeresen szulfatált (D0a10) diszacharidok tisztítására bizonyult alkalmasabbnak.



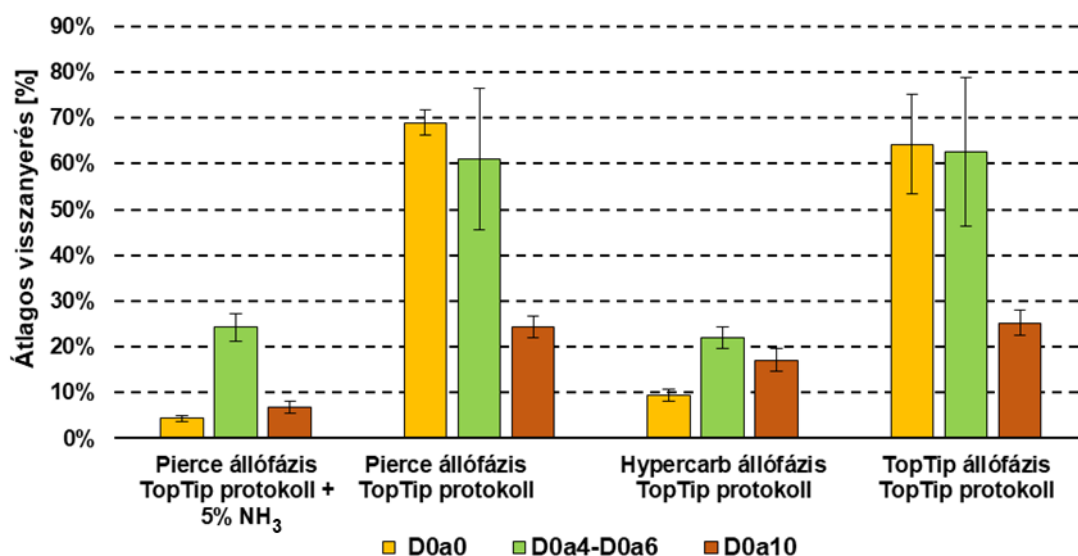
26. *ábra* A CS vatta-HILIC optimált módszer folyamata.

4.2.2. Grafitalapú módszerek fejlesztése

A grafitalapú módszerek fejlesztéséhez szintén felhasználtam a HS módszerfejlesztésnél szerzett tapasztalatokat, ami alapján a TopTip oldószerrendszeres protokollal elvégzett kísérletek bizonyultak a legjobbnak. Ezekre az eredményekre alapozva, a CS esetében is ezt rögzítve hasonlítottam össze a három különböző gyártójú állófázist, amik ebben az esetben a Pierce, Toptip és Hypercarb típusú állófázisok voltak (8. táblázat). Ezen kívül végeztem egy kísérletet olyan beállítások mellett is, hogy a Pierce állófázison hajtottam végre a TopTip oldószerrendszerrel tisztítást, azonban elúciós oldószerként 5% ammónia oldatot alkalmaztam. Ennek célja annak tesztelése volt, hogy az ammóniás elúció ebben az esetben is elősegíti-e hidrofilebb diszacharidok elúcióját.

A három állófázis közül a Hypercabbal végzett kísérlet eredményei jelentősen elmaradnak a Pierce és TopTip állófázisokhoz képest. Az utóbbi két típusal kapott visszanyerések között azonban jelentős különbség nem figyelhető meg (27. ábra). A leginkább szembetűnő különbség, hogy a TopTip állófázis esetében nagyobbak a szórások, ami annak köszönhető, hogy a 4 párhuzamos minta közül az egyik jelentősen eltér a többitől. Így a jobb ismételhetőség és a HS-es módszerfejlesztés során tapasztalt eredmények alapján a hasonlóan teljesítő Pierce állófázis – TopTip oldószerrendszer kombinációt tekintetem optimálisnak.

Megfigyeltem továbbá, hogy a HS-hez hasonló mintázatbeli torzulás figyelhető meg ebben az esetben is. A kevésbé hidrofíl diszacharidok visszanyerése a magasabb a polárisabb szulfatált diszacharidokéhoz képest, így ebben az esetben is a két, egymást kiegészítő módszer kombinálása mellett döntöttem a lehető legnagyobb visszanyerések és a szulfatációs mintázat legkisebb mértékű torzítása érdekében.



27. ábra A grafitalapú módszerek alkalmazásával elért visszanyerések az egyes CS diszacharidok esetében. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

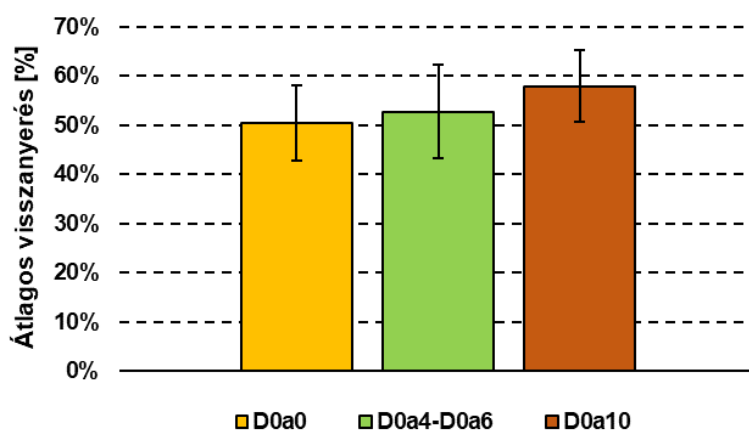
A különböző grafitalapú állófázisok TopTip oldószerrendszer mellett való tesztelésnek eredményeül, a legjobban teljesítő módszerként kiválasztottam a TopTip oldószerrendszer Pierce állófázist (12. táblázat) alkalmazó módszerét, mely a HS fejlesztésnél tapasztaltakhoz hasonlóan a kevésbé poláris diszacharidok tisztítására alkalmazható. A nem-szulfatált D0a0, és egyszeresen szulfatált D0a4-D0a6 diszacharidok visszanyerése jelentősen magasabb a kétszeresen szulfatált D0a10 CS diszacharidokhoz képest, mely polárisabb diszacharidokat nem tudtam megfelelően eluálni az állófázisról ebben az esetben sem.

4.2.3. Kétlépéses kombinált módszer fejlesztése vatta-HILIC és grafitalapú állófázisok alkalmazásával

4.2.3.1. Kombinált módszer tesztelése: standard CS diszacharid keverék vizsgálata

A kombinált módszerben a HS-nél alkalmazott módon kapcsoltam össze a vatta-HILIC és grafitalapú módszereket, azaz a vatta-HILIC tisztítási módszer végrehajtás után a felviteli és mosási frakciót tovább tisztítottam a grafitalapú módszerrel, és végül a két módszer egyesített elúciója került lemérésre.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a visszanyerések alacsonyabbak a HS-nél elértékhöz képest, azonban ezek szintén indokolhatók a bepárlásból adódó veszteségekkel. Mindemellett a szulfatációs mintázat torzítása igen alacsony, a visszanyerések egyaránt 50-60% közé esnek (28. ábra).

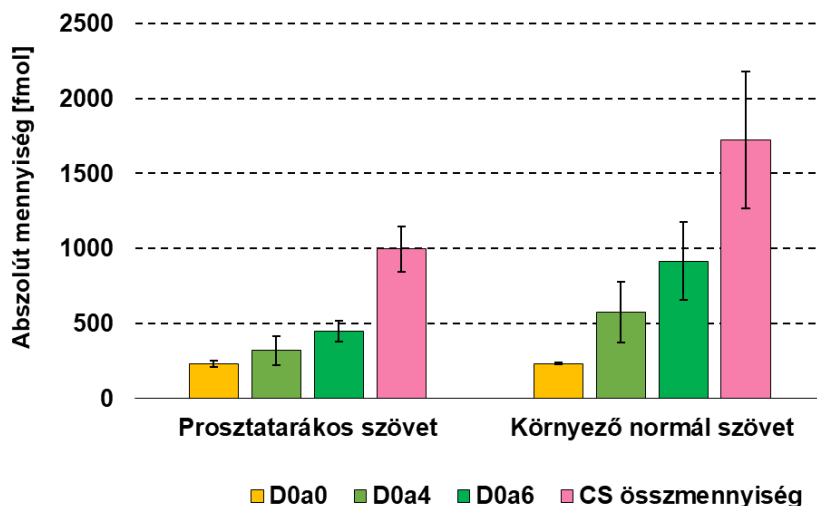


28. ábra A kombinált módszer alkalmazásával elért visszanyerések. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.2.3.2. Kombinált módszer tesztelése biológiai mintákon – PCa

A fejlesztett CS kombinált módszer biológiai alkalmazhatóságának tesztelése érdekében prosztatarákos szövetek vizsgálatával folytattam a kísérleteket. A tárgylemezre rögzített szövetmetszet felületén a megfelelő előkészítés után felületi emésztést hajtottam végre (3.3.4 fejezet), majd az így keletkezett diszacharidokat kivonás után megtisztítottam a kombinált protokollal.

A mérési eredmények alapján a kétféle típusú minta ebben az esetben is jól elkülöníthető volt egymástól (29. ábra). A környező normál szövetben magasabb mennyiség látható mindegyik diszacharid esetében, azonban a kétszeresen szulfatált D0a10 diszacharid kimutatási határ alatt volt. A módszert ebben az esetben is alkalmasnak ítélem biológiai minták vizsgálatára.

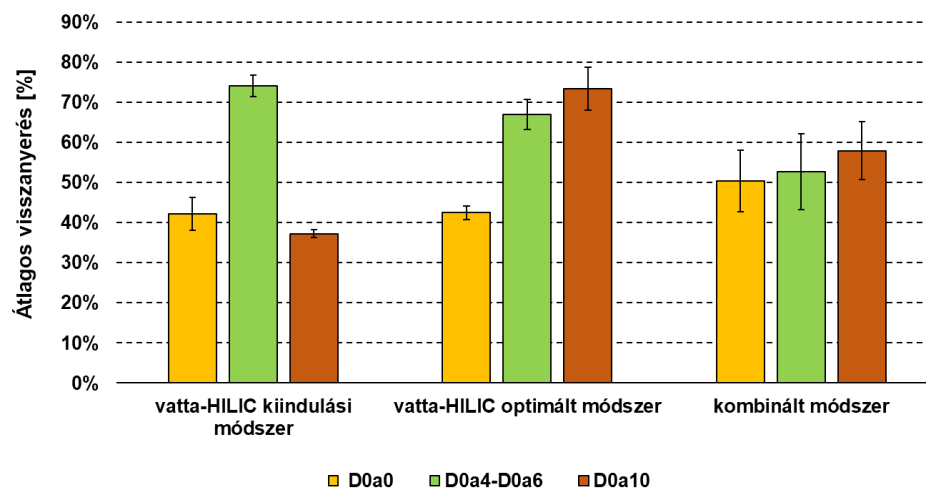


29. ábra A kombinált módszer biológiai alkalmazhatóságának tesztelése prosztatarákos és környező normál szövetmetszetek vizsgálatával. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

4.2.3.3. Összefoglalás

Összefoglalva, ebben az esetben is kifejlesztettem egy kombinált módszert kis mennyiségű, biológiai mintákból kinyert CS diszacharidok tisztítására. A módszerfejlesztés során megalkottam a HS tisztítási módszerek fejlesztését alapul véve egy saját töltésű, vatta állófázist alkalmazó HILIC típusú tisztítási módszert, valamint három grafitalapú állófázisú SPE módszert összehasonlítva, kiválasztva közülük a legjobban teljesítő módszert. A két, egymást kiegészítő módszer kombinálásával sikerült egyaránt ~50%-os visszanyerésű és alacsony torzítású tisztítási módszert megalkotni, mely alkalmasnak bizonyult biológiai minták tisztítására.

A 30. ábrán a kiindulási és optimált CS vatta-HILIC módszert hasonlítottam össze a CS kombinált módszerrel. Látható, hogy a vatta-HILIC fejlesztés végére jelentősen megnöveltem a polárisabb kétszeresen szulfatált (D0a10) diszacharid visszanyerését. Amíg az egyszeresen és kétszeresen szulfatált diszacharidok visszanyerései kismértékben csökkentek a kombinált módszer alkalmazásával, addig a nem-szulfatált CS diszacharidé nőtt, amelyek hatására jelentősen jobb torzítatlanságot értem el, ami elengedhetetlen a pontos mennyiségi értékelésekhez.



30. ábra A kiindulási és optimált HS vatta-HILIC módszerekkel és a kombinált CS vatta-HILIC módszerrel elért átlagos visszanyerések az egyes CS diszacharidokra. A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

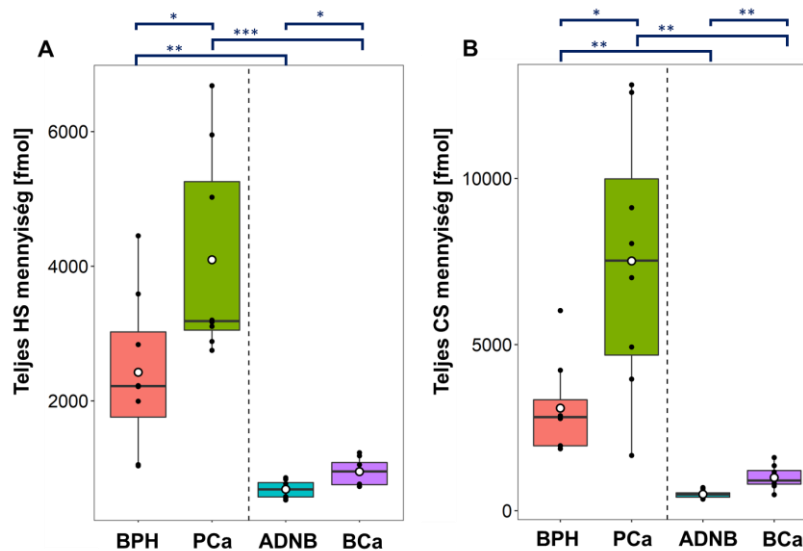
4.3. Prostatata- és emlőtumoros szövetek GAG tartalmának összevetése

Az optimált SPE tisztítási módszerek fejlesztése után a módszert prosztatatarákos (PCa) és emlő tumoros (BCa) szövetek HS és CS GAG tartalmának és mintázatának vizsgálatára alkalmaztam. A tumoros régiókkal való összehasonlításként prostata esetében jóindulatú prostata megnagyobbodásos szövetet (BPH), az emlő esetében pedig környező normál szövetet (ADNB) vizsgáltam. Az összehasonlítás alapjaként a csoportátlagokat vettem (box plot ábrán fehér körrel jelölve). A biológiai eredmények értékelése során összehasonlítottam az egyes mintacsoportok eltéréseit a vizsgált szempontok alapján (HS és CS összmenyisége, szulfatációs mintázata és származtatott szulfatációs karakterisztikái) szövetszoportokon belül, azaz a rákos és nem-rákos szövettípus összehasonlítása azonos szervi eredetű szövetből származva (BPH-PCa közötti eltérés, ADNB-BCa közötti eltérés). Emellett ugyanezen szempontok alapján elemeztem a szövettípusok közötti különbségeket, azaz rendre a prostata és emlő tumoros és nem-tumoros szövetszoportjait (BPH-ADNB közötti eltérés, valamint PCa-BCa közötti eltérés). Ezen kívül figyelembe vettem az egyes csoportok varianciáját, relatív szórását, valamint kitekintésként összehasonlítottam az egyes csoportokban azonosított proteoglikán vázfehérjék mennyiségét is.

4.3.1. Heparán-szulfát és kondroitin-szulfát láncok összmenyisége

A HS diszacharidok összmenyisége a prostata mintákban jelentősen nagyobb, közelítőleg 4-szeres mennyiségű (BPH 3,53-szor több mint ADNB ($p=0,0082$), PCa 4,32-szor több mint BCa ($p=0,00045$)), az emlő tumoros minták átlagához képest (31/A ábra). Ennek lehetséges oka az, hogy az emlőszövetek jellemzően több zsírsejtet tartalmaznak a prostataszövetekhez képest, így az emlő szövetekben vizsgált extracelluláris mátrix kisebb mennyiségben van jelen. A prostata-elváltozásos csoportokat megfigyelve átlagosan 1,69-szeres eltérés ($p=0,028$) volt tapasztalható a BPH és a PCa között, hasonlóan az emlőknél tapasztaltakhoz, ahol átlagosan 1,38-szor nagyobb ($p=0,011$) mennyiségű HS lánc volt mérhető BCa-ban a ADNB szövethez képest.

A CS láncok összmenyisége szintén jelentősen magasabbnak bizonyult a prostata mintacsoport esetében az emlő mintacsoportéhoz képest, mely ebben az esetben kb. 6-7-szeres eltérést (BPH 6,22-szor több mint ADNB ($p=0,0028$), PCa 7,53-szor több mint BCa ($p=0,0028$)) jelent átlagosan (31/B ábra). A prostata mintacsoporton belül a PCa csoportban a CS mennyisége 2,43-szorosa ($p=0,016$) volt a BPH csoportéhoz képest. Az emlő szövetek esetében a BCa csoportban mért CS mennyiség 2,01-szer ($p=0,0028$) magasabb volt a ADNB-hez képest.



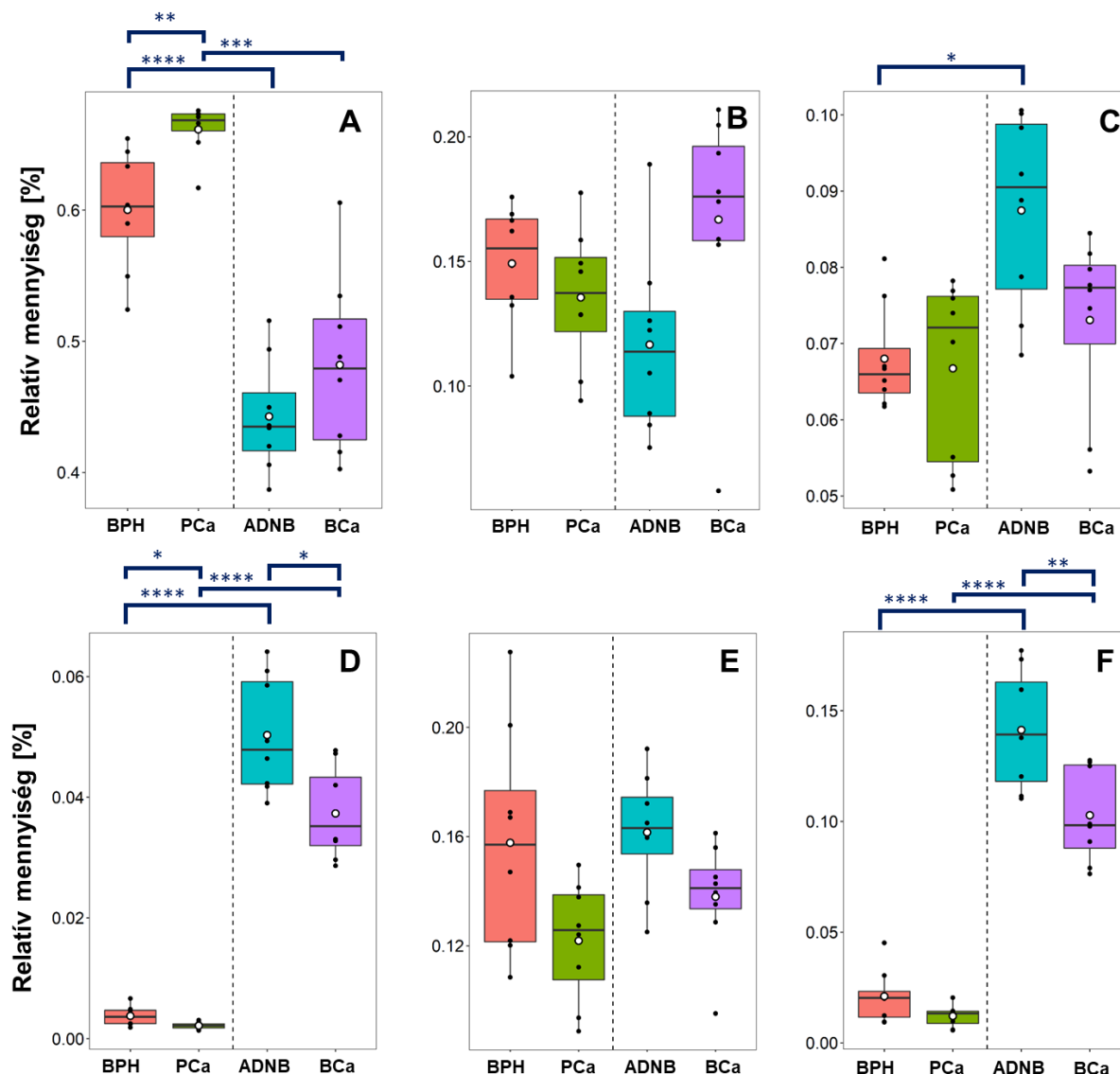
31. ábra Jóindulatú prosztata-megnagyobbodás (BPH), prosztatarák (PCa) és emlőrák (BCa), környező normál emlő (ADNB) minták GAG összmenyiségének összehasonlítása. **A:** Heparán-szulfát, **B:** Kondroitin-szulfát. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

A CS és a HS összmenyiségek vizsgálatánál a prosztata eredetű minták mérési adatainak nagyobb a csoporton belüli varianciája és a relatív szórása az emlőkhöz viszonyítva. Ezen kívül mindkét szövettípusnál megfigyelhető, hogy a rákos megbetegedések nagyobb csoporton belüli varianciát eredményeztek a nem-tumoros szövetekhez képest. A relatív szórások azonban szövettípuson belül közel egyformának adódtak, a prosztata HS esetében pedig a PCa csoport relatív szórása még kisebb is (35,5%) a BPH szövetcsoportéhoz képest (45,5%). Ugyanakkor érdemes lenne megismételni a kísérletsorozatot egy nagyobb esetszámú sorozatban, hogy megállapítható legyen, hogy az itt látott szórások mennyire tükrözik a valós csoporton belüli varianciát.

Ezután összehasonlítottam a HS és CS láncok egymáshoz viszonyított arányát az egyes vizsgálati csoportokban. Az ADNB emlő csoport esetében 1,39-szer több a HS összmenyisége a CS-nél, azonban ez az arány csak 0,95 volt a tumoros BCa csoport esetében. A prosztata szövetek vizsgálatánál a BPH és PCa szövetcsoportok esetén is alacsonyabb volt a HS diszacharidok mennyisége a CS-hez képest. Míg a BPH-ban 1,27-szorosa volt a CS mennyiség, addig a PCa esetében 1,84-szorosa volt a különbség. Ez alapján megállapítható, hogy az emlő elváltozások során a HS, míg a prosztata esetében a CS a domináns GAG lánc, azonban mindkét szövettípus esetén a CS láncok arányának növekedése tapasztalható a tumoros elváltozás kialakulásával.

4.3.2. Heparán-szulfát láncok szulfatációja

A HS láncok szulfatációjának vizsgálata során megfigyelhető, hogy a domináns diszacharid építőegység a nem-szulfatált D0A0 diszacharid volt, melyet a mono-*O*-szulfatált D2A0-D0A6 izomerpár és a di-*N,O*-szulfatált D2S0-D0S6 izomerpár követett. Azonban amíg a D0A0 esetében több összehasonlításbeli különbség is szignifikánsnak bizonyult (32/A ábra), addig az utóbbi két esetben sem szövettípuson belül, sem szövettípusok között nem volt kimutatható szignifikáns eltérés (32/B,E ábra).



32. ábra Jóindulatú prosztatamegnagyobbodás (BPH), prosztatarák (PCa) és emlőrák (BCa), környező normál emlő (ADNB) minták HS szulfatációs mintázatának összehasonlítása. A: D0A0, B: D2A0-D0A6, C: D0S0, D: D2A6, E: D2S0-D0S6, F: D2S6 diszacharidok relatív intenzitása. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

A szövettípusok közötti eltéréseket megfigyelve, az emlő és prosztata mintacsoportok közötti különbségeket összevetve, a prosztata szövetekben ~1,36-szor nagyobb volt a D0A0 építőegységek relatív mennyisége (32/A ábra), addig a többi esetben ennek ellentétét

tapasztaltam. Az ADNB szövetekben nagyobb volt a diszacharid aránya, egyetlen kivétellel, ahol a D2A0-D0A6 izomernél 1,27-szor nagyobb volt a a BPH-ban mint az ADNB-ben. A legnagyobb eltéréseket a két szövettípus között a D2A6, D2S6 diszacharidok relatív mennyiségében láttam, ahol az emlő mintákban a D2A6 esetében ~13-17-szer (32/D ábra), míg a D2S6 esetében ~7-8-szor nagyobbak (32/F ábra) adódtak a relatív mennyiségek a prosztatához képest.

A **szövettípusokon belüli** eltéréseknél a D0A0 diszacharidok mennyisége PCa és BCa szöveteknél is magasabb a nem-rákos mintacsoportokéhoz képest (32/A ábra), az összes többi diszacharidnál (32/B,C,D,E,F ábrák) pedig egy csökkenő hatás figyelhető meg ugyanennél az összehasonlításnál, amely jelenség utalhat a szulfatációt végző enzimek csökkent aktivitására. Az egyetlen kivételt az D2A0-D0A6 izomerpárnál tapasztaltam, ahol az emlő tumoros mintáknál a rák kialakulásával 1,43-szorosára nőtt a diszacharidok mennyisége. A prosztatarákos szövetek esetében szignifikáns változást a D0A0-nál (32/A ábra) és a D2A6-nál (32/D ábra) tapasztaltam, ahol előbbi 1,10-szeres ($p=0,002$, míg az utóbbi 0,571-szeres ($p=0,017$) mennyiségben volt jelen a rosszindulatú daganat kialakulásával a normál szövetekhez képest. Az emlőcsoportoknál a D2S6 (32/F ábra) és D2A6 (32/D ábra) diszacharidoknál volt szignifikáns a változás. Mindkét esetben közelítőleg háromnegyede volt a diszacharidok mennyisége a rákos szövetekben a normál szövetek diszacharid mennyiségéhez képest (D2S6: 0,73-szoros különbség ($p=0,0076$); D2A6: 0,74-szoros különbség ($p=0,012$)).

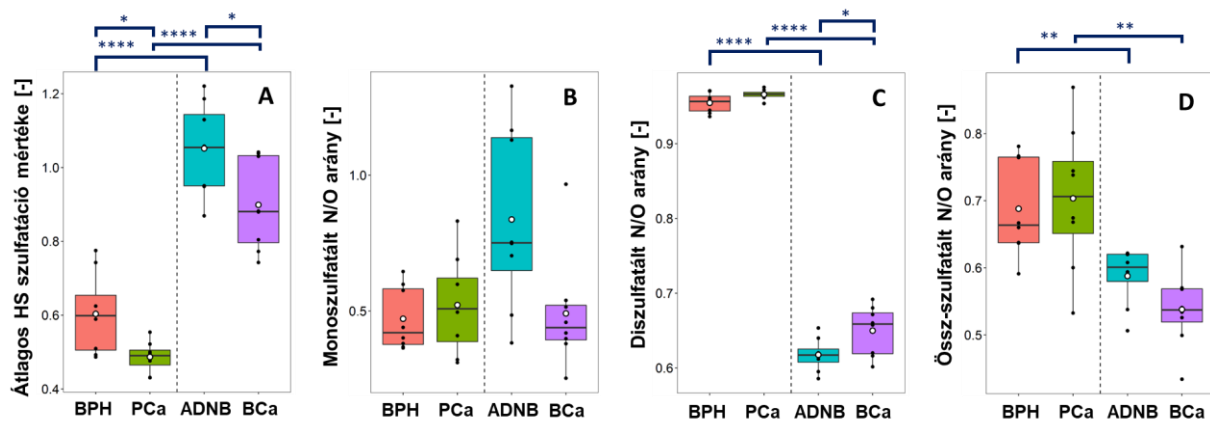
A **mintacsoportokon belüli variancia** tekintetében nem volt tendencia megfigyelhető, azonban a relatív szórásokat tekintve láthatóak voltak különbségek. Az BCa-nak általában nagyobb a relatív szórása az ADNB-hez képest. A prosztata szövetekben nagyobbak voltak a relatív szórásbeli különbségek, viszont az emlővel ellentétben a BPH-s minták relatív szórása bizonyult nagyobbak, ebben az esetben két kivétellel: a D2A0-D0A6 és D0S0.

Ezután a **HS láncok származtatott szulfatációs karakterisztikájának** az elemzését végeztem el. Az átlagos szulfatáció mértéke esetében a szövettípusokon belül és szövettípusok között egyaránt szignifikáns különbségeket mutattam ki (33/A ábra). Az emlő mintacsoport esetében 0,85-szoros ($p=0,0267$), a prosztata mintacsoport esetében 0,81-szoros ($p=0,0245$) volt a szulfatáció mértéke a rákos szövetekben a normál szövetekhez képest. A HS láncok szulfatációjának csökkenését számos rák kialakulásnál figyelték már meg, mint például májráknál, prosztataráknál, emlőráknál, tüdőráknál, így eredményeim egybehangzanak a szakirodalommal [89,99,106,107].

A HS láncokon a gyűrűhöz O vagy N atomokon keresztül kapcsolódhatnak szulfátcsoportok (1. táblázat). A különböző pozíciókban való szulfatációt különböző enzimek hajtják végre, így a szulfatációs pozíciók arányának megváltozása jelentőséggel bírhat a

daganatos elváltozások kialakulásának megértésében (lásd 2.2. fejezet). Ennek vizsgálatára az N/O-szulfatáció arányát alkalmaztam, ami a nitrogénen keresztül kapcsolódó szulfátcsoportok aránya az oxigénen keresztül kapcsolódó szulfátcsoportok számához viszonyítva.

A monoszulfatált HS diszacharidok **N/O arányában** nem tapasztaltam szignifikáns eltéréseket, azonban az ADNB csoportban ~1,7-szer magasabb és nagyobb varianciájú mono-N/O arány volt mérhető a többi szövetszámhoz képest (33/B ábra). A diszulfatált N/O arány átlagosan 1,52-szer magasabb volt a prosztatában, mint az emlőszövetekben (BPH 1,55-szor több minta ADNB ($p=6,02 \times 10^{-15}$), PCa 1,49-szor több mint a BCa ($p=1,51 \times 10^{-8}$)) (33/C ábra), míg a teljes N/O arány esetében ez különbség mérsékeltebb (BPH 1,17-szor több minta ADNB ($p=0,0093$), PCa 1,3-szor több mint a BCa ($p=0,0056$)) volt (33/D ábra). Ezek a szövettípusok közti nagymértékű és szignifikáns eltérések az egyes szövetekben jelenlévő ECM eltérő strukturális felépítésére utalnak.



33. ábra Jóindulatú prosztatamegnagyobbodás (BPH), prosztatarák (PCa) és emlőrák (BCa), környező normál emlő (ADNB) minták HS szulfatációjának összehasonlítása.

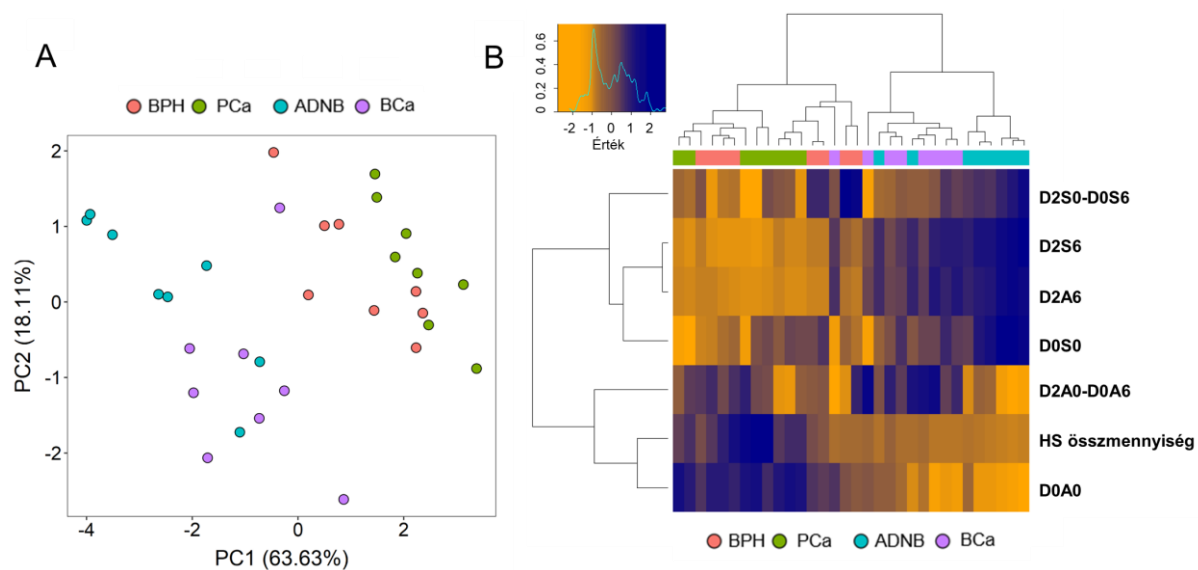
A: Átlagos HS szulfatáció mértéke (egy diszacharid egységre jutó szulfátcsoportok száma), **B:** Monoszulfatált diszacharidok O- és N szulfatációjának aránya, **C:** Diszulfatált diszacharidok O- és N-szulfatációjának aránya, **D:** Összesített diszacharidok O- és N-szulfatációjának aránya. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$)

A prosztata szöveteknél a mono-, di- és teljes **N/O arány** egyaránt növekszik a PCa kialakulásával, míg az emlőnél ez a hatás csak a diszulfatált N/O aránynál látható, a többi esetben ellentétes a megfigyelhető változás (33. ábra). A szövettípusokon belüli N/O arány változás csak az emlő esetében, és azon belül is csak a kétszeresen-szulfatált N/O arányban bizonyult szignifikánsnak, ahol 1,05-szeres ($p=0,045$) növekedés volt tapasztalható.

A fentebb részletezett eredmények alapján a szulfatált HS láncok kisebb mennyiségben vannak jelen a rákos szövetekben mint a normál szövetekben, amit szintén jól mutat az átlagos szulfatáció mértékének alacsonyabb értéke a prosztata és emlő szövetekben egyaránt. Ez a jelenség korrelál az irodalomban található eredményekkel, miszerint a rák kialakulásával lecsökken a HS diszacharidok szulfatáltsági szintje [89,93,94]. Eredményeimet alátámasztják

korábbi kutatások is, amelyekben kimutatták, hogy az emlőrákban szenvedő betegek szövetei, függetlenül attól, hogy a szövet rákos vagy normális volt, alacsonyabb HS-t szulfatációt mutattak. Ezt elsősorban a 6S szulfatáció csökkenése és szulfatálatlan diszacharid egységek mennyiségének növekedése okozza [99]. Ezek alapján a HS glükózaminoglikán 6-O-endoszulfatáz (HSulf-1) aktivitásának csökkenése potenciális szerepet játszik az emlőkarcinogenezisben [108]. A HS szulfatáltság csökkenésével a HS láncok különböző receptorokhoz való kötődése is csökken, amivel szabályozza a növekedési faktorok felhalmozódását az ECM-ben és sejtfelszínen [109].

Végül az egyes csoportok közötti hasonlóságot **főkomponens-analízis** segítségével vizsgáltam (34/A ábra). Az analízis során megállapítottam hogy a prosztatata és emlő eredetű minták külön csoportosulnak, valamint szövettípusokon belül is látható a rákos minták elkülönülése kismértékű átfedéssel. A **hő térkép ábrán** (34/B ábra) megfigyelhető az emlő és prosztatata eredetű minták szövettípus szerinti klasztereződése. Ezen kívül, egy klasztert alkot az összmennyiség és nem-szulfatált D0A0 relatív mennyisége, valamint a szulfatált diszacharidok is együtt klasztereződnek.



34. ábra A: HS diszacharidok mennyiségének főkomponens analízise; az első főkomponens az adatok varianciájának 63,63%-át, míg a második főkomponens az adatok varianciájának 18,11%-át írja le. **B:** Hierarchikus klaszterezés alapján készített hő térkép ábra.

A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

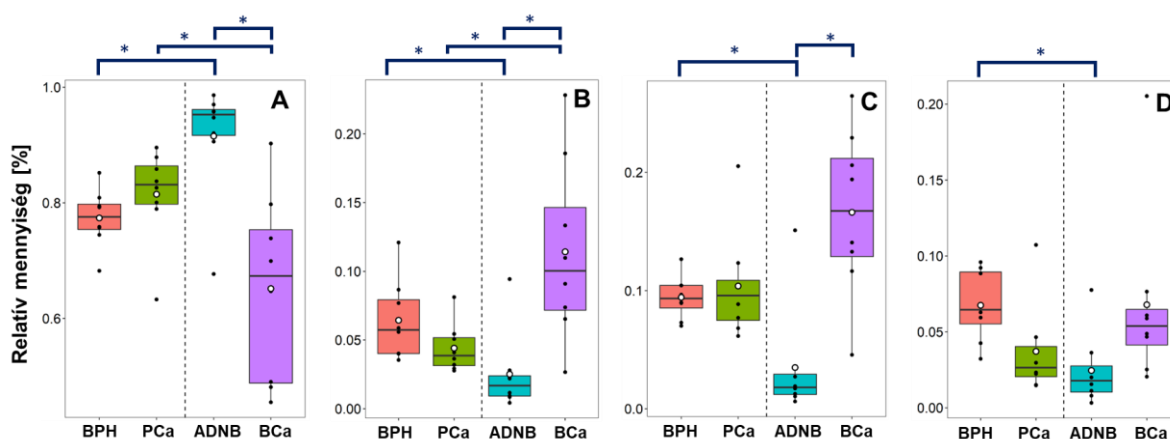
Összességében elmondható, hogy a prosztatata és az emlő szövetek viszonylag jól elkülöníthetők egymástól a HS láncok összmennyisége és szulfatációs mintázata alapján egyaránt. A D0A0 nem-szulfatált diszacharid minden szempontból elkülönül a többi, szulfatált diszacharid építőegységtől. Egyrészt a D0A0 relatív mennyisége a legnagyobb, másrészt a szulfatált diszacharidok relatív mennyisége csökkent a rák kialakulásával, míg a D0A0 esetében nagyobb arányt tapasztaltam. A számított N/O arányok esetében a kétféle szövet majdnem

minden esetben jól elkülönül egymástól, szövettípuson belül azonban csak egy esetben, az emlő kétszeresen szulfatált diszacharidok *N/O* arányában volt szignifikáns különbség megfigyelhető.

4.3.3. Kondroitin-szulfát láncok szulfatációs mintázata

A kondroitin-szulfát esetében is összevettem az láncokban lévő egyedi diszacharidok relatív mennyiségét és szulfatáltsági mintázatát, első lépésben a két **eltérő szövettípus között**. A **nem-tumoros** emlő és prosztata csoportokat összehasonlítva az tapasztalható, hogy mind a négy vizsgált CS diszacharid esetében szignifikáns az eltérés a BPH és a ADNB szövetek között (35. ábra). Míg a D0a0 relatív mennyisége az emlő szövetekben (ADNB) 1,40-szor ($p=0,0111$) magasabb volt (35/A ábra), addig a monoszulfatált és kétszeresen-szulfatált diszacharidoknál ennek ellentéte látható (35/B,C,D ábrák). A **tumoros** PCa és BCa mintacsoportok esetében a D0a0 relatív mennyisége az emlőben 0,80-szor ($p=0,0446$) alacsonyabb, a D0a4 szintje 2,59-szor magasabb ($p=0,0303$) volt (35/A,B ábra). A D0a6 és a D0a10 relatív mennyiségében körülbelül kétszeres eltérések voltak tapasztalhatók (35/C,D ábra).

A **szövettípuson belüli összevetéseknél a prosztata minták** esetében a PCa csoport D0a0 és a D0a6 mennyiségei átlagosan 1,08-szor magasabbak a BPH-hoz képest, a D0a4 és D0a10 esetében pedig ezzel ellentétesen a BPH mintacsoportokban található 1,64-szor több diszacharid, azonban egyik változás se bizonyult szignifikánsnak. Ezzel szemben az **emlő szövetcsoporton** belül is megfigyelhető volt a rák kialakulásával a nem-szulfatált D0a0 diszacharid mennyiségének kisebb aránya, ami 0,71-szor kisebb relatív mennyiséget jelentett ($p=0,0112$), míg a szulfatáltaké átlagosan 4,02-szor nagyobb volt, mely tendenciák pont ellentétes irányúak a prosztata mintacsoportnál tapasztaltakkal.

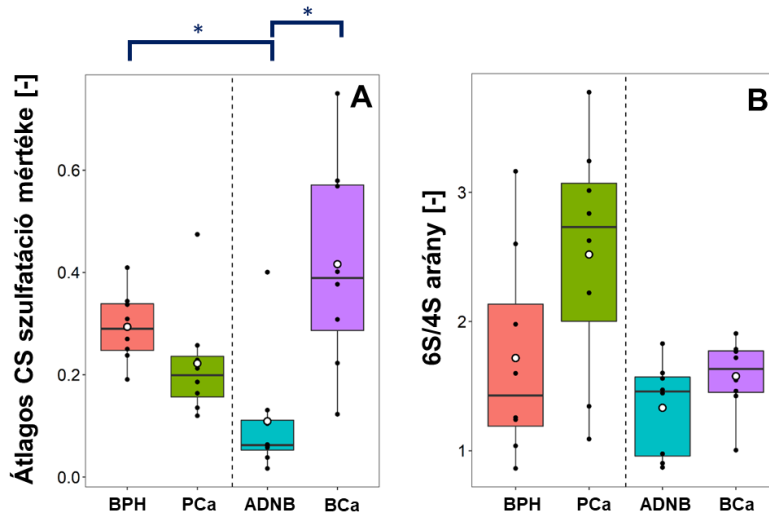


35. ábra Jóindulatú prosztatamegnagyobbodás (BPH), prosztatarák (PCa) és emlőrák (BCa), környező normál emlő (ADNB) minták CS mintázatának összehasonlítása.

A: D0a0, B: D0a4, C: D0a6, D: D0a10 diszacharidok relatív intenzitása. (*: $p<0,05$)

A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

Az **átlagos szulfatáció mértéke** alapján a prosztatata mintacsoportoknál a PCa mintegy 0,76-szorosa az BPH-hoz képest, az emlőnél ezzel szemben 3,81-szer nagyobb ($p=0,0177$) volt az átlagos szulfatáció, mely utóbbi változás bizonyult szignifikánsnak (36. ábra).



36. ábra Jóindulatú prosztatamegnagyobbodás (BPH), prosztatarák (PCa) és emlőrák (BCa), környező normál emlő (ADNB) minták CS szulfatációjának összehasonlítása.

A: Átlagos CS szulfatáció mértéke (egy diszacharid egységre jutó szulfátcsoportok száma),

B: 6-O-szulfatáció és 4-O-szulfatáció aránya (D0a6/D0a4 arány). (*: $p<0,05$)

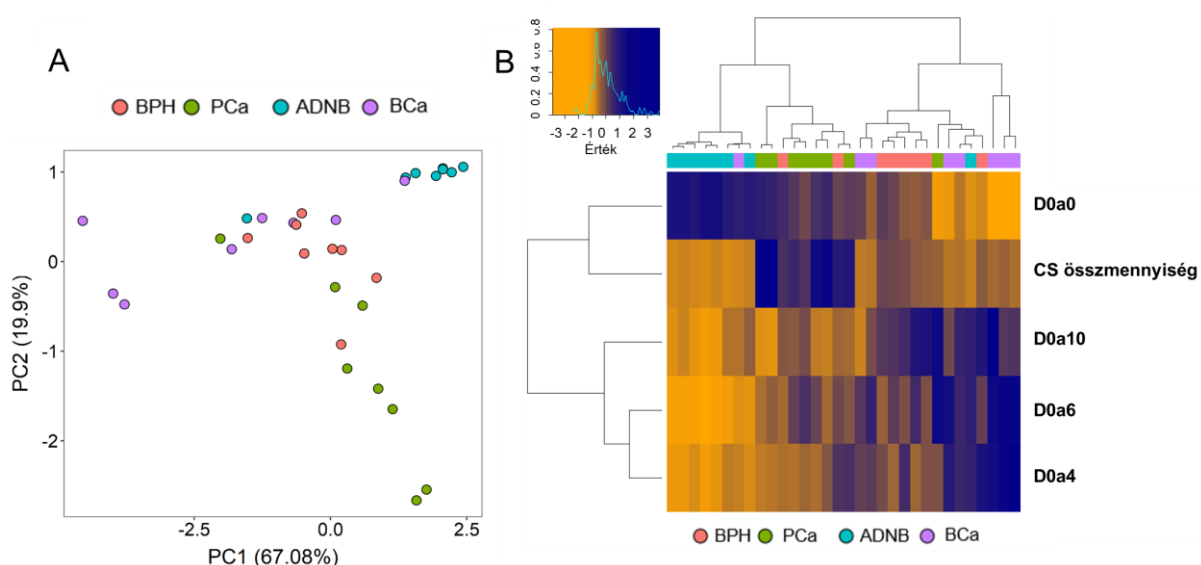
A 6-O-monoszulfatált (D0a6) és 4-O-monoszulfatált (D0a4) diszacharidok arányban (6S/4S arány) mind a prosztatánál, mind az emlőnél 1,18–1,47-szeres növekedés látható a kóros elváltozással. A CS láncok mennyiségének növekedése a 6-O-szulfatáció arányának párhuzamos növekedésével összefüggésbe hozható a tumor kialakulásával és a sejtproliferációval emlőrák és prosztatarák esetében egyaránt [90,91,101]. A kondroitin-6-szulfát gátolja a gyulladások keltő molekulák felszabadulását, így a növekvő mennyiségük elősegíti a tumorok életben maradását [110].

Az emlőben D0a4 és D0a6 monoszulfatált diszacharidok aránya egyaránt szignifikánsan magasabb a környező normál szövethez képest, és ezzel azonos hatás tapasztalható a kétszeresen szulfatált (D0a10) diszacharid építőegység esetében is. Ez alapján arra lehet következtetni, hogy a tumor kialakulásával jelentősen megnő a 4-O-szulfatációért felelős enzimeket kódoló gének *CHST₁₁* és *CHST₁₃*, valamint a 6-O szulfatációért felelős enzimeket kódoló gének *CHST₃* és *CHST₇*. A *CHST₁₅* kétszeresen szulfatált diszacharidokat hoz létre, a 4-O szulfatált diszacharidok további 6-O szulfatálásával, azonban ennek aktivitása ez alapján nem növekedett meg jelentősen [111]. A fenti feltételezések bizonyításához további vizsgálatok szükségesek molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával.

A **mintacsoportok csoporton belüli varianciájában** az emlő tumoros minták emelkednek ki, ugyanis a rákos szöveteknél az egyes diszacharidoknál a D0a10 kivételével jelentősen nagyobb a minták csoporton belüli varianciája a normál szövethez képest (35. ábra).

Ugyanezt tapasztaltam az átlagos szulfatáció mértékénél (36/A ábra), ami alapján arra következtethettem, hogy rákos elváltozások esetén megnövekednek az egyes betegek közti molekuláris különbségek. A relatív szórásokat tekintve tendencia nem volt megfigyelhető.

Ebben az esetben is végeztem **főkomponens-analízist** (37/A ábra), mely során megállapítottam hogy a prosztatata és emlő eredetű minták elkülönülnek egymástól a CS összetétel alapján is, kismértékű átfedés mellett. Ezen kívül a szövettípuson belül is látható a daganatos és normál csoportok elkülönülése. A hierarchikus klaszterezés alapján készített **hő térkép** (37/B ábra) a minták eredete alapján nem figyelhető meg jól elkülönülő klaszterekbe rendeződés, azonban az összmennyiség és a nem-szulfatált diszacharidok ebben az esetben is elkülönülnek a szulfatált diszacharidoktól.



37. ábra A: CS diszacharidok mennyiségének főkomponens analízise; az első főkomponens az adatok variációjának 67,08%-át, míg a második főkomponens az adatok variációjának 19,9%-át írja le. **B:** Hierarchikus klaszterezés alapján készített hő térkép ábra.
A Lawrence kódok értelmezéséhez a 3. ábra nyújt segítséget.

Összefoglalásként elmondható, hogy a CS mintázat esetében a BPH és az ADNB csoportok minden esetben szignifikánsan elkülönültek egymástól, míg a rákos elváltozásánál ez csak a D0a0 és D0a4 esetében volt szignifikáns. Ezt az is bizonyítja, hogy a rákos megbetegedésekkel megnőnek a páciensek közti különbségek. Megállapítottam, hogy az emlő és prosztataszövetek esetében egyaránt nagyobb 6S/4S arány volt kimutatható a tumoros szöveti régiókban. **Az átlagos CS szulfatáció mértékének változásában eltérő hatás volt tapasztalható: prosztatata esetén kismértékben alacsonyabb a CS szulfatációja a tumoros régiókban, míg az emlő esetén jelentős növekedés volt tapasztalható.**

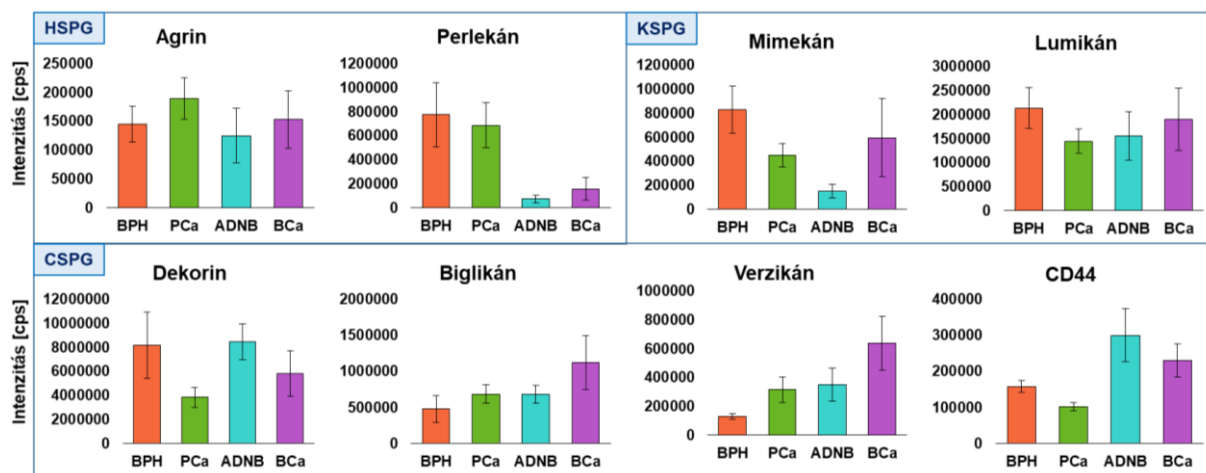
4.3.4. Eredmények összevetése, proteoglikán vázfehérjék mennyisége

A prosztataminták vizsgálata során azt figyelhettem meg, hogy HS és CS osztály esetében egyaránt a nem-szulfatált diszacharid építőegységek mennyisége nagyobb a rákos szövetekben, a szulfatált diszacharidok pedig kisebb mennyiségben vannak jelen a rákban a környező nem-rákos szövetekhez képest. Ezen kívül mindkét esetben a legnagyobb relatív mennyiségű diszacharid a D0A0 nem-szulfatált diszacharid volt. Ezek a megfigyelések igazak a HS esetében tapasztalt emlő mintacsoportok eredményeire is. Azonban a CS diszacharidoknál az előbbiekkal ellentétes módon a rákban kisebb a D0a0 relatív mennyisége, a szulfatált diszacharidok mennyisége pedig nagyobb. A HS diszacharidok esetében a szulfatációs profilnál azt figyelhettem meg, hogy *N/O* szulfatáció mértékében az emlő mintacsoportnál mutattam ki szignifikáns változást a diszulfatált diszacharidok *N/O* arányában, míg a CS esetében a 6S/4S szulfatációban nem.

A főkomponens-analízis és hierarchikus klaszterezésen alapuló hőtérkép ábrákat összevetve elmondható, hogy mindkét esetben viszonylag jól csoportokba rendeződnek és elkülönülnek egymástól az emlő és prostata szövetek, valamint szövettípuson belül is a nem-rákos és tumoros minták is. Ezen felül a HS és CS láncok közötti hasonlóság, hogy a hőtérkép ábrákon mindkét esetben az összemennyiség és a nem-szulfatált diszacharid egy klasztert alkotva elkülönül a szulfatált diszacharidoktól, ami oka valószínűleg, hogy az összemennyiséget legjobban a D0a0 mennyisége határozza meg.

Annak felderítésére, hogy az előző fejezetekben kimutatott változások kizárólag a GAG láncokra vonatkozó eltérések vagy a teljes proteoglikánoknak is szerepe van benne, elvégeztük a PG vázfehérjék jelölésmentes mennyiségi meghatározását shotgun proteomikai módszerekkel.

A kutatócsoportban korábban végzett kísérletek során vizsgálták prosztatarákos és emlőrákos szövetek fehérjetartalmát. Az azonosított fehérjéket és az azokhoz tartozó intenzitás értékeket tartalmazó fehérjelistából kiszűrtem a proteoglikán vázfehérjék adatait. A vizsgálatok során összesen 8 féle PG-t mutattam ki mindkét szövettípusban. Az agrin és perlekán, amelyek bazális membránban elhelyezkedő HSPG-k, a mimekán és a lumikán ECM-ben jelen lévő KSPG-k, míg a dekorin, biglikán, verzikán (mindhárom az ECM-ben elhelyezkedő PG) és CD44 (transzmembránban lévő PG) CSPG-ok (38. ábra).



38. ábra Proteoglikán vázfehérjék intenzitása jóindulatú prosztata-megnagyobbodás (BPH), prosztatarák (PCa) és emlőrák (BCa), környező normál emlő (ADNB) minták esetén.

A **HSPG-k** arányait vizsgálva az agrin esetében a prosztata és az emlő mintacsoportokban is nagyobb az arányuk a rákos szövetekben, mint a nem-rákosban. Ezzel szemben a perlekánt megvizsgálva különböző tendencia látszott a prosztata és az emlő szövetcsoportok között. Amíg az emlő szöveti csoportnál ugyancsak, az agrinhoz hasonlóan egy nagyobb, kétszeres különbség látható az ADNB és BCa között, addig a prosztata szövetcsoportnál alacsonyabb a perlekán szintje a rákos szövetcsoportnál.

A **KSPG**-ket vizsgálva a mimekán és lumikán esetében is azonos tendencia látható szövetcsoportokon belül. A prosztata-szövet mintacsoportnál a rákos szövetben kisebb az aránya ezen proteoglikánoknak, míg az emlő szöveteknél nagyobb.

Ezen kívül 4 db **CSPG** volt kimutatható a kétféle ráktípusban. A dekorin és CD44 esetében a prosztata-szövetekben és emlő szövetekben is alacsonyabb a vázfehérjék mennyisége a rákos szövetben a nem-rákoshoz képest. Különbség a prosztata szöveteknél figyelhető meg a két szövetcsoport között, mivel a dekorin esetében lényegesen nagyobb, ~2-szeres különbség volt tapasztalható a nem-rákos és rákos szövetek között. A biglikán és verzikán esetében két egymáshoz nagyon hasonló tendencia volt látható, amelyeknél az előzőekkel ellentétben, a rákos szövetekben nagyobb a PG vázfehérjék mennyisége. A verzikán esetében nagyobb különbségek figyelhetők meg az egyes szövet típuson belül.

Az általam vizsgált szövetekben a HS és CS összemennyiségek vizsgálata során a HS és CS láncok mennyisége végül egyaránt nagyobb volt a rákos szövetcsoportokban (4.3.1. fejezet, 31. ábra). Ezt igazolják a fentebb részletezett HSPG eredmények is. Az agrin és perlekán esetében is nagyobb a vázfehérjék mennyisége a rákos szövetekben a prosztatacsoportok perlekán szintjét kivéve, ami magyarázható például azzal, hogy nem a PG-ok mennyisége nagyobb a rák kialakulásával, hanem több diszacharid építőegységekből álló GAG láncok szintetizálódnak a vázfehérjékre. A CS esetében a rákos szövetekben nagyobb

mennyiségben lévő CS láncok és a PG vázfehérjék mennyiségi eltérései között azonban nem mutatható ki egyértelmű hozzárendelés. Míg a biglikán és a verzikán azonos tendenciát mutatot, a dekorin és CD44 esetében ezzel ellentétes, csökkenő hatás figyelhető meg. Így valószínűsíthető, hogy a PGk összmenyisége és a kapcsolódó CS láncok hossza egyaránt változik a rákos megbetegedések kialakulása során. Ezen feltételezések megerősítésére további (molekuláris biológiai módszerekkel végrehajtott) vizsgálatok elvégzése szükséges.

5. Összefoglalás

A prosztatarák és az emlőrák napjaink két vezető tumoros megbetegedése, melyek hatékonyabb kezelése érdekében szükséges a tumor kialakulásában szerepet játszó biológiai folyamatok minél alaposabb megértése. A daganatos megbetegedések során a szövetek proteomikai és glikomikai összetétele jelentősen megváltozik, amely változások jelentős részét proteoglikánok irányítják, amelyek vázfehérjékből és hozzájuk kapcsolódó glükózaminoglikán (GAG) láncokból álló makromolekulák. A proteoglikánok funkcióit nagymértékben meghatározzák a kapcsolódó GAG láncok, mivel ezek mérete jelentősen nagyobb a fehérjékéhez képest.

Munkám során **heparán-szulfát (HS)** és **kondroitin-szulfát (CS)** glükózaminoglikán osztályok „*bottom up*” vizsgálatával foglalkoztam. Ennek során a GAG láncokat enzimatikusan diszacharid építőegységeire bontottam, majd egy **saját töltésű HILIC-WAX kapilláris kolonnát** alkalmazó HPLC-MS módszerrel kvantifikáltam. A műszeres analízist azonban egy **tisztítási lépésnek kell megelőznie**, a szennyezők és az emésztési maradékok eltávolítása érdekében. Ez azonban a célvegyületek széles polaritási tartománya miatt számos kihívást tartogat. A szakirodalomban korábban nem volt példa a GAG-ok tisztítási módszereinek átfogó elemzésére. Ezért célom volt egy olyan **új módszer kidolgozása, mely egy olcsó és egyszerű megoldást jelenthet a GAG diszacharidok tisztítására**.

Munkám során **két saját töltésű vatta-HILIC módszert fejlesztettem ki HS és CS diszacharidok tisztítására**, egészen a vatta pipettahegyekbe történő töltésétől, a SPE módszer paramétereinek optimalásáig. Optimaltam az állófázis minőségét és mennyiségét, az egyes lépésekben használt oldószerek összetételét (savminőség, savtartalom, acetonnitrittartalom, alkalmazott térfogatok, kémhatás) és hőmérsékletét. Eredményeim alapján **a diszacharidok visszanyerésére legnagyobb hatással az elúciós oldószer összetétele volt**, amelynél (a lúgos kémhatású) **ammónia alkalmazása bizonyult a legjobbnak**. Jelentős befolyásoló paraméternél adódott még a felviteli oldószerekben alkalmazott savak anyagi minősége és koncentrációja, amelynél pedig 1% TFA alkalmazása emelkedett ki a többi módszer közül. Végül megalkottam egy olcsó és egyszerű **saját töltésű vatta-HILIC tisztítási módszert**, amely a **HS és CS diszacharidok** esetében egyaránt **a polárisabb, szulfatáltabb diszacharidokra jól alkalmazható**.

Ezután **összehasonlítottam többféle grafitalapú állófázis hatékonyságát GAG diszacharidok tisztítására**. Három grafitalapú állófázis és három oldószerrendszer kombinációjával összesen 9 grafit-SPE módszert vizsgáltam. A legjobb visszanyerést TopTip oldószerrendszer Pierce állófázison való alkalmazásával értem el. A tapasztalatok ebben az

esetben a vatta-HILIC módszerével ellentétesek voltak, ugyanis **a módszer a kevésbé poláris GAG diszacharidok tisztítására volt jól alkalmazható.**

A fentiek alapján a két fejlesztett módszer kiegészíti egymást, így **kifejlesztettem egy kombinált vatta-HILIC + grafit tisztítási módszer HS és CS diszacharidok mintaelőkészítéséhez.** A legnagyobb visszanyerések és a legkisebb torzítás érdekében a vatta-HILIC módszernél a felviteli és mosási frakcióban áteső GAG diszacharidokat tovább tisztítottam grafitalapú módszerrel. A két módszer elúciós frakcióját egyesítve a **minimálisra csökkentettem a veszteséget** megfelelő visszanyerések (HS: ~70%, CS: ~50%) és diszacharid mintázatok **kielégítő torzítatlansága** mellett. A módszerek alkalmasnak bizonyultak **GAG diszacharidok torzítatlan tisztítására kis mennyiségű komplex biológiai mintákból.**

Munkám második részét a fejlesztett módszer biológiai alkalmazása adta, mely során **prostatata- és emlőtumoros szövetek HS és CS tartalmának feltérképezését valósítottam meg.** Mivel a emlőrák és a prosztaták jelentős genetikai és proteomikai hasonlósággal bír, ezért a két szövettípus GAG mintázatait összehasonlítottam azonos, illetve eltérő glikomikai profilok felderítése érdekében. Összehasonlítottam jóindulatú prostata megnagyobbodásos (**BPH**), prosztatákos (**PCa**), emlőrákos (**BCa**) és hozzá tartozó környező normál szöveti régiók (**ADNB**) **CS, HS, valamint proteoglikán vázfehérje összetételét.**

Megállapítottam, hogy mindkét szövettípus esetén **növekedés** tapasztalható a **tumoros elváltozások kialakulásával** a HS és CS láncok **összmennyiségében** egyaránt. A **HS szulfatációjának** mértéke mindkét szövet esetén **alacsonyabb** volt a tumoros régiókban, míg a **CS szulfatációja a prostataszövetekben alacsonyabb, az emlőszövetekben pedig magasabb** volt a tumoros régiókban a nem-tumoros szöveti részekhez képest. Emellett több azonos és eltérő irányú változás volt kimutatható a kitüntetett szulfatációs pozíciók betöltöttségében is. Főkomponens-analízis és hierarchikus klaszterezés alkalmazása során megállapítottam, hogy csoportokba rendeződnek és **elkülönülnek egymástól az emlő és prostata rákos szövetek, valamint szövettípuson belül a nem-rákos és tumoros minták is.**

A **proteoglikán vázfehérjék** mennyiségének vizsgálata során számos eltérést és hasonlóságot mutattam ki az egyes szövetsportok között. Egyértelmű hozzárendelés azonban nem volt meghatározható az egyes PG vázfehérjék mennyisége és a hozzájuk tartozó GAG osztályok mennyiségi eltérései között.

Az általam kifejlesztett módszerek segítségével kimutatott változások hozzájárulhatnak a tumoros elváltozások molekuláris folyamatainak megértéséhez, és jövőbeli terveink között szereplő nagy esetszámú validálásuk után hozzájárulhatnak újfajta diagnosztikai és kezelési módszerek fejlesztéséhez.

6. Irodalomjegyzék

- [1] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/JCS.023820>.
- [2] A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, C. Gialeli, N.K. Karamanos, Extracellular matrix structure, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97 (2016) 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
- [3] The Extracellular Matrix: an Overview, Springer Berlin Heidelberg, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16555-9>.
- [4] P. Lu, K. Takai, V.M. Weaver, Z. Werb, Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) a005058. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A005058>.
- [5] H. LIS, N. SHARON, Protein glycosylation, *Eur. J. Biochem.* 218 (1993) 1–27. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1993.TB18347.X>.
- [6] S.S. Pinho, C.A. Reis, Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications, *Nat. Rev. Cancer* 2015 159. 15 (2015) 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>.
- [7] D. Thomas, A.K. Rathinavel, P. Radhakrishnan, Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1875 (2021) 188464. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2020.188464>.
- [8] N. Afratis, C. Gialeli, D. Nikitovic, T. Tsegenidis, E. Karousou, A.D. Theocharis, M.S. Pavão, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Glycosaminoglycans: Key players in cancer cell biology and treatment, *FEBS J.* 279 (2012) 1177–1197. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2012.08529.X>.
- [9] A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Proteoglycans in health and disease: Novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting, *FEBS J.* 277 (2010) 3904–3923. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2010.07800.X>.
- [10] I.J. Edwards, Proteoglycans in prostate cancer, *Nat. Rev. Urol.* 2012 94. 9 (2012) 196–206. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.19>.
- [11] C.A. Kirkpatrick, S.B. Selleck, Heparan sulfate proteoglycans at a glance, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 1829–1832. <https://doi.org/10.1242/JCS.03432>.
- [12] D. Soares Da Costa, R.L. Reis, I. Pashkuleva, Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 19 (2017) 1–26. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOENG-071516-044610>.
- [13] K. Solakyildirim, Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 3731–3741. <https://doi.org/10.1007/S00216-019-01722-4/FIGURES/3>.
- [14] U. Barash, V. Cohen-Kaplan, I. Doweik, R.D. Sanderson, N. Ilan, I. Vlodavsky, Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis, *FEBS J.* 277 (2010) 3890–3903. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2010.07799.X>.
- [15] V.L. Gill, U. Aich, S. Rao, C. Pohl, J. Zaia, Disaccharide analysis of glycosaminoglycans using hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1138–1145. https://doi.org/10.1021/AC3030448/SUPPL_FILE/AC3030448_SI_001.PDF.
- [16] J.D. Esko, K. Kimata, U. Lindahl, Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans, *Essentials Glycobiol.* (2009) 1–14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/> (accessed July 28, 2021).
- [17] U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg, L. Kjellen, Regulated diversity of heparan sulfate, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24979–24982. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.39.24979>.
- [18] H.E. Bülow, O. Hobert, The Molecular Diversity of Glycosaminoglycans Shapes Animal Development, <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Cellbio.22.010605.093433>. 22 (2006) 375–407. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.22.010605.093433>.
- [19] K. Baghy, P. Tátrai, E. Regös, I. Kovalszky, Proteoglycans in liver cancer, *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 379. <https://doi.org/10.3748/WJG.V22.I1.379>.
- [20] I.U. Antia, D.R. Yagnik, L. Pantoja Munoz, A.J. Shah, F.A. Hills, Heparan sulfate disaccharide measurement from biological samples using pre-column derivatization, UPLC-MS and single ion monitoring, *Anal. Biochem.* 530 (2017) 17–30. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2017.04.019>.
- [21] M.J. Bissell, D. Radisky, Putting tumours in context, *Nat. Rev. Cancer* 2001 11. 1 (2001) 46–54. <https://doi.org/10.1038/35094059>.
- [22] A. Malmström, B. Bartolini, M.A. Thelin, B. Pacheco, M. Maccarana, Iduronic Acid in Chondroitin/Dermatan Sulfate: Biosynthesis and Biological Function, *J. Histochem. Cytochem.* 60 (2012) 916–925. <https://doi.org/10.1369/0022155412459857>.
- [23] T. Mikami, H. Kitagawa, Biosynthesis and function of chondroitin sulfate, *Biochim. Biophys. Acta - Gen.*

- Subj. 1830 (2013) 4719–4733. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.06.006>.
- [24] S. Ernst, R. Langer, C.L. Cooney, R. Sasisekharan, Enzymatic Degradation of Glycosaminoglycans, [Http://Dx.Doi.Org/10.3109/10409239509083490](http://Dx.Doi.Org/10.3109/10409239509083490). 30 (2008) 387–444. <https://doi.org/10.3109/10409239509083490>.
- [25] H.E. Conrad, Nitrous Acid Degradation of Glycosaminoglycans, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 32 (1995) 17.22.1–17.22.5. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB1722AS32>.
- [26] R.J. Linhardt, Analysis of Glycosaminoglycans with Polysaccharide Lyases, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 48 (1999). <https://doi.org/10.1002/J.1934-3647.1999.TB00002.X>.
- [27] A. Zappe, R.L. Miller, W.B. Struwe, K. Pagel, State-of-the-art glycosaminoglycan characterization, *Mass Spectrom. Rev.* 41 (2022) 1040–1071. <https://doi.org/10.1002/MAS.21737>.
- [28] V. Prabhakar, I. Capila, C.J. Bosques, K. Pojasek, R. Sasisekharan, Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification, *Biochem. J.* 386 (2005) 103–112. <https://doi.org/10.1042/BJ20041222>.
- [29] R. Lawrence, H. Lu, R.D. Rosenberg, J.D. Esko, L. Zhang, Disaccharide structure code for the easy representation of constituent oligosaccharides from glycosaminoglycans, *Nat. Methods* 2008 54. 5 (2008) 291–292. <https://doi.org/10.1038/nmeth0408-291>.
- [30] M. Guerrini, S. Guglieri, A. Naggi, R. Sasisekharan, G. Torri, Low molecular weight heparins: Structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Semin. Thromb. Hemost.* 33 (2007) 478–487. <https://doi.org/10.1055/S-2007-982078/ID/33>.
- [31] W. Mao, C. Thanawiroon, R.J. Linhardt, Capillary electrophoresis for the analysis of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-derived oligosaccharides, *Biomed. Chromatogr.* 16 (2002) 77–94. <https://doi.org/10.1002/BMC.153>.
- [32] N.G. Karlsson, B.L. Schulz, N.H. Packer, J.M. Whitelock, Use of graphitised carbon negative ion LC–MS to analyse enzymatically digested glycosaminoglycans, *J. Chromatogr. B.* 824 (2005) 139–147. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2005.07.014>.
- [33] D.J. Mahoney, R.T. Aplin, A. Calabro, V.C. Hascall, A.J. Day, Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length, *Glycobiology.* 11 (2001) 1025–1033. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/11.12.1025>.
- [34] J. Wu, J. Wei, P. Chopra, G.J. Boons, C. Lin, J. Zaia, Sequencing Heparan Sulfate Using HILIC LC–NETD–MS/MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 11738–11746. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.9B02313/ASSET/IMAGES/LARGE/AC9B02313_0005.JPEG.
- [35] L. Li, M. Ly, R.J. Linhardt, Proteoglycan sequence, *Mol. Biosyst.* 8 (2012) 1613–1625. <https://doi.org/10.1039/C2MB25021G>.
- [36] G.R.C. Santos, A.C.O. Porto, P.A.G. Soares, E. Vilanova, P.A.S. Mourão, Exploring the structure of fucosylated chondroitin sulfate through bottom-up nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry approaches, *Glycobiology.* 27 (2017) 625–634. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWX031>.
- [37] G. Li, J. Steppich, Z. Wang, Y. Sun, C. Xue, R.J. Linhardt, L. Li, Bottom-up low molecular weight heparin analysis using liquid chromatography-fourier transform mass spectrometry for extensive characterization, *Anal. Chem.* 86 (2014) 6626–6632. https://doi.org/10.1021/AC501301V/SUPPL_FILE/AC501301V_SI_001.PDF.
- [38] M. Tajiri, Y. Wada, Infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for quantification of glycosaminoglycans and gangliosides, *Int. J. Mass Spectrom.* 305 (2011) 164–169. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2010.10.029>.
- [39] G. Li, B. Yang, L. Li, F. Zhang, C. Xue, R.J. Linhardt, Analysis of 3-O-sulfo group-containing heparin tetrasaccharides in heparin by liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 455 (2014) 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2014.02.033>.
- [40] A.W. Wong, H. Wang, C.B. Lebrilla, Selection of anionic dopant for quantifying desialylation reactions with MALDI–FTMS, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1419–1425. <https://doi.org/10.1021/AC990956W/ASSET/IMAGES/LARGE/AC990956WF00006.JPEG>.
- [41] K. Ikeda, R. Taguchi, Highly sensitive localization analysis of gangliosides and sulfatides including structural isomers in mouse cerebellum sections by combination of laser microdissection and hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with theoretically expanded multiple reaction monitoring, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2957–2965. <https://doi.org/10.1002/RCM.4716>.
- [42] G. Tóth, K. Vékey, L. Drahos, V. Horváth, L. Turiák, Salt and solvent effects in the microscale chromatographic separation of heparan sulfate disaccharides, *J. Chromatogr. A.* 1610 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460548>.

- [43] J. Zaia, C.E. Costello, Tandem mass spectrometry of sulfated heparin-like glycosaminoglycan oligosaccharides, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2445–2455. https://doi.org/10.1021/AC0263418/SUPPL_FILE/AC0263418_SI.PDF.
- [44] S. Poyer, I. Seffouh, C. Lopin-Bon, J.C. Jacquinet, J.L. Neira, J.Y. Salpin, R. Daniel, Discrimination of sulfated isomers of chondroitin sulfate disaccharides by HILIC-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 7107–7117. <https://doi.org/10.1007/S00216-021-03679-9/FIGURES/6>.
- [45] P. Koivisto, M. Stefansson, Retention studies of sulphated glycosaminoglycan disaccharides on porous graphitic carbon capillary columns, *Chromatogr.* 2003 571. 57 (2003) 37–45. <https://doi.org/10.1007/BF02497475>.
- [46] J. Wei, J. Wu, Y. Tang, M.E. Ridgeway, M.A. Park, C.E. Costello, J. Zaia, C. Lin, Characterization and Quantification of Highly Sulfated Glycosaminoglycan Isomers by Gated-Trapped Ion Mobility Spectrometry Negative Electron Transfer Dissociation MS/MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 2994–3001. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.8B05283/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2018-05283D_0005.JPEG.
- [47] B. Yang, Y. Chang, A.M. Weyers, E. Sterner, R.J. Linhardt, Disaccharide analysis of glycosaminoglycan mixtures by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1225 (2012) 91–98. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.12.063>.
- [48] J.C. Silva, M.S. Carvalho, X. Han, K. Xia, P.E. Mikael, J.M.S. Cabral, F.C. Ferreira, R.J. Linhardt, Compositional and structural analysis of glycosaminoglycans in cell-derived extracellular matrices, *Glycoconj. J.* 36 (2019) 141–154. <https://doi.org/10.1007/S10719-019-09858-2/FIGURES/8>.
- [49] B. Yang, A. Weyers, J.Y. Baik, E. Sterner, S. Sharfstein, S.A. Mousa, F. Zhang, J.S. Dordick, R.J. Linhardt, Ultra-performance ion-pairing liquid chromatography with on-line electrospray ion trap mass spectrometry for heparin disaccharide analysis, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 59–66. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2011.04.003>.
- [50] C.E. Doneanu, W. Chen, J.C. Gebler, Analysis of oligosaccharides derived from heparin by ion-pair reversed-phase chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3485–3499. https://doi.org/10.1021/AC802770R/SUPPL_FILE/AC802770R_SI_001.PDF.
- [51] B. Wang, L.F. Buhse, A. Al-Hakim, M.T.B. Ii, D.A. Keire, Characterization of currently marketed heparin products: Analysis of heparin digests by RPIP-UHPLC–QTOF-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 67–68 (2012) 42–50. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2012.04.033>.
- [52] T. MINAMISAWA, K. SUZUKI, H. MAEDA, S. SHIMOKATA, N. SUGIURA, K. KIMATA, J. HIRABAYASHI, Characterization of Isomeric Unsulfated Glycosaminoglycan Oligosaccharides by Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 55 (2007) 1–6. <https://doi.org/10.5702/MASSSPEC.55.1>.
- [53] R.L. Miller, S.E. Guimond, M. Prescott, J.E. Turnbull, N. Karlsson, Versatile Separation and Analysis of Heparan Sulfate Oligosaccharides Using Graphitized Carbon Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 89 (2017) 8942–8950. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B01417/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-01417Y_0005.JPEG.
- [54] J. Henriksen, L.H. Ringborg, P. Roepstorff, On-line size-exclusion chromatography/mass spectrometry of low molecular mass heparin, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1305–1312. <https://doi.org/10.1002/JMS.723>.
- [55] M.K. Sethi, J. Zaia, Historical Overview of Integrated GAG-omics and Proteomics, (2020) 83–99. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58330-9_5.
- [56] V.L. Gill, U. Aich, S. Rao, C. Pohl, J. Zaia, Disaccharide Analysis of Glycosaminoglycans Using Hydrophilic Interaction Chromatography and Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1138–1145. <https://doi.org/10.1021/AC3030448>.
- [57] L. Turiák, G. Tóth, O. Ozohanics, Á. Révész, A. Ács, K. Vékey, J. Zaia, L. Drahos, Sensitive method for glycosaminoglycan analysis of tissue sections, *J. Chromatogr. A.* 1544 (2018) 41–48. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2018.02.034>.
- [58] G. Tóth, K. Vékey, L. Drahos, V. Horváth, L. Turiák, Salt and solvent effects in the microscale chromatographic separation of heparan sulfate disaccharides, *J. Chromatogr. A.* 1610 (2020) 460548. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2019.460548>.
- [59] G. Tóth, K. Vékey, S. Sugár, I. Kovalszky, L. Drahos, L. Turiák, Salt gradient chromatographic separation of chondroitin sulfate disaccharides, *J. Chromatogr. A.* 1619 (2020) 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460979>.
- [60] Y. Yu, F. Zhang, W. Colón, R.J. Linhardt, K. Xia, Glycosaminoglycans in human cerebrospinal fluid determined by LC-MS/MS MRM, *Anal. Biochem.* 567 (2019) 82–84. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2018.12.013>.
- [61] S. Byers, T. Rozaklis, L.K. Brumfield, E. Ranieri, J.J. Hopwood, Glycosaminoglycan Accumulation and

- Excretion in the Mucopolysaccharidoses: Characterization and Basis of a Diagnostic Test for MPS, *Mol. Genet. Metab.* 65 (1998) 282–290. <https://doi.org/10.1006/MGME.1998.2761>.
- [62] R.A. Dick, S.A.K. Datta, H. Nanda, X. Fang, Y. Wen, M. Barros, Y.-X. Wang, A. Rein, V.M. Vogt, Hydrodynamic and Membrane Binding Properties of Purified Rous Sarcoma Virus Gag Protein, *J. Virol.* 89 (2015) 10371–10382. <https://doi.org/10.1128/JVI.01628-15/ASSET/D91DF20C-403D-4F41-9F80-0B8CB3043CBB/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990908550007.JPEG>.
- [63] Z. Zhang, J. Xie, H. Liu, J. Liu, R.J. Linhardt, Quantification of heparan sulfate disaccharides using ion-pairing reversed-phase microflow high-performance liquid chromatography with electrospray ionization trap mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4349–4355. https://doi.org/10.1021/AC9001707/SUPPL_FILE/AC9001707_SI_001.PDF.
- [64] B. Buszewski, M. Szultka, Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review, <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>. 42 (2012) 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>.
- [65] Y. Seo, M.J. Oh, J.Y. Park, J.K. Ko, J.Y. Kim, H.J. An, Comprehensive Characterization of Biotherapeutics by Selective Capturing of Highly Acidic Glycans Using Stepwise PGC-SPE and LC/MS/MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 6064–6071. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.9B00603/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2019-00603Q_0005.JPEG.
- [66] M.A. Lauber, Y.Q. Yu, D.W. Brousmiche, Z. Hua, S.M. Koza, P. Magnelli, E. Guthrie, C.H. Taron, K.J. Fountain, Rapid preparation of released N-glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5401–5409. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.5B00758/SUPPL_FILE/AC5B00758_SI_001.PDF.
- [67] S. Klapoetke, J. Zhang, S. Becht, X. Gu, 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, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 315–324. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2010.03.045>.
- [68] L. Cao, Y. Zhang, L. Chen, A. Shen, X. Zhang, S. Ren, J. Gu, L. Yu, X. Liang, Sample preparation for mass spectrometric analysis of human serum N-glycans using hydrophilic interaction chromatography-based solid phase extraction, *Analyst.* 139 (2014) 4538–4546. <https://doi.org/10.1039/C4AN00660G>.
- [69] I.J. Ji, S. Hua, D.H. Shin, N. Seo, J.Y. Hwang, I.S. Jang, M.G. Kang, J.S. Choi, H.J. An, Spatially-resolved exploration of the mouse brain glycome by tissue glyco-capture (TGC) and nano-LC/MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2869–2877. https://doi.org/10.1021/AC504339T/SUPPL_FILE/AC504339T_SI_001.PDF.
- [70] G.O. Staples, M.J. Bowman, C.E. Costello, A.M. Hitchcock, J.M. Lau, N. Leymarie, C. Miller, H. Naimy, X. Shi, J. Zaia, A chip-based amide-HILIC LC/MS platform for glycosaminoglycan glycomics profiling, *Proteomics.* 9 (2009) 686–695. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200701008>.
- [71] J. Zhong, A. Banazadeh, W. Peng, Y. Mechref, A carbon nanoparticles-based solid-phase purification method facilitating sensitive MALDI-MS analysis of permethylated N-glycans, *Electrophoresis.* 39 (2018) 3087–3095. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201800254>.
- [72] A. Törnkvist, Aspects of Porous Graphitic Carbon as Packing Material in Capillary Liquid Chromatography, (2003).
- [73] M.C. Hennion, V. Coquart, S. Guenu, C. Sella, Retention behaviour of polar compounds using porous graphitic carbon with water-rich mobile phases, *J. Chromatogr. A.* 712 (1995) 287–301. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00562-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00562-2).
- [74] B.J. Bassler, R. Kaliszan, R.A. Hartwick, Retention mechanisms on metallic stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 461 (1989) 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94283-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94283-3).
- [75] N. Harbeck, F. Penault-Llorca, J. Cortes, M. Gnant, N. Houssami, P. Poortmans, K. Ruddy, J. Tsang, F. Cardoso, Breast cancer, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2019 51. 5 (2019) 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.
- [76] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA. Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.
- [77] L. Irwig, P. Macaskill, N. Houssami, Evidence relevant to the investigation of breast symptoms: the triple test, *The Breast.* 11 (2002) 215–220. <https://doi.org/10.1054/BRST.2001.0409>.
- [78] N. Houssami, Overdiagnosis of breast cancer in population screening: does it make breast screening worthless?, *Cancer Biol. Med.* 14 (2017) 1. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2016.0050>.
- [79] K.B. Kuchenbaecker, J.L. Hopper, D.R. Barnes, K.-A. Phillips, T.M. Mooij, M.-J. Roos-Blom, S. Jervis, F.E. van Leeuwen, R.L. Milne, N. Andrieu, D.E. Goldgar, M.B. Terry, M.A. Rookus, D.F. Easton, A.C. Antoniou, and the B. and B.C. Consortium, L. McGuffog, D.G. Evans, D. Barrowdale, D. Frost, J. Adlard, K. Ong, L. Izatt, M. Tischkowitz, R. Eeles, R. Davidson, S. Hodgson, S. Ellis, C. Nogues, C. Lasset, D.

- Stoppa-Lyonnet, J.-P. Fricker, L. Faivre, P. Berthet, M.J. Hooning, L.E. van der Kolk, C.M. Kets, M.A. Adank, E.M. John, W.K. Chung, I.L. Andrulis, M. Southey, M.B. Daly, S.S. Buys, A. Osorio, C. Engel, K. Kast, R.K. Schmutzler, T. Caldes, A. Jakubowska, J. Simard, M.L. Friedlander, S.-A. McLachlan, E. Machackova, L. Foretova, Y.Y. Tan, C.F. Singer, E. Olah, A.-M. Gerdes, B. Arver, H. Olsson, Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers, *JAMA*. 317 (2017) 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.7112>.
- [80] D. Crivellari, M. Aapro, R. Leonard, G. Von Minckwitz, E. Brain, A. Goldhirsch, A. Veronesi, H. Muss, Breast cancer in the elderly., *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 1882–1890. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.2079>.
- [81] P. Rawla, Epidemiology of Prostate Cancer, *Rev. World J Oncol.* 10 (2019) 63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>.
- [82] A. Atan, Ö. Güzel, How should prostate specific antigen be interpreted?, *Turkish J. Urol.* 39 (2013) 188. <https://doi.org/10.5152/TUD.2013.038>.
- [83] S.T. A.R. Meghan, Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer, *IntechOpen Book Chapters*, 2019.
- [84] C. Parker, E. Castro, K. Fizazi, A. Heidenreich, P. Ost, G. Procopio, B. Tombal, S. Gillesen, Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†, *Ann. Oncol.* 31 (2020) 1119–1134. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.06.011/ATTACHMENT/E9439A84-64B7-42A7-BD81-F1539533B0C8/MMC1.PDF>.
- [85] D.F. Gleason, Histologic grading of prostate cancer: A perspective, *Hum. Pathol.* 23 (1992) 273–279. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90108-F](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90108-F).
- [86] H. Erkkö, B. Xia, J. Nikkilä, J. Schleutker, K. Syrjäkoski, A. Mannermaa, A. Kallioniemi, K. Pylkäs, S.M. Karppinen, K. Rapakko, A. Miron, Q. Sheng, G. Li, H. Mattila, D.W. Bell, D.A. Haber, M. Grip, M. Reiman, A. Jukkola-Vuorinen, A. Mustonen, J. Kere, L.A. Aaltonen, V.M. Kosma, V. Kataja, Y. Soini, R.I. Drapkin, D.M. Livingston, R. Winqvist, A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families, *Nat.* 2006 4467133. 446 (2007) 316–319. <https://doi.org/10.1038/nature05609>.
- [87] D.J. Gallagher, M.M. Gaudet, P. Pal, T. Kirchhoff, L. Balistreri, K. Vora, J. Bhatia, Z. Stadler, S.W. Fine, V. Reuter, M. Zelefsky, M.J. Morris, H.I. Scher, R.J. Klein, L. Norton, J.A. Eastham, P.T. Scardino, M.E. Robson, K. Offit, Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 2115–2121. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2871/347541/P/GERMLINE-BRCA-MUTATIONS-DENOTE-A-CLINICOPATHOLOGIC>.
- [88] G.P. Risbridger, I.D. Davis, S.N. Birrell, W.D. Tilley, Breast and prostate cancer: more similar than different, *Nat. Rev. Cancer* 2010 103. 10 (2010) 205–212. <https://doi.org/10.1038/nrc2795>.
- [89] D.P. De Klerk, D. V. Lee, H.J. Human, Glycosaminoglycans of Human Prostatic Cancer, *J. Urol.* 131 (1984) 1008–1012. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)50750-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)50750-8).
- [90] C. Ricciardelli, K. Mayne, P.J. Sykes, W.A. Raymond, K. McCaul, V.R. Marshall, W.D. Tilley, J.M. Skinner, D.J. Horsfall, Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 983–992. <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/3/6/983/7975/Elevated-stromal-chondroitin-sulfate> (accessed October 3, 2022).
- [91] M. Sobue, E. Sato, M. Shamoto, K. Miura, S. Nakagaki, Variation in Glycosaminoglycan Components of Breast Tumors, *Cancer Res.* 36 (1976) 2133–2139. https://aacrjournals.org/cancerres/article/36/7_Part_1/2133/481498/Variation-in-Glycosaminoglycan-Components-of (accessed October 8, 2022).
- [92] D.P. De Klerk, The glycosaminoglycans of normal and hyperplastic prostate, *Prostate.* 4 (1983) 73–81. <https://doi.org/10.1002/PROS.2990040107>.
- [93] R. Adany, R. Heimer, B. Caterson, J.M. Sorrell, R. V. Iozzo, Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 11389–11396. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38605-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38605-3).
- [94] T.K. Yeo, L. Brown, H.F. Dvorak, Alterations in proteoglycan synthesis common to healing wounds and tumors., *Am. J. Pathol.* 138 (1991) 1437. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1886391/>?report=abstract (accessed October 3, 2022).
- [95] N.A. Cross, S. Chandrasekharan, N. Jokonya, A. Fowles, F.C. Hamdy, D.J. Buttle, C.L. Eaton, The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFβ1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican, *Prostate.* 63 (2005) 269–275. <https://doi.org/10.1002/PROS.20182>.
- [96] M.W. Datta, A.M. Hernandez, M.J. Schlicht, A.J. Kahler, A.M. DeGueme, R. Dhir, R.B. Shah, C. Farach-Carson, A. Barrett, S. Datta, Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway, *Mol. Cancer.* 5 (2006) 1–15. <https://doi.org/10.1186/1476-4598->

- 5-9/FIGURES/6.
- [97] C.Y. Koo, B.H. Bay, P.C.W. Lui, G.M.K. Tse, P.H. Tan, G.W.C. Yip, Immunohistochemical expression of heparan sulfate correlates with stromal cell proliferation in breast phyllodes tumors, *Mod. Pathol.* 2006 1910. 19 (2006) 1344–1350. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800657>.
 - [98] G.A. Losa, G.A. Losa, Partial Characterization of Proteoglycans Nonneoplastic Human Breast Tissues, *Cancer Res.* 51 (1991) 1443–1447. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/51/5/1443/497484/Partial-Characterization-of-Proteoglycans-Isolated> (accessed October 6, 2022).
 - [99] A. Weyers, B. Yang, D.S. Yoon, J.H. Park, F. Zhang, K.B. Lee, R.J. Linhardt, A Structural Analysis of Glycosaminoglycans from Lethal and Nonlethal Breast Cancer Tissues: Toward a Novel Class of Theragnostics for Personalized Medicine in Oncology?, <https://Home.Liebertpub.Com/Omi>. 16 (2012) 79–89. <https://doi.org/10.1089/OMI.2011.0102>.
 - [100] E.B. Olsen, K. Trier, K. Eldov, T. Ammitzbøll, Glycosaminoglycans in human breast cancer, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 67 (1988) 539–542. <https://doi.org/10.3109/00016348809029866>.
 - [101] E. Schonherr, H.T. Jarvelainen, M.G. Kinsella, L.J. Sandell, T.N. Wight, Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells., *Arterioscler. Thromb. A J. Vasc. Biol.* 13 (1993) 1026–1036. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.13.7.1026>.
 - [102] L. Turiák, C. Shao, L. Meng, K. Khatri, N. Leymarie, Q. Wang, H. Pantazopoulos, D.R. Leon, J. Zaia, Workflow for combined proteomics and glycomics profiling from histological tissues, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9670–9678. https://doi.org/10.1021/AC5022216/SUPPL_FILE/AC5022216_SI_006.XLSX.
 - [103] L. Turiák, O. Ozohanics, G. Tóth, A. Ács, Á. Révész, K. Vékey, A. Telekes, L. Drahos, High sensitivity proteomics of prostate cancer tissue microarrays to discriminate between healthy and cancerous tissue, *J. Proteomics.* 197 (2019) 82–91. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2018.11.009>.
 - [104] K. Ogata, Y. Ishihama, CoolTip: Low-Temperature Solid-Phase Extraction Microcolumn for Capturing Hydrophilic Peptides and Phosphopeptides, *Mol. Cell. Proteomics.* 20 (2021) 100170. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100170>.
 - [105] G. Tóth, D. Pál, K. Vékey, L. Drahos, L. Turiák, Stability and recovery issues concerning chondroitin sulfate disaccharide analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 1779–1785. <https://doi.org/10.1007/S00216-021-03152-7/FIGURES/3>.
 - [106] J.K. N Nakamura, Changes in charge density of heparan sulfate isolated from cancerous human liver tissue, *Cancer Res.* (1981).
 - [107] H. Kim, G.L. Xu, A.C. Borczuk, S. Busch, J. Filmus, M. Capurro, J.S. Brody, J. Lange, J.M. D'Armiento, P.B. Rothman, C.A. Powell, The Heparan Sulfate Proteoglycan GPC3 Is a Potential Lung Tumor Suppressor, <https://Doi.Org/10.1165/Rcmb.2003-0061OC>. 29 (2012) 694–701. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2003-0061OC>.
 - [108] K. Narita, J. Chien, S.A. Mullany, J. Staub, X. Qian, W.L. Lingle, V. Shridhar, Loss of HSulf-1 expression enhances autocrine signaling mediated by amphiregulin in breast cancer, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14413–14420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611395200>.
 - [109] G.O. Barbosa, M.F. Biancardi, H.F. Carvalho, Heparan sulfate fine-tunes stromal-epithelial communication in the prostate gland, *Dev. Dyn.* 250 (2021) 618–628. <https://doi.org/10.1002/DVDY.281>.
 - [110] G.K. Tan, Y. Tabata, Chondroitin-6-sulfate attenuates inflammatory responses in murine macrophages via suppression of NF-κB nuclear translocation, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2684–2692. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2014.02.025>.
 - [111] C.A. Cooney, F. Jousheghany, A. Yao-Borengasser, B. Phanavanh, T. Gomes, A.M. Kieber-Emmons, E.R. Siegel, L.J. Suva, S. Ferrone, T. Kieber-Emmons, B. Monzavi-Karbassi, Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells, *Breast Cancer Res.* 13 (2011) R58. <https://doi.org/10.1186/bcr2895>.

7. Függelékek

7.1. Rövidítések, jelölések jegyzéke

ACN – acetonitril

ADNB – adjacent normal breast: környező normál szövet

AmAc – ammónium acetát

bar – 10^5 Pa

BCa – emlőrák

BK – bovine kidney: marha vese

BPH – jóindulatú prosztata megnagyobbodás

C₁₈ – oktadecil láncsal borított szilikagél alapú töltet

CE – kapilláris elektroforézis

CS – kondroitin-szulfát

CSPG – kondroitin-szulfát proteoglikán

DS – dermatán-szulfát

DTT – ditioneitol

ECM – extracelluláris mátrix

EIC – kiválasztott ion kromatogram

ESI – elektroporlasztásos ionizáció

FA – hangyasav

frit – a kapilláris kolonna végét lezáró elem, mely a töltet kiáramlását akadályozza meg

GAG – glükózaminoglikán

Gal – galaktóz

GalNAc – *N*-acetil-galaktózamin

GlcA – glükuronsav

GlcN – glükózamin

GlcNAc – *N*-acetil-glükózamin

HA – hialuronsav

HCl – sósav

Hep – heparin

HexA – glükuronsav vagy iduronsav általános jelölése

ΔHexA – 4,5 pozícióban telítetlen hexuronsav

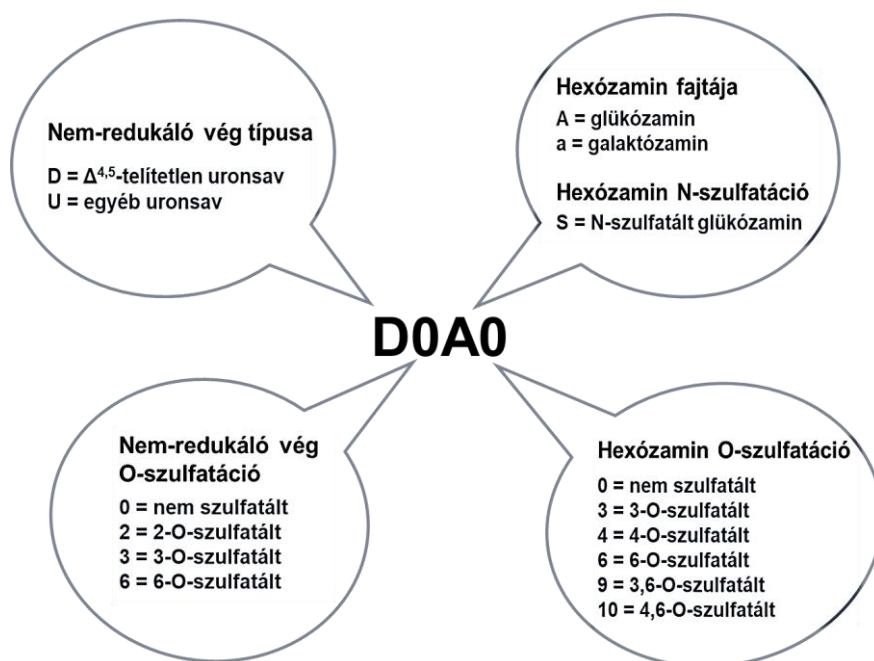
HFBA – heptafluorovajsav

HILIC – hidrofíli interakciós kromatográfia

HILIC-WAX – hidrofíli interakciós kromatográfián és gyenge anioncserén alapuló kombinált mechanizmusú kromatográfia

HPLC – nagy nyomású folyadékkromatográfia
HS – heparán-szulfát
HSPG – heparán-szulfát proteoglikán
IdoA – iduronsav
KS – keratán-szulfát
KSPG – keratán-szulfát proteoglikán
LC – folyadékkromatográfia
MALDI – mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció
MeOH – metanol
MS – tömegspektrométer/tömegspektrometria
MS/MS – tandem tömegspektrometria
mU – milliUnit
m/z – fajlagos tömeg (tömeg/töltés)
nanoUHPLC – nanoliter áramlású nagy nyomású folyadékkromatográfia
NH₃ – ammónia
NH₄FA – ammónium-formiát
NMR – mágneses magrezonancia spektroszkópia
PAGE – poliakrilamid gél elektroforézis
PCa – prosztatatarák
PCA – főkomponens-analízis
PG – proteoglikán
PGC – porózus grafit
PIM – porcine intestinal mucosa: sertésbélhám
PSA – prosztata specifikus antigén
RP-HPLC – fordított fázisú folyadékkromatográfia
RP-IP-HPLC – fordított fázisú ionpárképzéses folyadékkromatográfia
rpm – fordulat per perc
RT – szobhőmérséklet
SEC – méretkizárásos kromatográfia
SPE – szilárd fázisú extrakció
TFA – trifluorecetsav
TIC – teljes ionáram kromatogram
UHPLC – ultranagy nyomású (hatékonyságú) folyadékkromatográfia
WAX – gyenge anioncserés kromatográfia

7.2. A Lawrence kód értelmezése



F-1. ábra A Lawrence-kód betűjeleinek értelmezése.

7.3. Prostatatárakos és emlőrákos betegségek vizsgálatánál felhasznált szövetminták betegadatai

F-1. táblázat Heparán-szulfát vizsgált prostatatárakos szövetmetszetek betegadatai.

mintakód	szövettypus	életkor a diagnóziskor	grádus	tumoros sejtarány [-]
BPH_1	BPH			
BPH_2	BPH			
BPH_3	BPH			
BPH_4	BPH			
BPH_5	BPH			
BPH_6	BPH			
BPH_7	BPH			
BPH_8	BPH			
PCa_1	PCa	60	3	0,65
PCa_2	PCa	65	3	0,50
PCa_3	PCa	60	3	0,65
PCa_4	PCa	67	2	0,60
PCa_5	PCa	64	3	0,35
PCa_6	PCa	74	2	0,50
PCa_7	PCa	71	2	0,40
PCa_8	PCa	58	3	0,70

F-2. táblázat Heparán-szulfát vizsgált emlőrákos szövetmetszetek betegadatai.

mintakód	szövettypus	életkor a diagnóziskor	grádus	BCa/normál sejtarány [-]
EN_1	ADNB	88		
EN_2	ADNB	67		
EN_3	ADNB	62		
EN_5	ADNB	60		
EN_6	ADNB	74		
EN_7	ADNB	50		
EN_9	ADNB	45		
EN_10	ADNB	54		
ET_1	BCa	88	3	0,80
ET_2	BCa	67	2	0,50
ET_3	BCa	62	3	0,50
ET_4	BCa	80	2	0,50
ET_5	BCa	74	2	0,60
ET_7	BCa	60	3	0,60
ET_8	BCa	68	2	0,40
ET_9	BCa	66	3	0,60

F-3 táblázat Kondroitin-szulfát vizsgált prosztatarákos szövetmetszetek betegadatai.

mintakód	szövettypus	életkor a diagnóziskor	grádus	tumoros sejtarány [-]
BPH_1	BPH			
BPH_2	BPH			
BPH_3	BPH			
BPH_4	BPH			
BPH_5	BPH			
BPH_6	BPH			
BPH_7	BPH			
BPH_8	BPH			
PCa_4	RadPE	67	2	0,60
PCa_8	RadPE	58	3	0,70
PCa_9	RadPE	67	3	0,85
PCa_1	RadPE	60	3	0,65
PCa_5	RadPE	64	3	0,35
PCa_7	RadPE	71	2	0,40
PCa_6	RadPE	74	2	0,50
PCa_2	RadPE	65	3	0,50

F-4 táblázat Kondroitin-szulfát vizsgált emlőrákos szövetmetszetek betegadatai.

mintakód	szövettypus	életkor a diagnóziskor	grádus	BCa/normál sejtarány [-]
EN_1	ADNB	88		
EN_2	ADNB	67		
EN_5	ADNB	60		
EN_6	ADNB	74		
EN_7	ADNB	50		
EN_8	ADNB	35		
EN_9	ADNB	45		
EN_10	ADNB	54		
ET_1	BCa	88	3	0,80
ET_2	BCa	67	2	0,50
ET_3	BCa	62	3	0,50
ET_4	BCa	80	2	0,50
ET_5	BCa	74	2	0,60
ET_7	BCa	60	3	0,60
ET_8	BCa	68	2	0,40
ET_9	BCa	66	3	0,60

7.4. Prosztata és emlő vizsgált szövetek páronkénti összehasonlítása során elvégzett statisztikai tesztek és próbákhoz tartozó *p*-értékek

F-5. táblázat Heparán-szulfát vizsgálatok során a végzett statisztikai tesztek.

		relatív mennyiségek						átlagos szulfatáció mértéke	mono N/O szulfatáció aránya	di N/O szulfatáció aránya	össz. N/O szulfatáció aránya
		D0A0	D2A0-D0A6	D0S0	D2A6	D2S0-D0S6	D2S6				
elvégzett tesztek											
BPH vs. ADNB	Welch t-test	Student t-test	Student t-test	Student t-test	Welch t-test	Student t-test	Welch t-test	Student t-test	Student t-test	Student t-test	Wilcoxon-test
BPH vs. PCa	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Student t-test	Wilcoxon-test	Student t-test	Student t-test	Student t-test	Welch t-test	Student t-test	Welch t-test	Student t-test
ADNB vs. BCa	Student t-test	Student t-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Student t-test	Student t-test	Student t-test	Student t-test	Wilcoxon-test	Student t-test	Wilcoxon-test
PCa vs. BCa	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Welch t-test	Student t-test	Welch t-test	Welch t-test	Wilcoxon-test	Welch t-test	Student t-test

F-6. táblázat Kondroitin-szulfát vizsgálatok során a végzett statisztikai tesztek.

		relatív mennyiségek				átlagos sszulfatáció mértéke	6S/4S arány
		D0a0	D0a4	D0a6	D0a10		
összmennyiség		elvégzett tesztek					
BPH vs. ADNB	Welch t-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Student t-test
BPH vs. PCa	Welch t-test	Student t-test	Student t-test	Student t-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Student t-test
ADNB vs. BCa	Student t-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Student t-test
PCa vs. BCa	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Student t-test	Wilcoxon-test	Wilcoxon-test	Welch t-test

F-7. táblázat Heparán-szulfát vizsgálatok során a végzett statisztikai tesztekhez tartozó *p*-értékek.

összmennyiség		relatív mennyiségek						átlagos szulfatáció mértéke	mono N/O szulfatáció aránya	di N/O szulfatáció aránya	össz. N/O szulfatáció aránya
		D0A0	D2A0-D0A6	D0S0	D2A6	D2S0-D0S6	D2S6				
p-értékek											
BPH vs. ADNB	8,19E-03	3,24E-05	1,12E-01	1,22E-02	4,84E-06	8,23E-01	1,43E-06	6,64E-06	7,03E-02	6,02E-15	9,32E-03
BPH vs. PCa	2,81E-02	2,24E-03	3,17E-01	1,00E+00	1,68E-02	9,91E-02	7,30E-02	2,45E-02	7,74E-01	5,48E-02	7,42E-01
ADNB vs. BCa	1,08E-02	1,91E-01	1,12E-01	1,57E-01	1,16E-02	9,91E-02	7,61E-03	2,67E-02	7,58E-02	4,48E-02	1,26E-01
PCa vs. BCa	4,66E-04	3,11E-04	1,12E-01	1,57E-01	4,84E-06	2,26E-01	4,77E-06	2,47E-05	7,74E-01	1,51E-08	5,58E-03

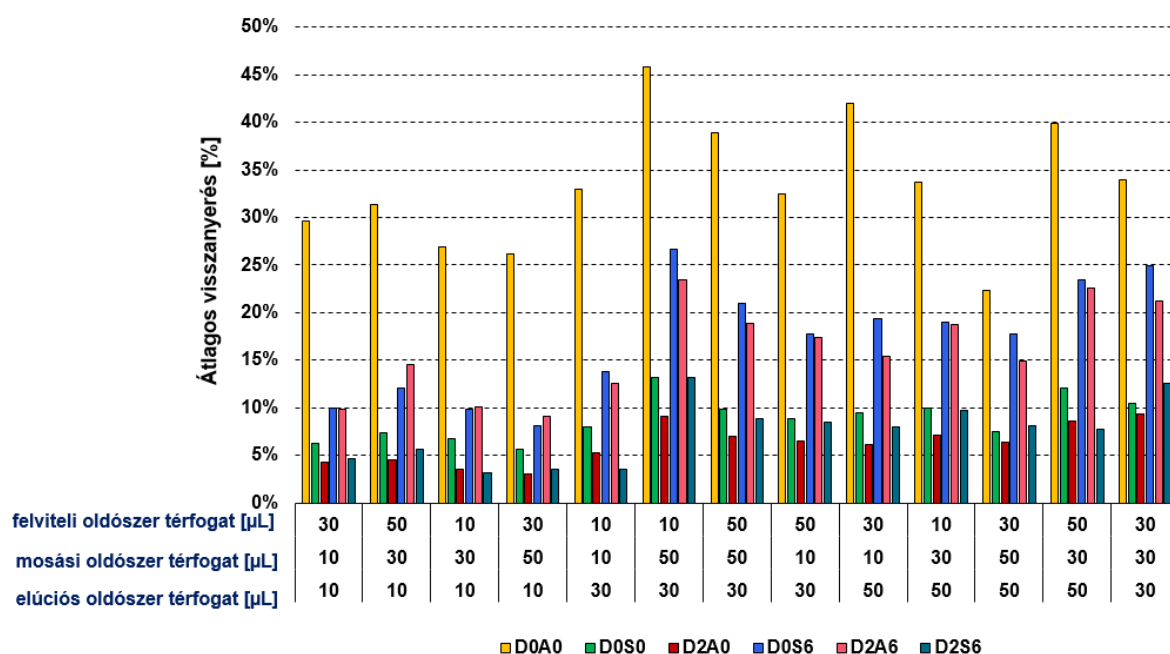
F-8. táblázat Kondroitin-szulfát vizsgálatok során a végzett statisztikai tesztekhez tartozó *p*-értékek.

		relatív mennyiségek				átlagos szulfatáció mértéke	X6S 4S arány
		RD0a0	RD0a4	RD0a6	RD0a10		
összmennyiség		p-értékek					
BPH vs ADNB	2,79E-03	2,08E-02	2,10E-02	2,08E-02	2,80E-02	2,08E-02	2,88E-01
BPH vs PCa	1,62E-02	2,48E-01	1,16E-01	5,91E-01	5,63E-02	5,99E-02	1,72E-01
ADNB vs BCa	2,79E-03	1,12E-02	1,77E-02	1,12E-02	5,63E-02	1,77E-02	2,36E-01
PCa vs BCa	2,79E-03	4,46E-02	3,03E-02	6,56E-02	1,24E-01	5,99E-02	7,15E-02

7.5. HS és CS vatta-HILIC módszerfejlesztés

F-9. táblázat A HS fejlesztés térfogatoptimalás során alkalmazott Box-Bhenken kísérletterv beállításai.

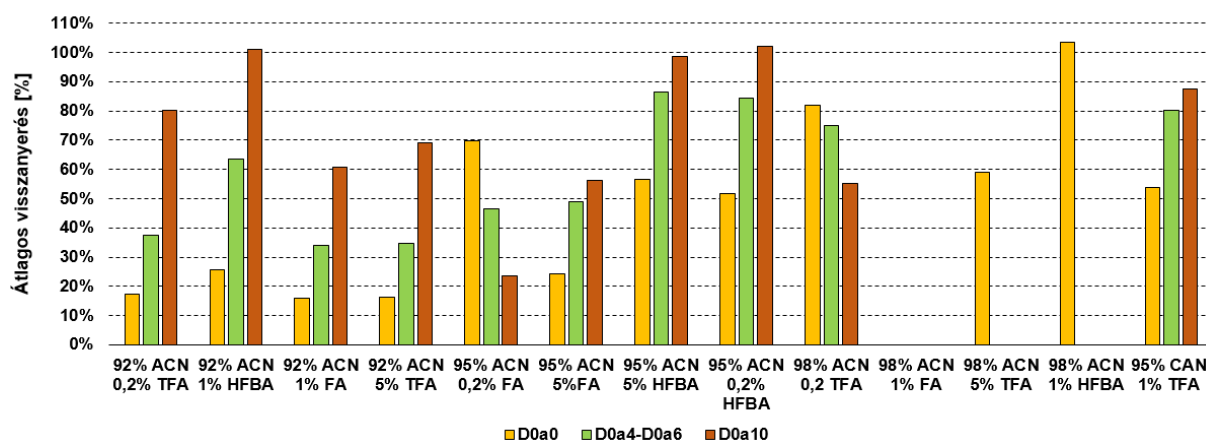
kísérletterv pontjai	Faktor beállítása			felviteli oldószer térfogat [μL]	mosási oldószer térfogat [μL]	elúciós oldószer térfogat [μL]
	1. faktor	2. faktor	3.faktor			
1	-1	-1	0	10	10	30
2	-1	0	1	10	30	50
3	-1	0	-1	10	30	10
4	-1	1	0	10	50	30
5	0	-1	-1	30	10	10
6	0	1	-1	30	50	10
7	0	1	1	30	50	50
8	0	-1	1	30	10	50
9	1	-1	0	50	10	30
10	1	0	-1	50	30	10
11	1	1	0	50	50	30
12	1	0	1	50	30	50
13	0	0	0	30	30	30



F-2. ábra A Box-Behnken terv alapján végrehajtott felviteli térfogat optimalás átlagos visszanyerései.

F-10. táblázat A CS fejlesztés felviteloptimalás során alkalmazott Box-Bhenken kísérletterv beállításai.

kísérletterv pontjai	Faktor beállítása			ACN tartalom [%]	alkalmazott sav mennyisége [%]	alkalmazott sav minősége
	1. faktor	2. faktor	3.faktor			
1	-1	-1	0	92	0,2	TFA
2	-1	0	1	92	1	HFBA
3	-1	0	-1	92	1	FA
4	-1	1	0	92	5	TFA
5	0	-1	-1	95	0,2	FA
6	0	1	-1	95	5	FA
7	0	1	1	95	5	HFBA
8	0	-1	1	95	0,2	HFBA
9	1	-1	0	98	0,2	TFA
10	1	0	-1	98	1	FA
11	1	1	0	98	5	TFA
12	1	0	1	98	1	HFBA
13	0	0	0	95	1	TFA

**F-3. ábra** A Box-Behnken terv alapján végrehajtott felviteli oldószerösszetétel optimalás átlagos visszanyerései.

7.6. Proteomikai vizsgálatok

7.6.1. Fehérjék szövetfelületi emésztése és tisztítása

A szövetfelületi emésztéshez a kutatócsoport által kidolgozott módszert alkalmaztuk. A folyamat első lépésében a fehérjéket RapiGest oldattal denaturáltuk és DTT-vel redukáltuk (3 μ L, 0,1% RapiGest + 5 mM DTT + 20% glicerín), majd párasított dobozban 55 °C-on 20 percig inkubáltuk. A mintákat jód-acetammal (3 μ L, 25 mM ABC + 10 mM jód-acetamid + 20% glicerín) alkiláltuk és 20 percig laborhőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Az első emésztési lépés során két ciklusban Lys-C + tripszin keveréket (3 μ L, Tripszin/LysC keverék: 40 ng/ μ L 50 mM ABC + 15% glicerín) alkalmaztunk, majd párasított dobozban 37 °C-on 40 percig inkubáltuk. Ezt követően három ciklusban tripszin oldattal (3 μ L, Tripszin: 100 ng/ μ L 50 mM ABC + 15% glicerín) emésztettük. Az egyes lépések között ebben az esetben is párasított dobozban inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 40 percig.

Az emésztést követően a peptideket kivontuk a felületről 5 x 3 μ L 10%-os ecetsav alkalmazásával. A keletkező peptideket Thermo Pierce C₁₈ SPE töltet alkalmazásával tisztítottuk a gyártói ajánlásoknak megfelelően. A C₁₈-as tisztítás után a mintákat bepároltuk és –20°C-on tároltuk.

7.6.2. Fordított fázisú nanoUHPLC-MS/MS mérések

A proteomikai mérésekhez használt műszer Dionex Ultimate 3000 RSLC nanoUHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) kromatográfiával kapcsolt Bruker Maxis II QTOF hibrid kvadrupól-repülési idő analizátorral rendelkező tömegspektrométer (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) volt.

A csapdázó oszlop: 100 μ m x 20 mm Nano Trap kolonna Acclaim PepMap100 C₁₈ töltettel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) volt, míg az elválasztásra használt kolonna Acquity M-Class BEH130 C₁₈ kapilláris kolonna; 1,7 μ m, 75 μ m x 250 mm (Waters, Milford, MA). A kolonnák 48 °C-on voltak termosztálva. A csapdázó eluens 0,1% TFA, 0,01% HFBA vizes oldata, az elválasztás során alkalmazott eluensek **A**: víz és 0,1% FA, **B**: ACN és 0,1% FA voltak. Az elválasztáshoz alkalmazott gradiens program (300 nL/min) a következő volt: 0–11 perc alatt 4% B (izokratikus szakasz), 86 perc alatt 25% B, 101 perc alatt 40% B, 102–107 perc között 90% B izokratikus mosás, 108–128 perc között 4% B ekvilibrálás.

A CaptiveSpray nanoBooster ionforrást pozitív ionizációs módban alkalmaztuk, 1,36 kV kapilláris feszültséggel, valamint 0,2 bar gáznyomással. A szárító gáz sebessége 3 L/perc, hőmérséklete 180 °C volt. A tömegspektrumokat 2,5 másodperces ciklusidővel vettük fel a 150–2200 *m/z* tartományban. Az MS spektrumokat 3 Hz gyakorisággal vettük fel, míg az ütközés indukált disszociációs fragmentáció után a nagy intenzitású prekursorokból származó

ionokat 16 Hz, míg a kis intenzitású prekursorból származó ionokat 4 Hz gyakorisággal vettük fel. Az egyszeres töltésű peptideket kizártuk az analízisből. Az ütközési energiát a vezérlő szoftver határozta meg az m/z és a töltés alapján.

7.6.3. Proteomikai mérési eredmények adatértékelése

A mintában található fehérjék azonosítását **Byonic 3.8.13** szoftver alkalmazásával végeztük. A választott hasítási hely: Lizin és Arginin aminosavak C-terminálisán, teljes specifikussággal, 2 kihagyott hasítással. A megadott módosítások: deamidáció, karbamidometiláció és oxidáció. A fragmens m/z tolerancia 0,02 Da, a fehérjeazonosítás követelménye legalább 2 egyedi peptid volt. Ezután a fehérjék jelölésmentes mennyiségi meghatározására (LFQ) a MaxQuant v1.6.17.0 szoftvert használtuk. A **MaxQuant** a fehérjék azonosítását az Andromeda-val hajtja végre. A kvantifikálás során az alapbeállításokat alkalmaztuk, melyekhez a legfontosabb paraméterek az *F-11. táblázatban* láthatók.

F-11. táblázat A MaxQuant program részletes beállításai.

Adatbázis	Byonic által azonosított fehérjék
Quantification	LFQ
Előkeresés m/z tolerancia	20 ppm
Főkeresés m/z tolerancia	10 ppm
Max. töltés	4
Intenzitásküszöb MS1	30
Intenzitásküszöb MS2	30
Enzim	tripszin
Max. kihagyott hasítási hely	2
Változó módosítás	oxidáció (M), deamidáció (NQ)
Fix módosítás	karbamidometiláció (C)
Min. peptidhossz	7
Max. peptidtömeg	4600 Da
Azonosítás javítása	“match between runs”