

# Fukozilált humán glikoproteinek szerkezetvizsgálata tandem tömegspektrometriával

Doktori értekezés

**Ács András**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vékey Károly, D.Sc., professor emeritus  
Dr. Telekes András, C.Sc., címzetes egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Takátsy Anikó, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Zelkó Romána, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Háda Viktor, Ph.D., csoportvezető  
Dr. Riba Pál, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2019

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
I. Bevezetés.....	7
I.1. Glikoziláció .....	9
I.1.1. Az <i>N</i> -glikoproteinek szintézise és szerkezete .....	11
I.1.2. <i>N</i> -glikoziláció biológia jelentősége.....	14
I.2. A fukoziláció .....	14
I.2.1. A fukoziláció karakterizálása.....	15
I.2.1.1. A fukóz szubsztituensek száma.....	15
I.2.1.2. A fukozilált glikánok relatív mennyisége .....	15
I.2.1.3. A fukóz elhelyezkedése.....	16
I.2.2. A fukóz pozíciójának meghatározása .....	18
I.2.2.1. Lektinek.....	18
I.2.2.2. A cukor-oldallánc enzimatis hasítása .....	19
I.2.2.3. Származékképzés .....	20
I.2.2.4. Glikopeptid-analízis .....	21
I.3. Glikopeptidek tömegspektrometriás szerkezetvizsgálata .....	22
I.3.1. Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria.....	22
I.3.2. Fragmentációs mechanizmusok.....	24
I.4. A vizsgált fehérjék.....	26
I.4.1. Prostatata Specifikus Antigén (PSA, Prostate Specific Antigen) .....	26
I.4.2. $\alpha$ 1-savas glikoprotein (AGP, Alpha-1-acid glycoprotein).....	28
II. Célkitűzések.....	29
III. Módszerek .....	30
III.1. Anyagok.....	30
III.2. Enzimatis emésztés .....	30

III.3. Nano LC-MS/MS.....	31
III.4. Glikozilációs analízis .....	33
III.5. Kiértékelés .....	34
IV. Eredmények.....	35
IV.1. A core-fukoziláció vizsgálata .....	35
IV.2. Az antenna-fukoziláció vizsgálata.....	40
IV.3. Többszörösen fukozilált AGP glikoformok szerkezeti jellemzése.....	43
V. Megbeszélés.....	48
V.1. A core-fukoziláció azonosítása .....	48
V.2. Az antenna-fukoziláció azonosítása.....	52
V.3. Többszörösen fukozilált AGP glikoformok azonosítása .....	55
VI. Következtetések.....	57
VII. Összefoglalás .....	59
VIII. Summary.....	60
IX. Irodalomjegyzék.....	61
X. Saját publikációk jegyzéke .....	75
X.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények.....	75
X.2. Egyéb közlemények .....	76
XI. Köszönetnyilvánítás .....	78

**Rövidítések jegyzéke**

AA	antranilsav (Anthranilic Acid)
AAL	Aleuria aurantia lektin
ADCC	antitest-függő celluláris citotoxicitás (Antibody-dependent cellular cytotoxicity)
AFP	alpha-fetoprotein
AGP	$\alpha$ 1-savas glikoprotein (Alpha-1-acid glycoprotein)
AMF	mandulalisztból izolált fukozidáz (Almond Meal Fucosidase)
Asn	aszparagin
BKF	szarvasmarha-veséből izolált fukozidáz (Bovine Kidney Fucosidase)
BPH	jóindulatú prosztatata-megnagyobbodás (Benign Prostate Hyperplasia)
CaCl <sub>2</sub>	kalcium-klorid
CAZy	(Carbohydrate-Active Enzymes)-adatbázis
CDG	a glikoziláció veleszületett zavarai (Congenital disorders of glycosylation)
CID	ütközés indukált disszociáció (Collision-induced dissociation)
CLL	krónikus limfoid leukemia
CQA	kritikus minőségi jellemző (Critical Quality Attribute)
Cys	cisztein
DTT	1,4-ditiotreitol
EIC	extrahált ionkromatogram (Extracted Ion Chromatogram)

ESI	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization)
F	fukóz, Fuc
FA	hangyasav (Formic Acid)
Fuc	fukóz, F
FUT	Fukoziltranszferáz
Gal	galaktóz
GalNAc	N-acetil-galaktózamin
GH	glikozidáz (glycosidase, Glycoside Hydrolase)
GlcNAc	N-acetil-glükózamin, N
GPI	glikozil-foszfatidil-inozitol
GT	glikozil-transzferáz (glycosyltransferase)
H	hexóz
IAA	jódacetamid
IgG	Immunglobulin G
LCA	Lens culinaris agglutinin
LC-MS	folydékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)
m/z	tömeg/töltés (mass-to-charge ratio)
M <sup>3+</sup>	háromszorosan protonált molekulaion
MAB	terápiás célú monoklonális antitest (Monoclonal antibody)
Man	mannóz
MS	tömegspektrometria (Mass Spectrometry)
MS/MS	tandem tömegspektrometria
N	N-acetil-glükózamin, GlcNAc

nanoUPLC	nanoáramlásos ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia (Ultra Performance Liquid Chromatography)
NeuAc	sziálsav, S
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	ammónium-bikarbonát
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance)
Pca	prosztata-daganat (Prostate cancer)
PhoSL	Pholiota squarrosa lektin
PNGaseF	peptid N-endoglikozidáz F (Peptide N-Glycosidase F)
PSA	Prosztata Specifikus Antigén (Prostate Specific Antigen)
PTM	poszt-transzlációs módosítás (Post-translational modification)
Q	kvadrupól analízátor (Quadrupole analyzer)
Rapigest SF	liofilizált nátrium-3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolán-4-il)-metoxil]-1-propán-szulfonát
RNase 2	Ribonukleáz-2
RPC	fordított fázisú kromatográfia (Reversed-Phase Chromatography)
S	sziálsav, NeuAc
Ser	szerin
T antigén	Thomsen-Fridenreich antigén
Thr	treonin
TOF	repülési idő analízátor (Time of Flight analyzer)
Trp	triptofán

## I. Bevezetés

Az elmúlt évtizedek kutatómunkája rávilágított, hogy a gének által kódolt fehérjék a biológiai funkciók sokszínűségét talán még jobban reprezentálják, mint maguk a gének. A fehérjék szerkezetének, funkciójának tanulmányozásával és mennyiségi meghatározásával foglalkozó tudományág a proteomika.[1, 2] A humán genomot körülbelül 25.000 gén alkotja, míg a fehérjék számát több mint 1.000.000-ra becsülik.[3] A fehérjék szerkezete és funkciója még tovább módosulhat különböző poszt-transzlációs módosítások hatására. Jelenleg több mint 200 különböző poszt-transzlációs módosítást ismerünk, ezek közül az egyik leggyakoribb típus a glikoziláció.[4] Fehérjék szerkezetvizsgálatának fontos eleme a glikoziláció jellemzése. A modern technológiai fejlesztések lehetővé teszik az adott fehérjéhez kapcsolódó cukorláncok szerkezetének és pozíciójának pontos felderítését. Kutatómunkám során a fukóz szubsztituens elhelyezkedését vizsgáltam *N*-glikozilált fehérjéken.

Egy fehérje glikozilációs mintázatának vizsgálatára számos, széles körben elterjedt módszer létezik. Ezen technikákat rendszeresen alkalmazzák biológiai eredetű gyógyszerkészítmények minőségellenőrzésére és a biomarker kutatásában is. A fukozilált glikoformok mennyiségi változását számos biológiai folyamatban leírták, de a fukóz pozícióját csak néhány esetben határozták meg. Arról is csak nagyon kevés információ található az irodalomban, hogy a fukóz mindig ugyanazon helyen található, vagy ez változhat biológiai folyamatok során. Ennek fő oka, hogy a fukóz helyének meghatározása nem triviális, nincsenek rutinszerűen alkalmazott módszerek. A fukóz pozíciója alapján megkülönböztethetünk core- és antenna-fukozilációt. Munkám során core- és antenna-fukozilált modellvegyületek energiafüggő fragmentációját vizsgáltam tömegspektrometriával. Az egyes fragmentációs folyamatokat letörési görbékkel (breakdown curves) és egyenletekkel jellemeztem. A spektrumok elemzésével sikerült mindkét típusú fukoziláció esetében olyan ún. diagnosztikus fragmenseket azonosítani, melyek jelenlétéből és egymáshoz viszonyított arányából egyértelműen következtetni lehet a fukóz pozíciójára. Az kidolgozott módszer segítségével azonosítottam egy ritka, bifukozilált glikoform szerkezetét. A módszer könnyedén beilleszthető az elterjedt proteomikai munkafolyamatokba, nem igényel plusz mintaelőkészítést. Emellett a technika gyakorlatilag bármely fehérje esetében alkalmazható. Az értekezésben a

módszer fejlesztésének ismertetése mellett szeretném bemutatni a glikoziláció, azon belül is részletesen az *N*-glikoziláció és a fukoziláció bioszintézisét és jellemző tulajdonságait, valamint a glikoproteinek tömegspektrometriás szerkezetvizsgálatának menetét és elméleti háttérét. Kutatómunkámat a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontjában a Dr. Drahos László által vezetett MS Proteomika Kutatócsoportban végeztem, Prof. Vékey Károly és Prof. Telekes András útmutatásával. Az értekezéshez útravalóul egy kedvelt idézetet szeretnék megosztani:

„- *És miért kellett mindezt elrejteni? - érdeklődött*

- *Ez a felfedezés csodája és kalandja, része annak, amit ti tudománynak neveztek: kikutatni és észrevenni mindazt, amit mi elrejtettünk előletek, hogy ti megtalálhassátok. Miért szeretnek a gyerekek bújócskát játszani? Kérdezz meg bárkit, akinek szenvedélye a kutatás, a felfedezés és az alkotás! Szeretetből rejtettünk el előletek olyan sok csodát, hogy ajándékként megtalálhassátok ezeket életek folyamán.* ”

*W.P.Young - A viskó című műve alapján*



## I.1. Glikoziláció

A glikoziláció az egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosítás, hozzávetőleg a humán fehérjék 50 százaléka glikozilált.[5] A poszt-transzlációs módosítás során egy meghatározott aminosavhoz kovalensen kötődik egy molekulacsoport. Definíció szerint a glikoziláció szacharidok enzim kontrollált addíciója fehérje vagy lipid molekulákhoz. Fontos elkülöníteni a glikozilációt a glikáció folyamatától, amely során monoszacharidok (pl. glükóz, fruktóz) véletlenszerűen, nem-enzimatis úton, kovalensen kötődnek lipidekhez és fehérjékhez. A glikoproteomika tudományága a fehérje glikoziláció szerepét vizsgálja különböző biológiai folyamatokban. Glikoproteineknek nevezzük a fehérjék azon csoportját, melyeknél a fehérjelánc meghatározott aminosavához egy oligoszacharid oldallánc kapcsolódik. A glikán kifejezés a cukor-oldallánc szerkezetére utal. Ez tipikusan változó számú, különböző monoszacharidokból áll, melyek glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Az értekezésben a glikán, cukor-oldallánc és oligoszacharid lánc kifejezéseket szinonimaként használok. Egy adott fehérjének számos glikoformja van. Glikoformként jelöljük az egy adott cukor-oldallánccal rendelkező fehérjét. A glikozilációs mintázat az adott helyen előforduló glikoformok egymáshoz viszonyított relatív arányát jelöli. Ezt lehet értelmezni egy adott fehérje meghatározott glikozilációs helyére, az egész fehérjére vagy egy komplex biológiai minta (pl. plazma, vizelet, synoviális folyadék) esetén is. A cukorlánc kapcsolódási pontja és összetétele alapján a glikoproteineket különböző csoportokba sorolhatjuk: *N*-glikoziláció, *O*-glikoziláció, Foszfoglikoziláció, *C*-mannoziláció és Glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI)-horgony. Egy adott fehérje több glikozilációs helyet is tartalmazhat és a glikozilációs helyek típusa eltérő lehet. Bár a glikoziláció gyakorlatilag az élet minden formájának jellemző tulajdonsága, nem minden típusa fordul elő az összes fajban. A glikoziláció leggyakoribb típusai az *N*- és az *O*-glikoziláció, a többi glikozilációs típus nagyságrendekkel ritkábban fordul elő. Az 1. táblázat bemutatja a glikoziláció típusait és rövid jellemzését.

1. táblázat A glikoziláció típusai és előfordulása

<b>Glikoziláció típusa</b>	<b>Kapcsolódási hely</b>	<b>Előfordulás</b>	<b>Példák</b>
<b>N-glikoziláció</b>	Aszparagin nitrogénje	eukarióták, archeák, ritkán baktériumokban	Prosztata Specifikus Antigén (PSA), alpha-fetoprotein (AFP)
<b>O-glikoziláció</b>	Szerin, treonin, tirozin, hidroxilizin, hidroxiprolin hidroxilcsoportjának oxigénje	eukarióták, archeák, baktériumok	Humán ABO vércsoport-antigének, kollagén
<b>Foszfoglikoziláció</b>	foszfoszerin foszfát-csoportja	egér, paraziták (Leishmania mexicana, Trypanosoma cruzi)	Trypanosoma cruzi foszfoglikoproteinek[6]
<b>C-mannoziláció</b>	Triptofán szénatomja	eukarióták	1. típusú trombospondin ismétlődés szupercsalád (TSP)[7]
<b>Glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI)-horgony (glypiation)</b>	C-terminálishoz kovalensen kötődik	eukarióták, archeák,	Trypanosoma brucei variáns felületi glikoprotein[8]

Az *N*-glikoziláció, az *O*-glikoziláció mellett, a leggyakrabban vizsgált glikozilációs típus. A cukor-oldallánc az aszparagin aminosav nitrogénjéhez kapcsolódik. Az aminosavak konszenzus szekvenciája Asn-X-Ser/Thr, ritkán Cys (Asn: aszparagin, Ser: szerin, Thr: treonin, Cys: cisztein). Az X pozícióban prolin kivételével bármelyik aminosav elhelyezkedhet. Széleskörűen elterjedt eukariótákban és archeákban, de baktériumokban ritka. A cukor-oldalláncokat szerkezetük alapján három fő csoportba sorolhatjuk: high-mannose (magas-mannóz tartalmú), komplex és hibrid.

Az *O*-glikoziláció esetén nincs konszenzus szekvencia, de leggyakrabban szerin vagy treoninhoz kapcsolódik, ritkábban hidroxilizinhez vagy hidroxiprolinhoz. A cukor-oldallánc hidroxil-csoport oxigénjén keresztül kapcsolódik a fehérjéhez. Az *O*-glikoproteinek bioszintézise a cisz-Golgi hálózatban (cis-Golgi network) történik. Az *O*-glikánok olyan monoszacharidokat is tartalmazhatnak, melyek az *N*-glikozilációban nem találhatóak meg, ilyen például a xilóz vagy a glükuronsav. Az *O*-glikánok komplexitása jellemzően kisebb az antennák számát illetően, mint az *N*-glikánoké. Az *O*-glikánok legjobban ismert képviselői a humán ABO vércsoport antigénjei és a T antigén (Thomsen-Fridenreich antigén).

Foszfoglikoziláció esetén a cukor-oldallánc foszfodiészter kötéssel kapcsolódik szerinhez vagy treoninhoz. Ezt a típust több *Trypanosoma* fajban is sikerült azonosítani.[9]

A C-mannoziláció a mannóz addícióját jelöli a triptofán szénatomjához. Kettő konszenzus szekvenciát írtak le: Trp-X-X-Trp, ahol az X bármelyik aminosav lehet és akár mindkét triptofán is mannozilálódhat, és Trp-Ser/Thr-X-Cys (Trp: triptofán). C-mannozilációt tartalmazó ismertebb fehérjék az interleukin-12 és az Ribonukleáz-2 (RNase 2).

A glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI)-horgony a fehérjék C-terminálisához kapcsolódik. A GPI-horgony vége (tail) egy hidrofób foszfátidil-inozitol csoportból áll, melyhez egy core (mag) glikán struktúra kapcsolódik, ami egy foszfoetanolamin csoporttal kötődik a fehérje C-terminálisához. A sejtmembrán felszíni glikoproteinek nagy része tartalmazza ezt glikoziláció típust.

Munkám során a fukozilációt *N*-glikozilált fehérjéken vizsgáltam, ezért a további fejezetekben az *N*-glikoziláció tulajdonságait ismertetem.

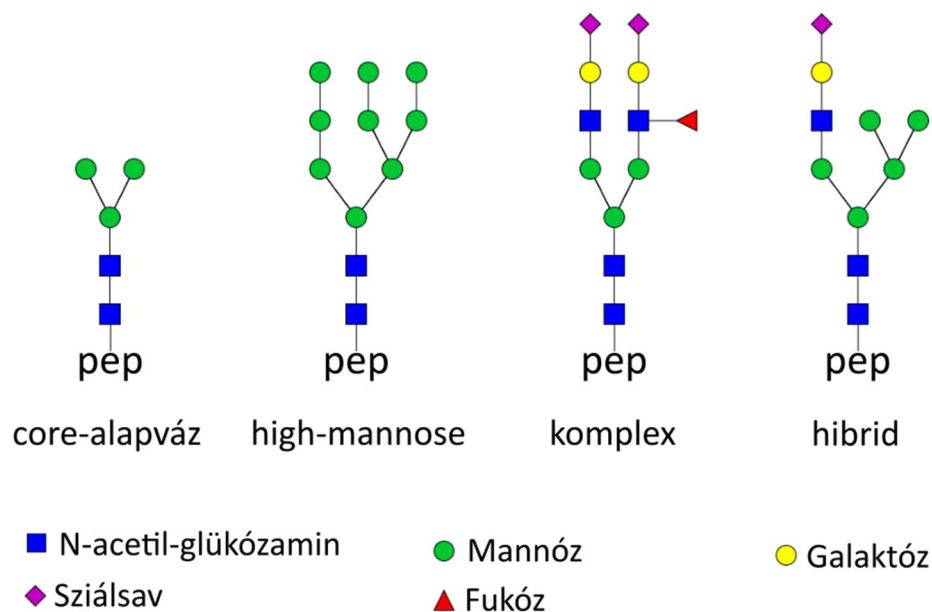
### **I.1.1. Az *N*-glikoproteinek szintézise és szerkezete**

Az *N*-glikoziláció a leggyakrabban előforduló glikozilációs típus, becslések szerint a humán glikoproteinek körülbelül 90%-a *N*-glikozilált.[10] Fontos kiemelni, hogy nem mindegyik potenciális *N*-glikozilációs hely glikozilált. A folyamatot számos tényező befolyásolja, úgymint a glikozilációs hely közelében található aminosav szekvencia, a fehérje domain-régiói és a legközelebbi másik *N*-glikozilációs hely.[11, 12] Az *N*-

glikoziláció az egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosítás, a cukor-oldalláncok és glikozilációs helyek változatosságának köszönhetően valószínűleg kulcsszerepe van az evolúció folyamatában.[13]

Az *N*-glikoproteinek szintézise egy erősen konzerválódott folyamat eukariótákban.[14] Bár a legtöbbször az *N*-glikozilációra poszt-transzlációs módosulásként hivatkoznak, a cukor-oldalláncok fehérjéhez csatolása egyazon térben és időben történik a fehérje-hajtogatással (protein-folding), ezért pontosabb ko-transzlációs folyamatról beszélni. *N*-glikoziláció esetében a cukor-oldalláncok az emberi szevezetben a következő monoszacharidokból épülnek fel: N-acetil-glükózamin (GlcNAc, N), mannóz (Man, H), galaktóz (Gal, H), szialsav (NeuAc, S), fukóz (Fuc, F). Összegképletek esetén, mivel a mannóz és galaktóz tömege azonos, hexózként (H) szokás jelölni őket. Az *N*-glikoproteinek szintézise során az endoplazmatikus retikulumban egy 14 monoszacharidból álló prekursor (3 glükóz, 9 mannóz és 2 N-acetil-glükózamin) hozzákapcsolódik a polipeptid lánchoz. A folyamatot és az *N*-glikozidos kötés kialakítását az oligoszacharil-transzferáz enzim szabályozza.[15] A következő lépésben az  $\alpha$ -glukozidáz I és II enzim lehasítja cukor-oldallánc végén található 3 glükóz molekulát.[16] Ezután a még éretlen fehérjék a Golgi-készülékbe transzportálódnak. A Golgi-készülék membránnal határolt üregeiben változó arányban találhatóak a különböző glikozidáz (GH) és glikozil-transzferáz (GT) enzimek, melyek monoszacharid egységek hozzáadásával vagy hasításával formálják a cukor-oldalláncot. Mostanáig nagyjából 40 glikozidáz és 100 glikozil-transferáz enzimcsaládot azonosítottak emberben.[17, 18] Ezen enzimek tulajdonságai a CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes) adatbázisban találhatóak meg, a [www.cazy.org](http://www.cazy.org) honlapon szabadon hozzáférhetően. Az enzimek kompetitív módon módosítják az éretlen glikán szerkezetét, ami nagyfokú szerkezeti heterogenitást eredményez, még egyazon glikozilációs helyen is.[19] Az *N*-glikánok szerkezetük alapján három csoportba sorolhatóak: high-mannose (magas-mannóz tartalmú), komplex és hibrid. A glikánok nagy részénél a szintézis során az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz IA, IB és IC enzimek lehasítják a prekursor 4 külső mannóz szubsztituensét és egy 5 mannózból és 2 N-acetil-glükózaminból álló cukor-váz keletkezik. Azonban néhány glikán nem vagy csak részlegesen veszi el a külső mannóz molekulákat. Ezeket a szerkezeteket high-mannose-nak nevezzük (Man5-9, a szám a mannózek számát jelöli). Az előzőekben keletkezett cukor-váz a Golgi középső részében (median-Golgi) a

glikozil-transzferáz GlcNAcT-I enzim szubsztrátja, mely egy N-acetil-glükóزامint csatol a cukor-láncre. Ennél a pontnál a folyamat két irányba ágazik. Az egyik esetben 2 terminális pozíciójú mannóz lehasad és egy újabb N-acetil-glükóзамин kapcsolódik a lánchoz. Így egy biantennás szerkezet keletkezik, ami további monoszacharidok hozzáadásával maximum 6 irányba ágazhat el (branching). Ezen glikánokat komplex szerkezetűeknek nevezzük. A másik esetben a terminális pozíciójú N-acetil-glükóзаминhoz további különböző monoszacharidok kapcsolódnak és hibrid típusú glikánok keletkeznek. A komplex és hibrid típusú glikánok esetében gyakori az antennák végéhez kapcsolódó sziálsav szubsztituens. Különleges esetekben a core második GlcNAc-jához kapcsolódó mannózhhoz egy extra GlcNAc kötődik, mely nem képez antennát, ilyenkor ún. bisecting glikoform keletkezik. Kis mennyiségben olyan glikoformokat is megfigyeltek, ahol az antenna végén elhelyezkedő GlcNAc-hoz egy N-acetil-galaktóзамин (GalNAc) kapcsolódik.[20] Az ilyen GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc összetételű szerkezetet LacdiNAc-motívumnak nevezzük. Az *N*-glikánok szintézise során keletkező glikán altípusokat és a core-alapvázat az 1. ábra mutatja be.



**1. ábra** A core-váz szerkezete és az *N*-glikánok három altípusa

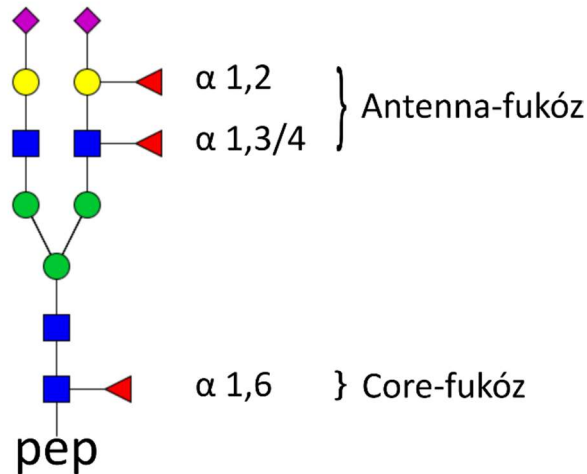
### I.1.2. *N*-glikoziláció biológia jelentősége

Az *N*-glikoziláció esszenciális a soksejtű élőlények számára, hiánya embrionális halálhoz vezet.[21] Szabályozza a proliferációt és differenciációt, így a sejtciklus modulátora.[22] Fontos szerepe van a fehérjék hajtogatásában, így a három-dimenziós térszerkezet kialakításában, befolyásolja a receptor-kötődést és a protein-clearance-t. Jelenleg több, mint száz veleszületett, különféle glikozilációt érintő betegséget írtak le (Congenital disorders of glycosylation, CDG), melyek klinikai megjelenése széles spektrumú, a gyakorlatilag tünetmentestől a több szervet érintő diszfunkciókig változatosan előfordul.[23] Az *N*-glikoziláció változásait számos patofiziológiás folyamatban leírták, köztük autoimmun betegségekben és különféle tumorokban, azonban a betegség kialakulásában és fenntartásában betöltött szerepe ez idáig nem teljesen tisztázott.[24-28] Fiziológiásan egyes fehérjék (pl. Immunglobulin G, IgG) *N*-glikozilációs mintázata a kor előrehaladtával is megváltozik.[29, 30]

### I.2. A fukoziláció

A fukoziláció a glikoziláció egyik jellemző tulajdonsága, mely a fukóz monoszacharid jelenlétére utal. Fontos megemlíteni, hogy fukoziláció az *O*-glikánok esetében is előfordul, azonban az értekezésben az *N*-glikánok fukozilációját tárgyalom. A fukóz szubsztituens az *N*-glikoprotein szintézis során a Golgi-készülékben kapcsolódik a cukor-oldallánchoz. Pozíciója alapján beszélhetünk core-fukózzról (mag-fukóz, a magyar nyelvű irodalomban azonban az angol kifejezés használata terjedt el) és antenna-fukózzról. Core-fukóz esetén a FUT8 (Fukoziltranszferáz 8) enzim által mediálva a fukóz a proteinlánchoz legközelebbi *N*-acetyl-glükózaminhoz kötődik  $\alpha$ 1,6 kötéssel. Antenna-fukoziláció esetén a fukóz a FUT3/4/5/6/7/9 enzimek által kötődhet valamelyik antennát alkotó *N*-acetyl-glükózaminhoz  $\alpha$ 1,3 és  $\alpha$ 1,4 kötéssel, vagy ritkább esetben egy galaktózhoz  $\alpha$ 1,2 kötéssel a FUT1/2 enzim közreműködésével.[31] A fukóz lehetséges elhelyezkedését a 2. ábra szemlélteti. A fukozilációt különböző minőségi paraméterekkel jellemezhetjük: a fukóz molekulák száma, megoszlásuk a különböző glikoformok között, a teljes fukoziláltság mértéke, valamint az izomerek jelenléte. Fontos kiemelni, hogy a fukozilációt megközelíthetjük a génexpresszió irányából is, azonban a fukoziláció, mint a glikoziláció

része, a fehérjékkel ellentétben nem áll közvetlen genetikai kontroll alatt, működését számos egyéb tényező befolyásolhatja.



2. ábra A fukóz szubsztituens lehetséges pozíciói a cukor-oldalláncon

## I.2.1. A fukoziláció karakterizálása

### I.2.1.1. A fukóz szubsztituensek száma

Az egyik érdekes tulajdonság az egy glikánon található fukóz szubsztituensek száma. A humán fehérjéken jellemzően fukóz-nélküli (non-fucosylated) vagy egy fukózt tartalmazó glikánok találhatóak meg. Ilyen fehérje például a PSA (Prosztata Specifikus Antigén) vagy a transferrin.[32, 33] Azonban az analitikai technikák fejlődésével fény derült rá, hogy bár jóval kisebb mennyiségben, de néhány fehérjén többszörösen fukozilált glikoformok is előfordulnak. Bifukozilált glikoformokat írtak le több szérumfehérje esetében, például a haptoglobinnál és az AGP-nél ( $\alpha$ 1-savas glikoprotein).[34, 35] Néhány különleges esetben trifukozilált glikánokat is detektáltak, például a kininogén-1, hemopexin és  $\alpha$ 1-antitripszin esetében.[36, 37] Ezen cukor-oldalláncon részletes szerkezetvizsgálatáról jellemzően kevés információ található az irodalomban.

### I.2.1.2. A fukozilált glikánok relatív mennyisége

Érdekes megvizsgálni a fukozilált glikánok relatív mennyiségét is. A glikozilációs mintázat meghatározás során az egyes glikánok egymáshoz viszonyított mennyiségét

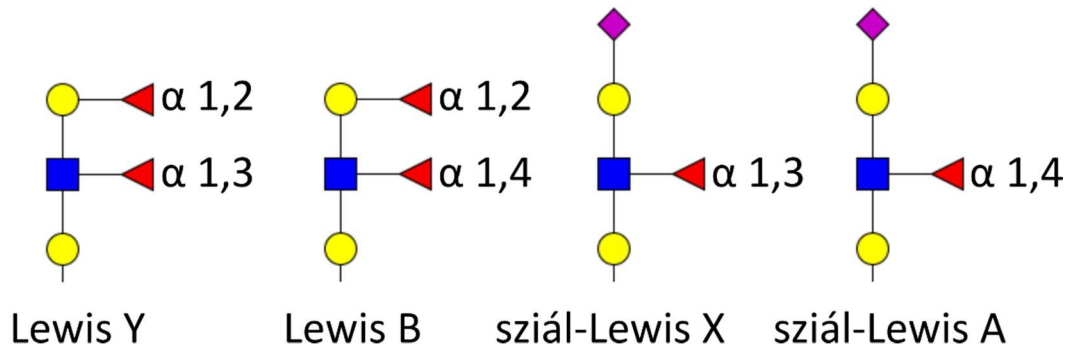
értékeljük. Ezt megtehetjük az adott kutatás céljának megfelelően egy adott fehérje egyes glikozilációs helyein, az egész fehérjét tekintve vagy komplex minták teljes glikozilációs mintázatát meghatározva. Két különböző fehérje glikozilációs mintázata, és ezen belül fukoziláltsága jelentősen eltérő lehet. Például a humán IgG1 molekulán található glikoformok átlagosan 90%-a fukozilált.[38] Ezzel szemben a PSA-n átlagosan csak a glikánok 50%-a fukozilált.[39] Jelentős eltérés lehet egyazon fehérje két glikozilációs helye között is. A fibrinogén esetében például a  $\beta$ -alegység glikozilációs helyén szignifikánsan több fukozilált glikánt azonosítottak, mint a  $\gamma$ -alegységen található glikozilációs helyen.[40] Cerebrospinális folyadékból izolált transferrin esetében az Asn432 glikozilációs helyen nem azonosítottak fukozilált glikoformot, míg az Asn630-as pozícióban több fukozilált glikoformot is leírtak.[41] Ezen arányok változásait számos patofiziológiás folyamatban leírták.[42-44] Emellett meghatározható egy adott biológia médium, pl. szövet, vér, vizelet teljes fukoziláltsága is. Ez esetben az adott mintában előforduló fehérjék összes fukozilált glikánjának a relatív arányát vizsgálják. A teljes fukoziláció változását több kutatócsoport is megfigyelte. Egészséges és különböző stádiumú kolorektális daganatos betegek vérplazma *N*-glikánjainak vizsgálatakor a teljes fukoziláltság mértéke nem változott, azonban leírták két fukozilált glikoform (N4H5F1, N4H5F1S1) mennyiségének szignifikánsan csökkenését a daganat jelenlétében.[38] Meddőségi problémákkal küzdő férfiaknál az ondo megemelkedett fukozilációjáról számoltak be.[45] Kutatócsoportunkban jelenleg is több hasonló jellegű kutatás folyik, a korábbi kísérletekben vizsgáltuk az AGP egyes *N*-glikozilációs helyein található glikozilációs mintázatot, a vérplazma fehérjék glikozilációs mintázatának változását sugárterápia hatására és a HeLa-sejtvonal glikoproteinjeinek *N*-glikozilációját.[46-48]

### I.2.1.3. A fukóz elhelyezkedése

A fukóz szubsztituensek számán és a fukozilált glikánok relatív mennyiségén kívül fontos paraméter a fukóz elhelyezkedése. Ez lehet core- vagy antenna-fukoziláció. A különböző pozícióban található fukózzok számos biológia folyamat kulcsszereplői.[49] Az egyik legfontosabb példa a core-fukozilációra az IgG. Az IgG az emberi szervezetben a humorális immunválasz egyik alapköve. Emellett az antitest-alapú terápiás hatóanyagok nagy része is IgG szerkezetű. A terápiás célú antitestek (MABs) egyik kritikus minőségi jellemzője (Critical Quality Attribute, CQA) a glikoziláció.[50, 51] Megfigyelték, hogy



a core-fukoziláció hiánya IgG-típusú antitestek esetén drámaian felerősíti az antitest-függő celluláris citotoxicitást (ADCC, Antibody-dependent cellular cytotoxicity).[52, 53] Az antitestek újabb generációjának egy csoportja már alkalmazza ezt a tudást és csak fukóz nélküli glikánokat (afucosylated glycans) tartalmaz. Ilyen szer például az obinutuzumab, amit krónikus limfoid leukémia (CLL) kezelésére hagytak jóvá, és a mogamulizumab, amit egy gyakori T-sejtes limfóma, a mycosis fungoides kezelésére engedélyeztek.[54, 55] A core-fukoziláció szintjének változását leírták prosztatata-, hasnyálmirigy-, valamint vastag és végbélrák esetében is.[56, 57] Az antenna-fukoziláció esetén a fukóz  $\alpha$ 1,3-1,4 pozícióban kapcsolódhat egy antennán található GlcNAc-hoz, vagy  $\alpha$ 1,2 pozícióban egy galaktózhoz. Az antenna-fukoziláció egyik jó példája az AGP. Az AGP 5 *N*-glikozilációs hellyel rendelkezik és a glikánokon a fukóz szubsztituensek az antennán helyezkednek el.[46] Az antennán található fukóz a körülötte elhelyezkedő monoszacharidokkal együtt jellegzetes glikán-motívumokat képezhet. Ilyen típusú, ismert szerkezetcsoportok az ABO-vércsoport antigének és a Lewis antigének. Az ABO-vércsoport antigének a vörösvérsejtek felszínén található különböző glikán-motívumokat jelölik. A Lewis antigének jelen vannak a vörösvérsejten, emellett vérlemezkék (trombociták) és nyiroksejtek (limfociták) sejt felszínén is megfigyelhetők.[58] Bár a fenti motívumokat felfedezésükkor *O*-glikánokon írták le, *N*-glikánokon is előfordulnak. A Lewis-antigének közül kiemelendő a szial-Lewis X (sialyl-Lewis X, CD15s) motívum, mely az E-szelektin egyik elsődleges kötőpartnere.[59] A szelektinek glikán motívum-specifikus adhézións fehérjék. A különböző sejtek felszínén található *O*- és *N*-glikánok szial-Lewis X motívumai a nyiroksejteken található E-szelektinhez kötődnek, ezáltal szabályozzák a nyiroksejtek vándorlását és kitapadását.[60] A szial-Lewis X szerepét tumor-áttét (metasztázis) képződésnél is leírták, ahol a daganatsejt véráramból szövetekbe való kijutását (extravazáció) irányítja.[61, 62] A Lewis antigén-család néhány jellegzetes szerkezetét a 3. ábra mutatja be.



**3. ábra** A Lewis antigén-család néhány jellegzetes szerkezete

Érdeemes megemlíteni, hogy számos próbálkozás van a fukoziláció befolyásolásán alapuló terápiás szer kifejlesztésére. Ebbe a csoportba tartoznak a metabolikus fukoziláció inhibitorok, melyek csökkentik a fukozilált glikánok mennyiségét és a kompetitív szelektin inhibitorok, melyek gátolják a szelektinek glikánhoz való kapcsolódását.[63] Jelenleg még nincs ilyen hatásmechanizmusú gyógyszer engedélyezve, a sarlósejtes vérszegénység kezelésére kifejlesztett pan-szelektin antagonistá rivipansel a Fázis III vizsgálatban elbukott, a P-szelektin antagonistá crizanlizumab pozitív eredményekkel zárta a Fázis II vizsgálatot (2019 szeptember).

## I.2.2. A fukóz pozíciójának meghatározása

Az *N*-glikánok szerkezetének meghatározása kiemelkedően fontos a glikoproteomika és a terápiás célú antitestek fejlesztésének céljából. Az egyik gyakran vizsgált tulajdonság a fukóz szubsztituens elhelyezkedése. Ez alapján megkülönböztethetünk core- és antenna-fukozilációt. Azonban ezek elkülönítése nem triviális, nincs rutinszerűen alkalmazott módszer. Az *N*-glikánok szerkezetvizsgálata technikailag több irányból is megközelíthető, az értekezésben a fukóz pozíciójának meghatározását célzó módszereket ismertetem részletesen: lektin-affinitás, cukor-oldallánc enzimatikus lehasítása, származékképzés, glikopeptid analízis.

### I.2.2.1. Lektinek

A lektinek a cukor-oldalláncok természetes kötőpartnerei. Az élővilágban széles körben előfordulnak és eltérő specificitással kötődnek a különböző glikán-motívumokhoz. A lektineket általában affinitás kromatográfiában és biokémiai esszék formájában

alkalmazzák.[64] A fukozilált glikoformok megkötésére a leggyakrabban használt típus az *Aleuria aurantia* lektin (AAL), melyen kötőhelyek találhatók  $\alpha$ 1,2,  $\alpha$ 1,3-1,4 és  $\alpha$ 1,6-pozíciójú fukóz felismerésére. Egy újabb vizsgálatban az AAL rekombináns módosításával sikerült növelni az  $\alpha$ 1,6-pozíciójú fukóz iránti specificitását.[65] Egy másik gyakran alkalmazott lektin a *Lens culinaris* agglutinin (LCA), mely az  $\alpha$ 1,6-kötésű core-fukózra specifikus. A részletesebb vizsgálatok kimutatták, hogy az LCA valójában a mannózhoz is kötődik és a core-fukozilációra csak akkor specifikus, ha az egy biantennás, galaktozilált glikánon található.[66] Jelenleg egyetlen jóváhagyott, klinikailag alkalmazott glikozilációs mintázat változásán alapuló tumor-marker teszt létezik, mely az alpha-fetoprotein (AFP) LCA-hoz kötődő frakciójának (AFP-L3) mennyiségét vizsgálja. AFP-L3 mennyisége hepatocelulláris karcinómában és annak progressziója során szignifikánsan megemelkedik.[67-69] Újabb kutatásokban egyre gyakrabban alkalmazzák a tisztán  $\alpha$ 1,6-core fukózra specifikus *Pholiota squarrosa* lektint (PhoSL).[70, 71] A lektin-affinitáson alapuló technikák nagy hátránya, hogy a legtöbb lektin nem specifikus egy adott pozícióban kötődő fukózra.

### **I.2.2.2. A cukor-oldallánc enzimatis hasítása**

Egy másik lehetőség a cukor-oldalláncok teljes vagy részleges enzimatis lehasítása a fehérjéről. Az egyik széles körben használt enzim a PNGase F (peptid N-endoglikozidáz F, Peptide N-Glycosidase F), mely a teljes cukor-oldalláncot lehasítja a fehérjéről. Az ily módon keletkezett cukor-oldalláncot tovább vizsgálhatjuk, azonban nem lesz információnk arról, hogy a cukor milyen fehérjéről, illetve a fehérje mely részéről származik.

Többféle exoglikozidáz enzim használata is elterjedt, melyek meghatározott glikozidos kötések mentén hasítanak. A szarvasmarha veséből izolált  $\alpha$ -L-Fukozidáz (Bovine Kidney Fucosidase, BKF) például pozíciótól függetlenül minden fukózt lehasít, azonban a leghatékonyabban az  $\alpha$ 1,6-kötést.[72, 73] A mandulából izolált  $\alpha$ -L-Fukozidáz (Almond Meal Fucosidase, AMF) az  $\alpha$ 1,3 és 1,4 kötések mentén hasít, azonban az  $\alpha$ 1,2 és 1,6 kötésekre nem mutat affinitást.[74] Az exoglikozidáz enzimek használatának hátránya, hogy a legtöbb enzim keresztreakciókat mutat a különböző kötéssel kapcsolódó fukózzal és a core- és antenna-fukoziláció meghatározásához több enzim szekvenciális

alkalmazása szükséges. Emellett az adott glikán mérete, elágazásainak száma is befolyásolja a hasítás hatékonyságát.

Az endoglikozidázok az enzimek egy másik csoportja, melyek közül kiemelendő az Endo F1, ami a glikán core-részét alkotó két GlcNAc szubsztituens között hasít. Ezzel a technikával meghatározható a fehérjéhez kapcsolódó core-fukóz mennyisége, azonban az antenna-fukozilációról nem kapunk információt.[75]

### I.2.2.3. Származékképzés

A származékképzés egy gyakran használt technika glikánok vizsgálatakor, mely javítja a glikánok szerkezeti stabilitását és ionizációs potenciálját.[76] A glikánokat jellemzően PNGase F enzimmel lehasítják a fehérjéről és ezután történik a származékképzés, majd rendszerint a tömegspektrometriás detektálás (mass spectrometry, MS). A glikánok származékképzés nélküli tömegspektrometriás vizsgálata nehézkes, mivel kevésbé ionizálódnak és emellett szerkezeten belüli átrendeződéseket is megfigyeltek a mérések során. Előfordulhat például a szíálsav vagy a fukóz lehasadása, valamint a fukóz szubsztituens szerkezeten belüli vándorlása. Ezt a folyamatot fukóz vándorlásnak nevezzük (fukóz migráció, fucose migration), mely megnehezíti a core- és antenna-fukoziláció meghatározását.[77] Az egyik gyakran használt reakció a permetilálás (permethylation), mely során a glikánon található összes szabad hidroxil- és N-acetil-csoport egy metil-csoport addíciójával metil-étert képez, a szíálsav karboxi-csoportjából pedig észter keletkezik.[78] Népszerű technika a glikánok jelölésére az antranilsavval (anthranilic acid, AA) történő származékképzés, az antranilálás, mely jelentősen növeli a glikánok fluoreszcens detektálhatóságát.[79] Újabb vizsgálatok során megfigyelték, hogy a prokainamid molekula is rendkívül jól használható glikán-származékképző (procainamide labeling).[80, 81] Mind a permetiláció, mind az antraniláció és a prokainamid-jelölés esetén kimutatták, hogy a származékképzéssel sikerült minimalizálni a fukóz vándorlás mértékét.[77, 79, 81] A származékképzés nagy hátránya, hogy csak glikánok esetében alkalmazható, így a glikán fehérjén való elhelyezkedéséről nem ad információt.

#### I.2.2.4. Glikopeptid-analízis

A glikopeptid-analízis a proteomika tudományágából kifejlődő megközelítés, mely során a glikoproteint enzimatis úton peptidekre hasítják és az így keletkezett *N*-glikozilációs helyet tartalmazó glikopeptidet vizsgálják tovább, jellemzően tömegspektrometriával. A leggyakrabban használt enzim a tripszin, mely a lizin és arginin aminosavak C-terminálisa mellett hasítja el a fehérjeláncot.[82] Többségében 8-15 aminosav hosszúságú peptidek keletkeznek, mely méret a jelenlegi készülékeken ideális a tömegspektrometriás vizsgálatra.[83] A glikopeptidek tandem tömegspektrometriás (MS/MS) vizsgálat során fragmentálódnak és az így keletkezett fragmensek azonosításával információ nyerhető a glikánok szerkezetéről, többek között a fukóz pozíciójáról is. A glikopeptid-analízis nagy előnye, hogy a cukor-oldallánc összetétele mellett egyértelműen meghatározható, hogy az adott glikán melyik fehérjén és mely glikozilációs helyen helyezkedik el.[84] Ez rendkívül hasznos információ fehérjekeverékek, valamint különböző biológiai eredetű minták esetén. Emellett az ilyen típusú vizsgálatok nem igényelnek származékképzést, a standard proteomikai munkafolyamatok sorába hatékonyan beilleszthetőek.[85]

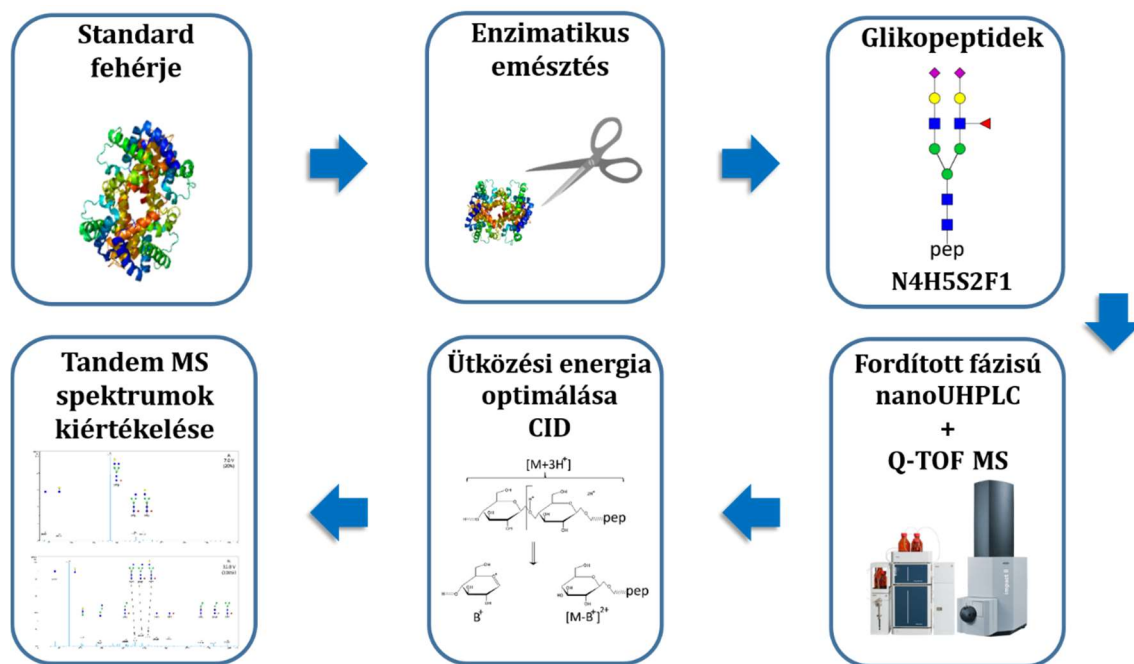
Fontos megemlíteni az NMR spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance) jelentőségét a glikán-szerkezetek vizsgálatában. Az ilyen jellegű vizsgálatok rendkívül részletes szerkezeti jellemzést tesznek lehetővé, azonban jelentős limitáció a nagy tisztaságú minta követelménye és az alacsony szenzitivitás.[86] A fentebb említett technikákat természetesen egymással párhuzamosan és kombinálva is alkalmazzák. Vizsgálataim során tömegspektrometriás detektálást használtam, így a továbbiakban az általam alkalmazott módszer elméleti és technikai hátterét szeretném bemutatni.

### **I.3. Glikopeptidek tömegspektrometriás szerkezetvizsgálata**

#### **I.3.1. Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria**

Napjainkban a proteomikai kutatások elsősorban analitikai műszere a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, LC-MS).[87-89] A proteomikai vizsgálatok fellendülését a lágy ionizációs technikák kifejlesztése tette lehetővé a 80-as évek második felében. Az elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization, ESI) felfedezésével lehetővé vált a különböző komponenseket nagy felbontással elválasztó LC on-line hozzákapcsolása a molekulákat nagy érzékenységgel detektáló MS-hez. Az elektroporlasztásos ionizáció során a folyékony halmazállapotú minta egy kapillárison halad keresztül, majd a kapillárisból kilépő folyadék elektrosztatikus tér, fűtés és porlasztógáz hatására apró, elektromosan töltött cseppekre esik szét. A cseppek továbbhaladnak a kapillárisal szembeni ellenelektrod irányába és folyamatos oldószeresztés mellett végül gáz fázisú ionok keletkeznek. Az ionok képződésének leírására két fő megközelítés létezik. Az ion evaporációs modell szerint a töltött cseppből a felületi töltéstöbblet hatására apró oldószeresztés cseppek lökődnek ki, míg végül az összes oldószer elpárolog. A töltésmaradvány modell szerint mikor a párolgás hatására a többszörösen töltött cseppben a töltések taszítása nagyobb mértékű lesz, mint a csepp felületi feszültsége, a csepp kisebb cseppekre robban szét. Ezt a jelenséget Coulomb robbanásnak nevezzük. A folyamatos Coulomb robbanások hatására egyre kisebb cseppek keletkeznek, míg végül csak a gáz fázisú ion lesz jelen. Az ESI ionforrás nagy előnye, hogy közvetlenül kapcsolható folyadékkromatográfiával. Az LC-MS kapcsolás az egyik legelterjedtebb módszer glikopeptidek vizsgálatára. Munkám során a glikopeptidek analíziséhez használt módszer az ún. bottom-up proteomikai irányvonal részét képezi, mely során az enzimatis emésztés által keletkezett peptidek alapján, építőelemeiből, úgymond alulról felfelé azonosítjuk az egyes fehérjéket. A glikopeptidek folyadékkromatográfiás elválasztására a proteomikában rutinszerűen alkalmazott fordított fázisú C18-oszlopok (Reversed-Phase Chromatography, RPC) és nanoUPLC (nano Ultra Performance Liquid Chromatography) rendszerek jól használhatóak.[90] A nanoUPLC rendszerek a hagyományos LC-hez viszonyítva nagyobb nyomást és kisebb részecskeméretet alkalmaznak, mely a mérés gyorsulását eredményezi, így előnyös nagy mintaszám esetén.

Az LC-MS csatolás megbízható, nagy áteresztőképességű vizsgálatot tesz lehetővé, ezért kedvelt módszer komplex biológiai minták elemzésére.[91] Az elválasztás után a folyadékkromatográfiás rendszerből a minta a tömegspektrométer ionforrás részébe jut, ami LC kapcsolás esetén leggyakrabban ESI-típusú, ahol jellemzően többszörösen pozitív töltésű részecskék keletkeznek. A méréseimet egy olyan Bruker márkájú tömegspektrométeren végeztem, amely a vállalat saját fejlesztésű, az ESI elvén alapuló CaptiveSpray nanoBooster ionforrását alkalmazza. A hagyományos ESI ionforrások gyakori problémája az eltömődés és a spray (permet) instabilitása. A CaptiveSpray nanoBooster ionforrás esetében a kapilláris egy kúp formájú, maratott emitterben végződik, mely tetszőleges gáz hozzákeverésével, az általam használt készülék esetében acetonitrillel segíti elő a minta ionizációját és az ionok fókuszálását. Az emitter speciális kialakításának köszönhetően a spray stabil, nincs szükség a hagyományos ESI forrásokra jellemző rendszeres újrapozícionálásra. A töltéssel rendelkező ionokat az analizátor, jelen vizsgálat esetében egy kvadrupól (Q) és egy repülési idő analizátor (Time of Flight, TOF), választja szét tömeg/töltés ( $m/z$ ) alapján, és innen haladnak tovább a detektorba. A két analizátor között egy ütközési cella található, mely egy inert ütközési gáz segítségével képes fragmentálni a kiválasztott ionokat. MS1 mérésnek nevezzük azokat a méréseket, mikor az ütközési cellában nem történik fragmentáció, az ionok keresztülrepülnek, és így kerülnek detektálásra. Tandem MS (MS/MS) mérés során a kvadrupól analizátor által kiválasztott, meghatározott tömeg/töltésű ionok az ütközési cellában fragmentálódnak, majd a fragmenseket a TOF analizátor választja szét. Az ütközési cellában a fragmentációhoz az ún. ütközés indukált disszociáció (Collision-induced dissociation, CID) technikáját alkalmazzuk. A CID során a kiválasztott ionokat elektromos potenciállal gyorsítjuk, majd egy semleges gáz molekuláival ütköztetjük. Az ütközés során az ionok megnövekedett kinetikus energiájának egy része belső energiává alakul, mely a molekula kötéseinek felhasadásához és így kisebb méretű fragmensek keletkezéséhez vezet.[92] A glikopeptid analízis sematikus lépéseit a 4. ábra szemlélteti.



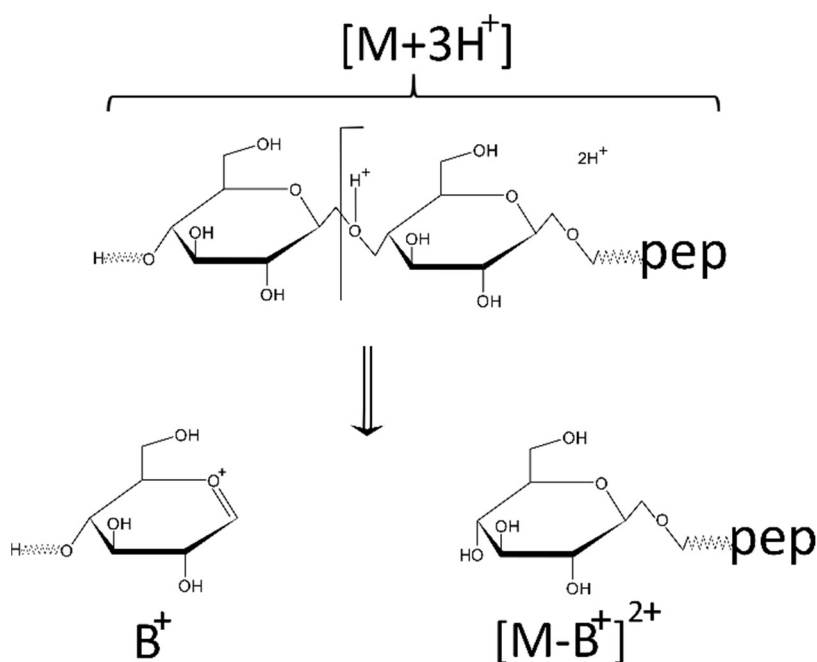
4. ábra A glikopeptid analízis folyamata

### I.3.2. Fragmentációs mechanizmusok

A glikopeptid-analízis során a cukor-oldallánc különböző részletességben tanulmányozható. Meg lehet vizsgálni a cukor-oldallánc monoszacharid összetételét, kapcsolódási sorrendjét, az elágazások számát és a kötéstípusokat. Az ilyen típusú vizsgálatok egyik fő hátránya a bonyolult adatkiértékelés. Egy tipikus MS/MS vizsgálat a cukor-oldallánc szerkezetéről csak kevés információval szolgál, jellemzően a monoszacharid összetételt lehet meghatározni. A glikopeptidek fragmentációja során keletkezett fragmensek azonosításából azonban vissza lehet következtetni a cukor-oldallánc szerkezetére is. Emellett lehetőség van az ütközési energia viszonylag tág határok közötti változtatására és a különböző energiákon felvett spektrumok összehasonlítására. Ezáltal lehetőség nyílik mind az alacsony mind a magas ütközési energián végbemenő fragmentációs folyamatok megismerésére. Az ilyen mérések során a fragmentációs folyamatokat energiafüggését (energy-dependent fragmentation) vizsgáljuk. A fragmentációs folyamatok és energiafüggésük karakterisztikáját több kutatócsoport is tanulmányozta.[93-95] A megfigyelések alapján CID technika használatakor elsődlegesen a cukor oldalláncok fragmentálódnak.



A fragmentációs folyamatok jellemzésére széles körben elfogadott a Domon és Costello által 1988-ban publikált nomenklatura.[96] A nomenklatura egységesíti a különböző típusú cukor fragmentációs folyamatok során képződő ionok nevezékét. Ennek megfelelően az egyik tipikus fragmentációs folyamat a B ion képződés. A glikopeptid-analízis során jellemzően többszörösen töltött glikopeptideket vizsgálunk. A továbbiakban egy 3+ töltésű molekulaion ( $M^{3+}$ ) példáján keresztül szemléltetem a fragmentációs folyamatokat. B-ion képződés esetében a B ion töltésszeparáció (charge separation) során jön létre, így mindkét fragmens töltéssel rendelkezik.[97] A B ion ( $B^+$ ) gyakorlatilag egy egyszerűen pozitív töltésű részecske, mely a cukor-oldalláncról a negatívan töltött hidroxil-csoportjának lehasadásával képződik. A vele komplementer fragmens a prekursor ionnál egy pozitív töltéssel és egy cukorral kisebb glikopeptid. A folyamat képletekkel leírva  $M^{3+} \rightarrow B^+ + [M-B]^{2+}$ , ahol  $M^{3+}$  a háromszorosan protonált prekursor iont vagy más néven molekulaiont jelöli. A B ion képződés folyamatát az 5. ábra mutatja be.



### 5. ábra A B-ion képződés folyamata

A B ion sorozat karakterisztikus jellemzője az *N*-glikopeptidek fragmentációjának, főbb képviselői az  $N^+$  ( $m/z$  204),  $S^+$  ( $m/z$  292),  $NH^+$  ( $m/z$  366),  $NHS^+$  ( $m/z$  657) ionok. Fukozilált glikoformok esetén fontos megemlíteni az  $NHSF^+$  ( $m/z$  803) és  $HNHSF^+$  ( $m/z$  965) fragmenseket. A B-ionok képződése mellett előfordulhat egy alacsonyabb

intenzitású folyamat, az Y-ion képződés. Ebben az esetben hidrogén-átrendeződés következtében semleges cukorvesztés következik be, így a glikopeptid fragmension azonos töltésű a prekursor ionnal. A folyamat képletekkel jelölve  $M^{3+} \rightarrow Y^0 + [M-Y^0]^{3+}$ . Tipikus példa az Y-ion képződésre a semleges fukóz és szialav vesztés.

Az MS/MS spektrumok különböző fragmenseinek relatív intenzitásából következtetni lehet az adott glikopeptid szerkezeti felépítésére, a cukrok kötési sorrendjére, kötéstípusára. Egy kutatócsoport olyan módszert fejlesztett ki, ahol diagnosztikus fragmensek azonosításával képes volt megkülönböztetni az  $\alpha 2,3$  és az  $\alpha 2,6$  kötésű szialavat. Megfigyeléseik szerint az  $\alpha 2,6$ -szialav esetén a B-ionok intenzitása jelentősen kisebb, mint az  $\alpha 2,3$  kötődés esetén.[98] A fukozilációt illetően egy másik csoport kutatásaiból kiderült, hogy electrospray ionizáció (ESI) esetén a core-fukóz nehezebben, nagyobb energián fragmentálódik, mint az antenna-fukóz.[99] A fukóz pozíciójának meghatározására jelenleg nincsenek rutinszerűen alkalmazott módszerek. A jellegzetes fragmensionok azonosításával következtetni lehet a fukóz elhelyezkedésére. Kutatócsoportunk érdekesnek találta a fukóz elhelyezkedésének kérdéskörét, ezért munkám során különböző pozíciójú fukózt tartalmazó glikopeptidek energiafüggő fragmentációjának feltérképezésével és az analitikai szempontból felhasználható komponensek azonosításával foglalkoztam.

## I.4. A vizsgált fehérjék

### I.4.1. Prostatata Specifikus Antigén (PSA, Prostate Specific Antigen)

A PSA-t (kallikrein-3, P-30 antigén, gamma-seminoprotein, semenogeláz) prostatata hám (epitél) sejtjei termelik, 261 aminosavból áll és körülbelül 28-31 kDa tömegű, a cukor oldallánc tömegének függvényében. Élettani szerepét tekintve egy szerin-proteáz, melynek feladata az ondó elfolyósítása és a méhnyakot bevonó mucus oldása. Egyik fő célpontja a semenogelin-1 fehérje, az ondó domináns alkotóeleme, mely a gél-mátrix képződésben vesz részt.[100] Lokalizációját tekintve szekretált fehérje, mely megtalálható a vérben, vizeletben, ondóban.[101] A szérum PSA-szint vizsgálata a klinikumban széles körben elterjedt a prostatata-daganat (Prostate cancer, Pca) tumormarkereként. Az elmúlt években a prostatata-daganat előfordulási gyakorisága és halálózása hazánkban és világszinten is a 10 leggyakoribb daganattípus közé

tartozott.[102, 103] A PSA-szint és a daganat-előfordulás közötti korrelációt a 2. táblázat mutatja be.

**2. táblázat A PSA-szint és a daganat-előfordulás közötti korreláció**

	<b>Normál tartomány</b>	<b>Diagnosztikus szürke zóna</b>	<b>Nagy valószínűséggel beteg</b>
<b>PSA-szint</b>	≤4 ng/ml	4-10 ng/ml	10< ng/ml
<b>Daganat előfordulási valószínűsége</b>	15%	22-27%	67%[104]

Fontos kiemelni, hogy PSA-szint számos egyéb, nem daganatos okból is megemelkedhet, mint például jóindulatú prosztata-megnagyobbodás (Benign Prostate Hyperplasia, BPH), prosztagyulladás (prostatitis), húgyúti fertőzés, sebészeti beavatkozások, életkor (az életkorral arányosan növekszik). Emellett a táblázatból jól látható, hogy a 4-10 ng/ml-tartományban meghatározott, ún. diagnosztikus szürke zónában található páciensek csupán ~1/4-nél diagnosztizáltak prosztata-daganatot. A PSA-szint önmagában a diagnózis felállítására nem alkalmas, a daganat jelenlétének igazolásához prosztata biopszia által nyert szövetminta elemzése szükséges. Azonban e beavatkozás számos esetben fájdalommal, vérzéssel és szövődeményekkel jár, mely vizsgálatok nagy részénél a betegnél nem találnak daganatos elváltozást. Ezen túlmenően, a prosztata-daganatok nagy része kezelést nem igénylő, lassú prognózisú ún. alacsony-kockázatú prosztata-daganat (low-risk prostate cancer). A PSA szerkezetileg glikoprotein, egy *N*-glikozilációs helyvel rendelkezik a 69-es pozíciójú aszparaginon. A PSA-n található glikánok nagyrészt komplex-típusú, biantennás szerkezetek.[105, 106] Számos kutatás foglalkozik a PSA glikozilációs mintázat-változásának tumormarkerként való felhasználásával is. Az évek során több karakterisztikus tumor-asszociált glikozilációs mintázat-változást is megfigyeltek. Az egyik ilyen változás az fukozilált glikoformok mennyiségének növekedése prosztata-daganat esetén.[107-109] Ezzel ellentétesen más kutatások a fukozilált glikoformok csökkenését figyelték meg.[32, 110, 111] A daganatos minták α2,3-helyzetű szializációja az egészségeséhez viszonyítva gyakoribb volt, míg az

egészséges mintákon az  $\alpha$ 2,6-szialisáció volt a domináns.[112-115] Tumor esetén beszámoltak róla, hogy megnövekedett az ún. GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (LacdiNAc)-motívumot tartalmazó glikoformok mennyisége.[116, 117]

#### **I.4.2. $\alpha$ 1-savas glikoprotein (AGP, Alpha-1-acid glycoprotein)**

Az  $\alpha$ 1-savas glikoprotein (Orosomuroid-2) egy 183 aminosavból álló fehérje, körülbelül 41-43 kDa tömegű, a cukor oldallánc tömegének függvényében.[118] Főként a májban termelődik, ahonnan a vérplazmába szekretálódik.[119] Fiziológias szerepét tekintve transzport-protein, mely számos hidrofób ligandumot és gyógyszermolekulát köt meg és szabályozza megoszlásukat. Emellett az akut fázis protein fehérjecsald tagja és immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkezik.[120] Egyike a humán plazmában legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjéknek.[121, 122] Öt *N*-glikozilációs helyet tartalmaz, a 33,56,72,93 és 103-as pozíciójú aszparaginon. Biomarkerként való alkalmazhatóságát vizsgálták többek között szepszisben, kardiovaszkuláris halálozás kockázat becslésében, és különböző típusú daganatokban (hepatocelluláris carcinoma, hasnyálmirigy-tumor).[123-126] Daganatos mintákban több publikációban is megemelkedett fukozilált glikoform arányt találtak.[125-127] Bár az AGP mennyiségének és glikozilációs mintázatának változása egy intenzív kutatási terület, mostanáig egy indikációban sem került hivatalosan jóváhagyásra biomarkerként. A glikozilációs mintázaton belül különösen érdekesek az AGP fukozilált glikoformjai. Az egyszeresen fukozilált glikoformok mellett kis számban bifukozilált glikoformokról is említést tesz az irodalom, azonban e szerkezetek részletes jellemzése még nem történt meg.[46]

## II. Célkitűzések

A proteomika fejlődésével és a terápiás célú monoklonális antitestek elterjedésével párhuzamosan glikoproteinek vizsgálata egyre nagyobb jelentőségre tett szert az elmúlt évtizedben. A cukor-oldalláncok változatosságának és komplexitásának megismerésével megjelent az igény olyan minőségi paraméterek meghatározására, melyekre jelenleg nincsenek rutinszerűen alkalmazott vizsgálati módszerek. Az egyik ilyen paraméter a core- és antenna-fukoziláció elkülönítése.

1. Munkám során célul tűztem ki, hogy egy olyan tömegspektrometrián alapuló módszert fejlesszek, mely egyértelműen megkülönbözteti a core- és antenna-fukozilációt. A vizsgálatokhoz modellvegyületként az eddigi irodalmi ismeretek alapján tisztán core-fukozilált PSA és a tisztán antenna-fukozilált AGP glikoproteineket választottam.

2. Célom volt ezen proteinekből glikopeptidek előállítását, majd ezek részletes, tandem tömegspektrometrián alapuló jellemzése. Az első lépés néhány olyan glikopeptid kiválasztása volt, melyek összetételük és intenzitásuk alapján várhatóan jól vizsgálhatók, és alkalmasak a core- és antenna-fukoziláció tanulmányozására. Mivel a kiválasztott glikopeptidek bonyolult összetételű fehérjeemésztményben vannak, vizsgálatukat nano-HPLC-MS/MS módszerrel végeztem.

3. Cél volt a kiválasztott glikopeptidek energiafüggő MS/MS jellemzése. Az ütközési energiát a proteomikában használt ütközési energia 30% és 150%-a közötti tartományban vizsgáltam.

4. Az energiafüggés értelmezésére a letörési görbe (breakdown curve) módszert alkalmaztam. Ennek segítségével célul tűztem ki olyan diagnosztikus fragmensionok és olyan energiaintervallum meghatározását, mely jól alkalmazható a core- és az antenna-fukoz megkülönböztetésére.

5. További célom volt a modellfehérjék vizsgálatával nyert ismeretek alapján ritka, többszörösen fukozilált AGP glikoformok szerkezetének meghatározása.

### **III. Módszerek**

#### **III.1. Anyagok**

Az AGP standardot és az LC-MS minőségű oldószereket, reagenseket (víz, acetonitril, hangyasav (FA), trifluorecetsav, metanol, ammónium-bikarbonát ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), kalcium-klorid ( $\text{CaCl}_2$ ), víz + 0,1% hangyasav, acetonitril + 0,1% hangyasav) a Merck-től (Darmstadt, Németország) vásároltam. Az enzimátikus emésztéshez használt reagensek közül az 1,4-ditiotreitolt (DTT) és a jódacetamidot (IAA) a Roche Diagnostics-tól (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) és a Fluka Chemie GmbH-től (Buchs, Svájc) szereztem be. A felületaktív anyag Rapigest SF-et (liofilizált nátrium-3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioxolán-4-il)-metoxil]-1-propán-szulfonát) a Waters Corporation-től (Waters Corporation, Milford, MA, Egyesült Államok) vásároltam. Az emésztéshez tömegspektrometriás minőségű Lys-C/Tripszin, Tripszin Gold és Arg-C enzimeket (Promega Corporation, Madison, WI, Egyesült Államok) használtam. A BRC-613 típusú PSA standardot az European Commission Joint Research Center-től (Geel, Belgium) szereztem be.

#### **III.2. Enzimátikus emésztés**

A liofilizált állapotban tárolt AGP és PSA standardokból 1 nmol anyagmennyiséget 30  $\mu\text{l}$  víz + 5% metanolban oldottam fel és használtam az emésztéshez. Az enzimátikus emésztéshez a kutatócsoportunk által korábban, kis mennyiségű fehérjék emésztéséhez kifejlesztett protokollt alkalmaztam.[128] A fehérjék szolubilizálásához és a diszulfidhidak redukálásához a mintákat 5  $\mu\text{l}$  0,5% Rapigest-tel és 2  $\mu\text{l}$  200 mM DTT-vel inkubáltam 60 °C-on, 30 percig. Ezután a diszulfidhidak újbóli kialakulásának megakadályozására és az emésztéshez használt enzimek számára optimális 7,8 pH kialakítására 2,5  $\mu\text{l}$  200 mM IAA-t és 5  $\mu\text{l}$  200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -ot adtam hozzá a mintákhoz és fénytől elzárt helyen, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltam. A tripszin enzim önmagában alkalmazva nagy gyakorisággal a lizin aminosav mellett hagy ki hasításokat (ún. missed cleavage). Ennek kiküszöbölésére előemésztésként 1:100 enzim:fehérje arányban, 1  $\mu\text{l}$  térfogatban Lys-C és tripszin enzim keveréket adtam a mintákhoz (Lys-C/Tripszin), és 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam. A Lys-C a

tripszinhez viszonyítva nagyobb hatékonysággal hasít a lizin mellett, és ennek használata javítja az emésztés hatékonyságát. Ezt követően 1:25 enzim:fehérje arányban, 1 µl térfogatban hozzáadtam a tripszint és további 2 órán át 37 °C-on inkubáltam. Az enzimek inaktiválásához, így az emésztés leállításához 1 µl FA-t használtam. A PSA standard esetén a Lys-C/Tripszin és tripszines emésztés egy két aminosavból álló (NK, monoizotópos tömeg 260,148) glikopeptidet eredményezett, amely kis tömege miatt nem volt alkalmas a további vizsgálatokra. Az Arg-C enzimmel való emésztés során egy 9 aminosav hosszúságú glikopeptid (NKSVILLGR, monoizotópos tömeg 998,624) keletkezett, mely jól vizsgálható a további kísérletekben. Ezért a PSA standard esetén a fentiekben említett protokoll úgy módosult, hogy Lys-C/Tripszin és tripszin helyett 1:25 enzim:fehérje arányban, 1 µl térfogatban Arg-C enzimmel emésztettem. Az Arg-C optimális működéséhez 1 µl 200 mM DTT-t és 1 µl 15 mM CaCl<sub>2</sub>-ot adtam hozzá a mintához az enzim hozzáadása előtt és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam.

### III.3. Nano LC-MS/MS

A folyadékkromatográfiás elválasztás egy Ultimate 3000 nanoRSLC system (Dionex, Sunnyvale, CA, Egyesült Államok) típusú készüléken történt. A minták sómentesítéséhez egy Acclaim PepMap100 C-18 csapdázó oszlopot (trap column, 100 µm × 20 mm; Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, Egyesült Államok), a peptidek elválasztásához pedig egy Acquity UPLC M-Class Peptide BEH C18 oszlopot (1,7 µm, 130 Å, 75 µm × 250 mm; Waters, Milford, MA, Egyesült Államok) használtam. Az elválasztás során 48 °C-on, 300 nl/perc áramlási sebességen 60 vagy 90 perces gradiens elúciót alkalmaztam, az A eluens összetétele víz + 0,1% FA, a B eluens összetétele pedig acetonitril + 0,1% FA volt. A 60 és 90 perces gradiens paramétereit a 3. és 4. táblázat mutatja be. A folyadékkromatográfiás rendszert egy CaptiveSpray nanoBooster ionforrással szerelt Maxis II ETD Q-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Németország) tömegspektrométerhez csatlakoztattam.

**3. táblázat A 60 perces kromatográfiás módszer során alkalmazott grádiens**

<b>Idő (perc)</b>	<b>Áramlási sebesség (<math>\mu\text{l}/\text{perc}</math>)</b>	<b>A eluens (%)</b>	<b>B eluens (%)</b>
0	0,3	96	4
11	0,3	96	4
71	0,3	50	50
72	0,3	10	90
77	0,3	10	90
78	0,3	96	4
93	0,3	96	4

**4. táblázat A 90 perces kromatográfiás módszer során alkalmazott grádiens**

<b>Idő (perc)</b>	<b>Áramlási sebesség (<math>\mu\text{l}/\text{perc}</math>)</b>	<b>A eluens (%)</b>	<b>B eluens (%)</b>
0	0,3	96	4
11	0,3	96	4
101	0,3	50	50
102	0,3	10	90
107	0,3	10	90
108	0,3	96	4
128	0,3	96	4



### III.4. Glikozilációs analízis

Az ion optika paraméterbeállításai az 5. táblázat ismerteti.

**5. táblázat** Az ion optika paraméterei

Paraméter	Paraméter magyar nyelvű megfelelője	Érték
Pre-pulse storage	Pulzus előtti tárolási idő	10 $\mu$ s
Collision voltage	Ütközési feszültség	7 V
Quadrupole ion energy	Kvadrupol ion energia	4 eV
Funnel 1 RF	1. tölcser rádiófrekvencia	400 Vpp
Multipole RF	Többpólusú rádiófrekvencia	800 Vpp
Collision RF	Ütközési rádiófrekvencia	800 Vpp
Ion transfer time	Ion átviteli idő	140 $\mu$ s

Az MS1 spektrumok a 150-3000  $m/z$  tömegtartományban kerültek felvételre 5 Hz frekvencián. A kiválasztott prekursor ionokról ütközés indukált disszociáció (CID) segítségével MS/MS felvételek készültek, az intenzív ionokról (>25000 beütés/másodperc) 4 Hz, a kis intenzitású ionokról (>5000 beütés/másodperc) 1 Hz frekvencián. A tetraantennás AGP glikopeptidok csak alacsony intenzitással jelennek meg a spektrumban, ezért e mérések esetében az MS1 felvételek frekvenciáját 3 Hz-re, az intenzív ionokról készült MS/MS felvételek esetén pedig 1 Hz-re állítottam. A kiválasztott prekursor ionok energiafüggő fragmentációjának jellemzéséhez a 10,9-55 V tartományban különböző feszültségeken MS/MS felvételeket készítettem. A "standard ütközési energia" a készülégyártó ajánlásainak megfelelően, az izolációs tömegtartományszélesség, az izolációs  $m/z$  és az ion töltésszáma alapján lett megállapítva. Az energiafüggés vizsgálatokor ennek az energiának a meghatározott százalékával fragmentáltam az adott prekursor iont, a 30%-150%-os tartományban. Az értekezésben a karakterisztikus tulajdonságokat jól szemléltető spektrumok kerülnek bemutatásra. A glikopeptideket „peptidlánc-glikán szerkezet” formátummal jelölöm, például NKSVILLGR-N4H5S2F1 esetében a glikopeptid egy 9 aminosav hosszúságú peptidláncból és a hozzá kapcsolódó biantennás cukor-oldalláncból épül fel.

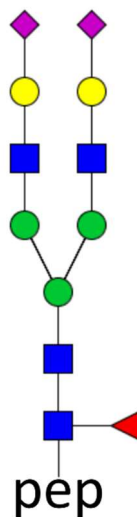
### **III.5. Kiértékelés**

A nyers mérési adatokat a Compass DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonics, Bremen, Németország) szoftverrel újrakalibráltam. Az adott energián készült MS/MS felvételeket az egyes glikopeptidenként összeadtam. A program segítségével meghatároztam a prekursor ion és a fragmensionok intenzitását. Az adott ion intenzitásaként mindig a legintenzívebb izotópcsúcsot vettem figyelembe. A letörési görbék (breakdown curve) esetén az intenzitások mindig az adott ion legnagyobb intenzitására lettek normalizálva az ütközési feszültség függvényében. A dolgozatban található ábrák az Inkscape 0.92 vektorgrafikus programmal, a különböző glikánszerkezetek a GlycoWorkBench 2.1 alkalmazással, a táblázatok pedig a Microsoft Excel 2013 szoftverrel készültek.

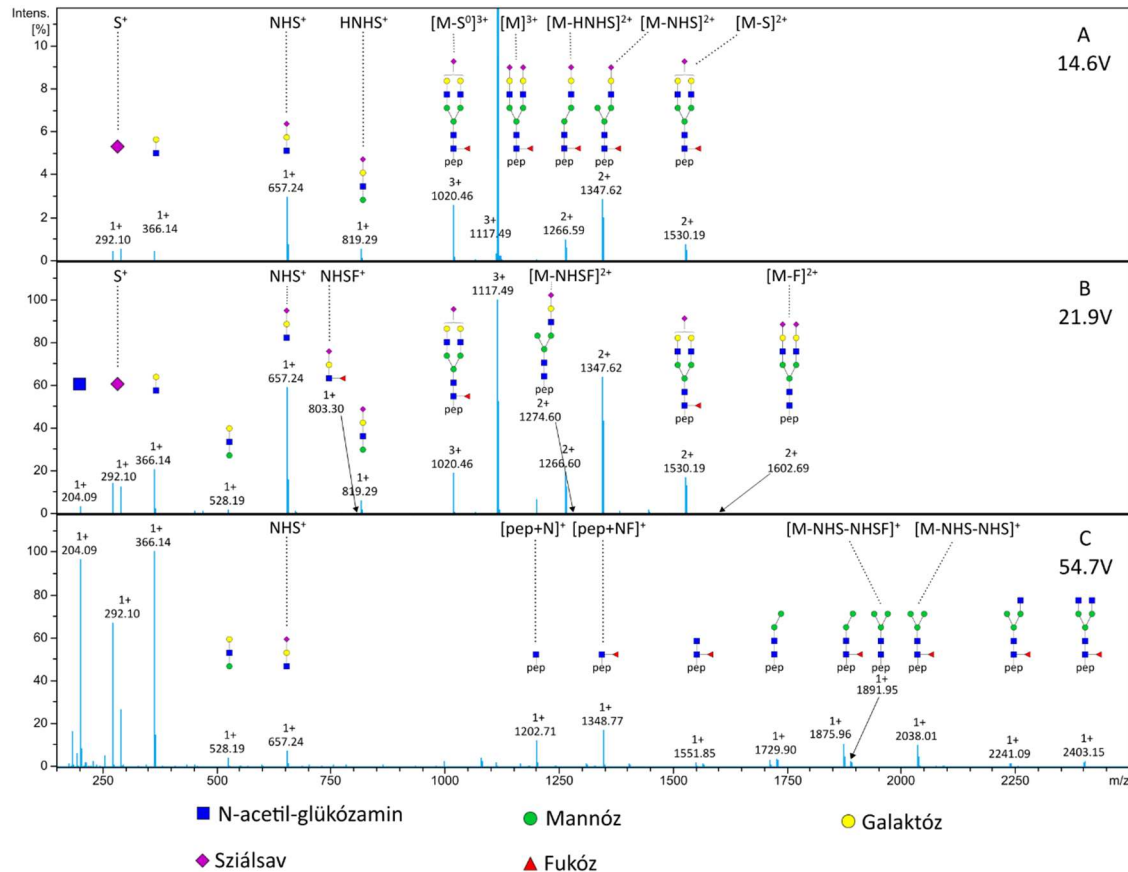
## IV. Eredmények

### IV.1. A core-fukoziláció vizsgálata

A core-fukoziláció azonosításához modellvegyületnek a PSA fehérjét választottam, mely az eddigi ismeretek szerint kizárólag core-fukozilált glikán-oldalláncokat tartalmaz. Az energiafüggő MS/MS méréseket az egyik intenzív glikoformot tartalmazó, 3+ töltésű glikopeptiden végeztem, melynek szekvenciája NKSVILLGR-N4H5S2F1 ( $m/z=1117,492$ ). Az N4H5S2F1 cukor-oldallánc egy biantennás, mindkét antennán szializált, egyszeresen fukozilált szerkezetet jelöl. A core-fukoziláció vizsgálatához használt, PSA-eredetű glikopeptidet a 6. ábra ismerteti. Az NKSVILLGR-N4H5S2F1 glikopeptidről készült energiafüggő MS/MS felvételeket a 7. ábra mutatja be.



**6. ábra** A core-fukoziláció vizsgálatához használt, PSA-eredetű NKSVILLGR-N4H5S2F1 glikopeptid



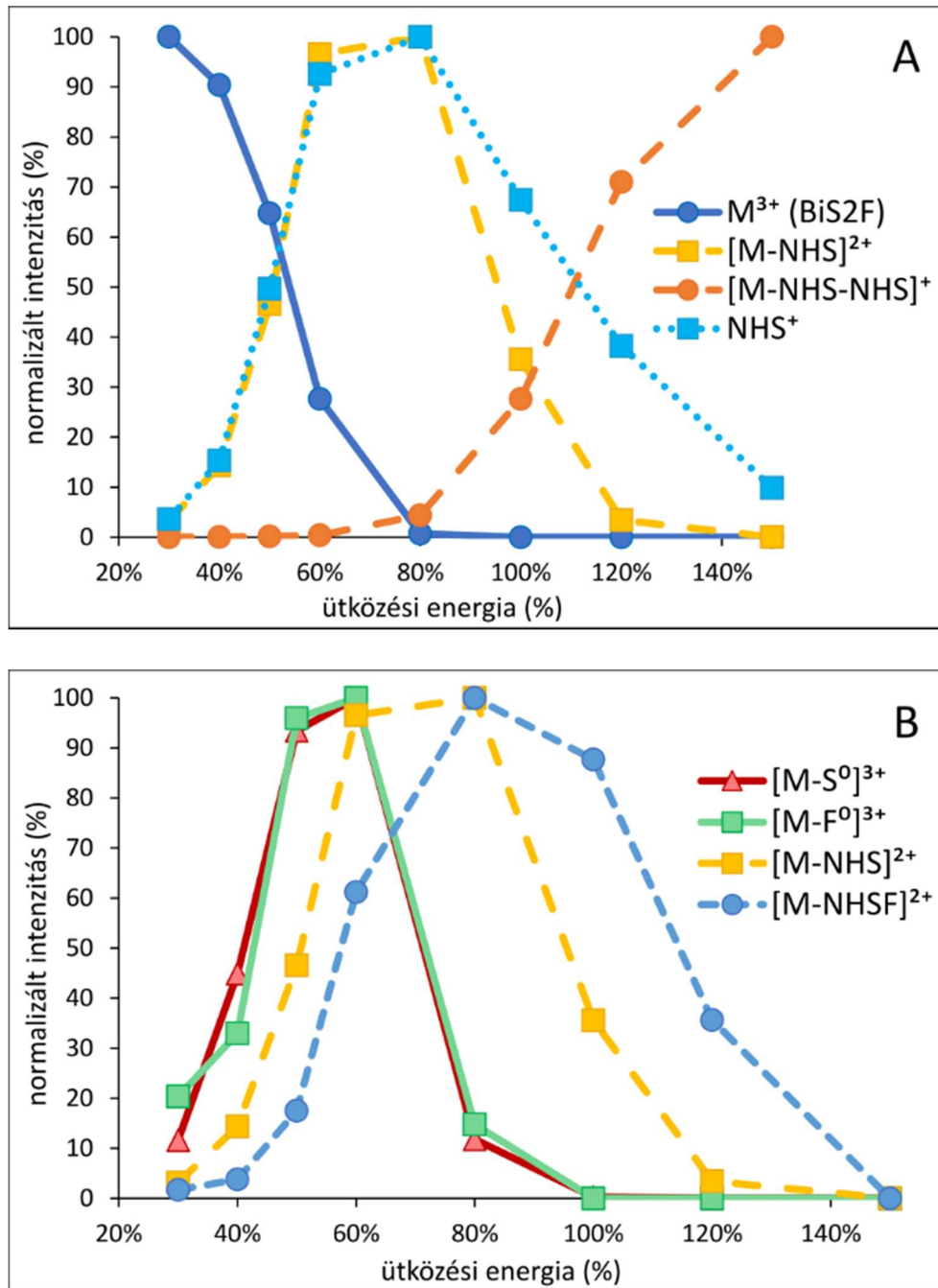
**7. ábra** A PSA-eredetű NKSVILLGR-N4H5S2F1 glikopeptid ( $m/z=1117,492$ ) MS/MS spektruma (A) 14,6 V-on (a standard ütközési energia 40%-a); (B) 21,9 V-on (a standard ütközési energia 60%-a) és (C) 54,7 V-on (a standard ütközési energia 150%-a). Az A ábrán a 12%-os relatív intenzitásra felnagyított spektrum látható, így megfigyelhetőek az alacsonyabb intenzitású fragmensionok.

Az értekezésben az ütközési energia mértékének jellemzésére használt kifejezések (pl. alacsony, közepes, magas ütközési energia) relatív fogalmak. A glikopeptidek jelentősen könnyebben fragmentálódnak, mint a peptidek.[95, 129] A továbbiakban a könnyebb olvashatóság érdekében a háromszorosan protonált molekulaiont  $M^{3+}$ -ként rövidítem. Alacsony energián (7/A,B ábra) a molekulaion ( $m/z=1117,492$ ) csak kis mértékben fragmentálódik, a spektrum legnagyobb intenzitású ionja. A spektrum legdominánsabb fragmensionjai a cukrok közötti kötés felhasadásából képződő 1+ töltésű oxóniumionok (B-ion sorozat) és az ezzel párhuzamosan keletkező 2+ komplementer ionok. A B-ion sorozat tipikus képviselője az egyik antenna lehasadásával képződő  $NHS^+$  ion és megjelenik a komplementer  $[M-NHS]^{2+}$  ion is. Ezzel analóg módon megfigyelhető az  $S^+$

és  $[M-S]^{2+}$ , valamint a  $HNHS^+$  és  $[M-HNHS]^{2+}$  ion képződés is. Ugyan kisebb intenzitással, de megjelenik a hidrogén átrendeződéssel képződő Y-ion sorozat is. Ide sorolható a semleges szialsav vesztes és az így keletkezett komplementer ion  $[M-S^0]^{3+}$ , valamint a semleges fukóz vesztes. Nagyobb energián (7/C ábra) a spektrum teljesen eltérő képet mutat. Az alacsonyabb energiákon intenzív molekulaion gyakorlatilag eltűnt a spektrumból, teljes mértékben fragmentálódott. Kettő- vagy többlépéses folyamatok kerülnek előtérbe, melyek a korábban tárgyalt B és Y-ion képződés kombinációjából jönnek létre. Az egyik ilyen karakterisztikus változás a két antenna lehasadása, mely szekvenciális B-ion képződésként írható le:  $M^{3+} \rightarrow NHS^+ + [M-NHS]^{2+}$ ;  $[M-NHS]^{2+} \rightarrow NHS^+ + [M-NHS-NHS]^+$ . Emellett többlépéses fragmentáció során  $[peptid+N]^+$  és  $[peptid+NF]^+$  ionok keletkeznek, melyeket szoftveres kiértékelés során gyakran használnak a peptidlánc tömegének meghatározására.

A fragmentáció energiafüggését tanulmányozva pontosabb képet kaphatunk a cukoroldallánc szerkezetéről. Egy adott ütközési energián az egyik gyakran vizsgált tulajdonság az ún. survival yield mértéke, mely megmutatja a nem fragmentálódott molekulaion intenzitásának arányát az össz-ionintenzitáshoz viszonyítva.[130] Jelen esetben alacsony energia alatt azt értjük, ha a survival yield legalább 10%, azaz a molekulaion a spektrum legintenzívebb ionjai között van. Magas energia esetén a survival yield kisebb, mint 1%, tehát a molekulaion gyakorlatilag nincs jelen a spektrumban. A 7. ábrán a survival yield értéke (A) 90%; (B) 30%; (C) 0%, azaz a molekulaion teljesen elfragmentálódott. Érdeemes megvizsgálni az ütközési energiát a készülék-gyártó által javasolt ún. standard ütközési energia értékekhez hasonlítva. Az általam vizsgált glikopeptid esetén a molekulaion fragmentációja 10,9V ütközési feszültségen jelent meg, ez a gyári érték 30%-a. Nagyjából 50%-os survival yield volt megfigyelhető 19,3V ütközési feszültségen (gyári érték 53%-a), 10%-os survival yield 26,6V ütközési feszültségen (gyári érték 73%-a) és 29,2 V ütközési feszültségen (gyári érték 80%-a) a molekulaion nem volt detektálható.

A fragmentációs folyamatok energiafüggése jól szemléltethető letörési görbék (breakdown curves) segítségével. Az 8. ábrán a kiválasztott ionok normalizált intenzitását ábrázoltam az ütközési energia függvényében.

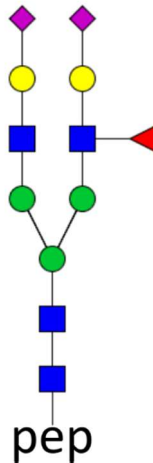


8. ábra A PSA-eredetű NKSVILLGR-N4H5S2F1 glikopeptid ( $m/z=1117,492$ ) letörési görbéi a standard ütközési energiához viszonyított 30-150% ütközési energiatarományban. Az x tengelyen a relatív ütközési energia, az y tengelyen az adott energián az egyes fragmensionok legnagyobb intenzitására normalizált intenzitása látható. Az A ábra az  $M^{3+}$ ,  $[M-NHS]^{2+}$ ,  $[M-NHS-NHS]^+$  és  $NHS^+$  ionok intenzitás változását, a B ábra az  $[M-S^0]^{3+}$ ,  $[M-F^0]^{3+}$ ,  $[M-NHS]^{2+}$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok intenzitás változását ábrázolja.

A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében a kiválasztott ionok intenzitását egyenként normalizáltam oly módon, hogy a legnagyobb relatív intenzitásértéket tekintetem 100%-nak. Az ütközési energiát a standard ütközési energia hányadosaként jeleníttem meg. A 8/A ábra a molekulaion ( $M^{3+}$ ), az egyik fő, egy lépéses, töltésszeparáción alapuló folyamatban keletkezett ionok ( $NHS^+$  és  $[M-NHS]^{2+}$ ) és egy kétlépéses fragmentáció útján keletkezett ion ( $[M-NHS-NHS]^+$ ) intenzitásának energiafüggő változását mutatja be. A molekulaion esetében egyértelműen megjelenik a növekvő ütközési energiával arányos fragmentálódás. Alacsony energián az  $NHS^+$  és  $[M-NHS]^{2+}$  ionoknál szépen megfigyelhető a letörési görbék átfedése, ami alátámasztja, hogy ezen ionok egyazon folyamat során keletkeznek. Az  $NHS^+$  ion egy- és kétlépéses folyamat során is létrejöhet, erre utal 80% ütközési energia felett az  $[M-NHS]^{2+}$  görbéjéhez viszonyítva elnyújtott görbealak. A kétlépéses fragmentáció jól láthatóan elkülönül az egylépéses folyamatoktól, az  $[M-NHS-NHS]^+$  ion képződése csak 60% feletti ütközési energián indul meg. A 8/B ábrán a semleges szíálsav és fukóz vesztés során keletkezett ionok ( $[M-S^0]^{3+}$  és  $[M-F^0]^{3+}$ ), valamint az  $[M-NHS]^{2+}$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok intenzitásának változása kerül bemutatásra. Megfigyelhető, hogy a semleges szíálsav és fukóz vesztés görbéje nagymértékű átfedésben van egymással. Mindkét típusú semleges vesztésre jellemző, hogy a töltésszeparációs folyamatokhoz képest alacsonyabb aktiválási energiát igényelnek. A fukozilált antenna elvesztésére utaló  $[M-NHSF]^{2+}$  ion az  $[M-NHS]^{2+}$  ionhoz képest magasabb energián kezd el fragmentálódni, mely kétlépéses fragmentációs folyamatra utal:  $M^{3+} - F^0-NHS^+ \rightarrow [M-NHSF]^{2+}$ .

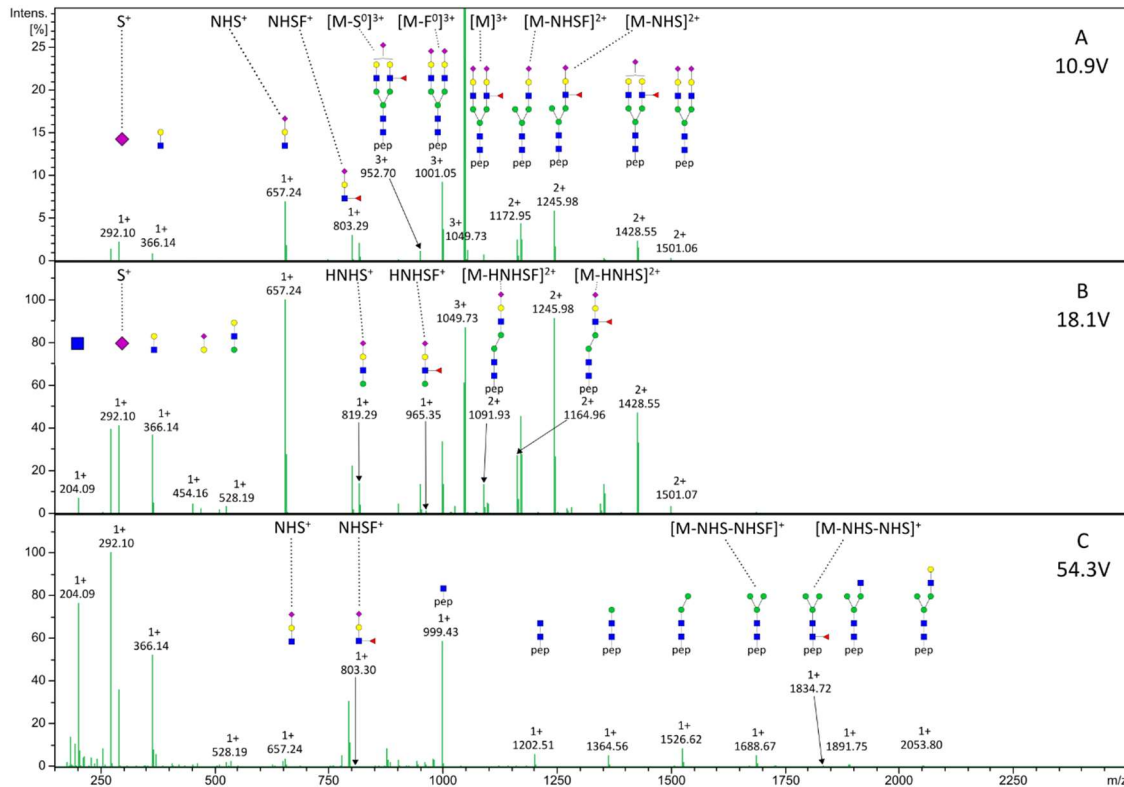
## IV.2. Az antenna-fukoziláció vizsgálata

Az antenna-fukoziláció modellvegyületül az AGP-t választottam, mely az eddigi ismeretek szerint csak az antennán elhelyezkedő fukóz szubsztituenst tartalmaz.[81, 131] Vizsgálataim során az egyik nagy mennyiségben jelenlévő, 3+ töltésű NEEYNK-N4H5S2F1 glikopeptidet ( $m/z=1049,726$ ) tanulmányoztam. A cukor-oldallánc összegképletileg megegyezik a PSA esetében választott glikánnal, mely egy biantennás, mindkét antennán szializált szerkezet, azonban az AGP glikánja egy, az antennán elhelyezkedő fukózt tartalmaz (9. ábra). A különböző ütközési energiákon felvett MS/MS spektrumokat a 10. ábra mutatja be.



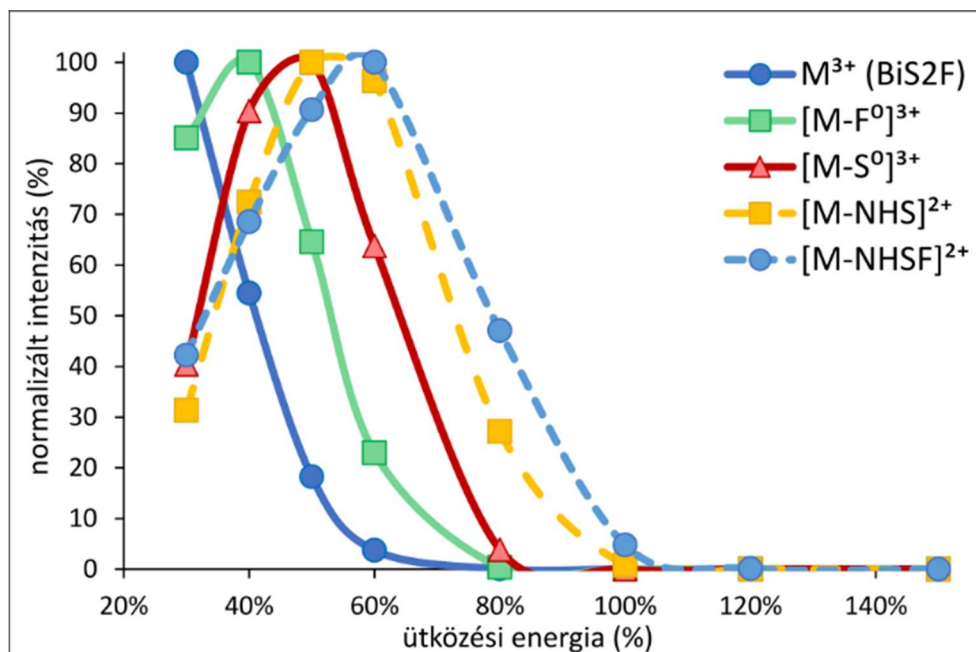
9. ábra Az antenna-fukoziláció vizsgálatához használt, AGP-eredetű NEEYNK-N4H5S2F1 glikopeptid





**10. ábra** Az AGP-eredetű NEEYNK-N4H5S2F1 glikopeptid ( $m/z=1049,726$ ) MS/MS spektruma (A) 10,9 V-on (a standard ütközési energia 30%-a); (B) 18,1 V-on (a standard ütközési energia 50%-a) és (C) 54,3 V-on (a standard ütközési energia 150%-a). Az A ábrán a 25%-os relatív intenzitásra felnagyított spektrum látható, így megfigyelhetőek az alacsonyabb intenzitású fragmensionok.

Alacsony energián (10/A,B ábra) a B ion sorozat, csak úgy, mint a PSA esetén, a legintenzívebb fragmensek közé tartozik. Egyértelműen azonosíthatók az antennák hasadásával képződő  $S^+$ ,  $NHS^+$ ,  $NHSF^+$ ,  $HNHS^+$ ,  $HNHSF^+$  oxóniumionok és komplementer,  $2+$  töltésű fragmensionok. A semleges veszteségek közül megfigyelhető a semleges szíalsav veszteség. Ezen felül a spektrumban megjelenik a semleges fukóz veszteség, mely csúcshintérsége közel tízszerese a semleges szíalsav veszteségnek. Magas ütközési energián (10/C ábra) a molekulaion gyakorlatilag eltűnik a spektrumból és a kettő- vagy többlépéses fragmentációs folyamatok dominálnak. Az így keletkező,  $1+$  töltésű fragmensionok közül kiemelendő a két antenna szekvenciális elvesztésével ( $NHS^+$  és  $NHSF^+$ ) képződő  $[M-NHS-NHSF]^+$  ion. Emellett, ugyan kisebb intenzitással, de azonosítható az  $[M-NHS-NHS]^+$  ion is. A 11. ábra néhány fontosabb ion letörési görbéjét mutatja be az ütközési energia függvényében, a 8. ábrával megegyező módon.



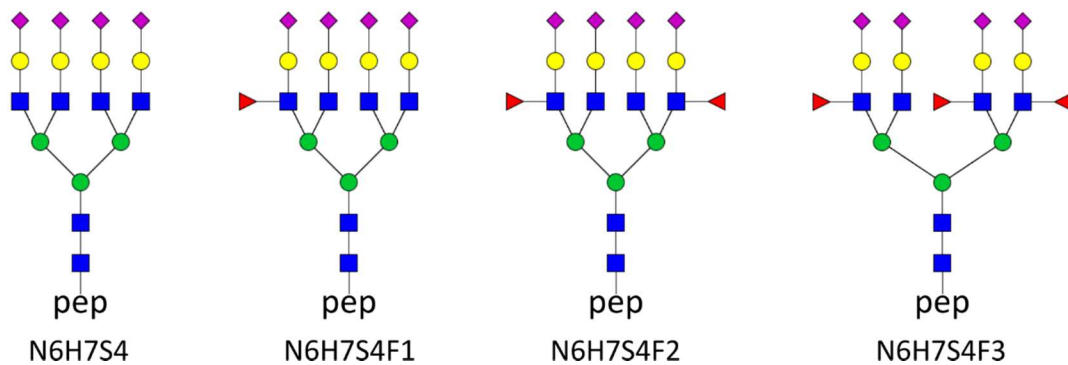
**11. ábra** Az AGP-eredetű NEEYNK-N4H5S2F1 glikopeptid ( $m/z=1049,726$ ) letörési görbéi a standard ütközési energiához viszonyított 30-150% ütközési energiatarományban. Az x tengelyen a relatív ütközési energia, az y tengelyen az adott energián az egyes fragementionok legnagyobb intenzitására normalizált intenzitása látható. Az ábra az  $M^{3+}$ ,  $[M-F^0]^{3+}$ ,  $[M-S^0]^{3+}$ ,  $[M-NHS]^{2+}$ , és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok intenzitás változását hasonlítja össze.

A molekulaion ( $M^{3+}$ ) fragmentációja, a fukóz nélküli antenna elvesztése ( $[M-NHS]^{2+}$ ) és a semleges sziálsav vesztes ( $[M-S^0]^{3+}$ ) a PSA glikopeptid esetén megfigyeltekkel (8. ábra) analóg módon történik. Az  $[M-NHS]^{2+}$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok letörési görbéje egymáshoz nagyon hasonló, azonban az  $[M-NHSF]^{2+}$  görbéje némileg kiszélesedik. Ez jól szemlélteti, hogy az  $[M-NHSF]^{2+}$  ion kétféle úton is létrejöhet: egy lépésben, töltésszeparációval ( $M^{3+}-NHSF^+$ ) vagy két lépésben, semleges fukóz veszteséssel kombinálva ( $M^{3+}-F^0-NHS^+$ ). Valószínűleg mindkét folyamat szignifikánsan hozzájárul az  $[M-NHSF]^{2+}$  ion képződéséhez. A semleges sziálsav vesztes ( $[M-S^0]^{3+}$ ) kisebb aktiválási energiát igényel, mint az  $[M-NHS]^{2+}$  képződés, mely összhangban van a core-fukoziláció vizsgálatának eredményeivel. A semleges fukóz vesztes ( $[M-F^0]^{3+}$ ) jelentősen kisebb energiát igényel, mint a semleges sziálsav vesztes ( $[M-S^0]^{3+}$ ) és a többi fragmentációs folyamathoz viszonyítva is egy nagyon alacsony aktiválási energiájú reakcióként értelmezhető. Ez megmagyarázza az alacsony energián megfigyelhető nagy intenzitást.

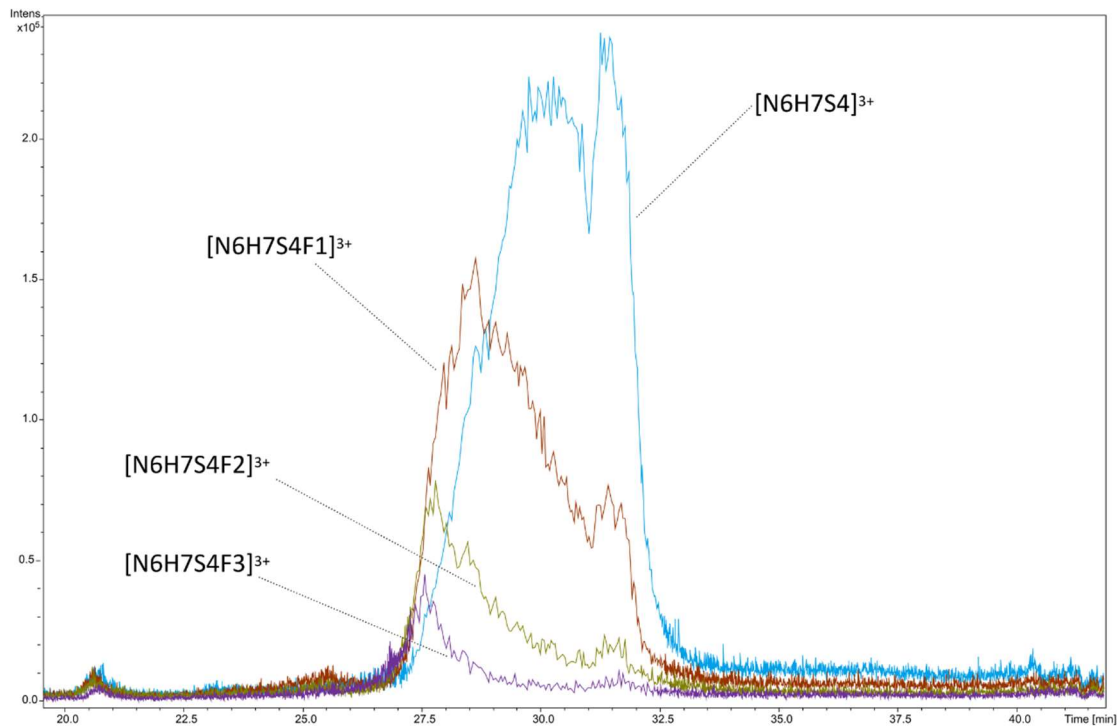
Ennek alapján feltételezhető, hogy minden fukózt tartalmazó ion semleges vesztés folyamán könnyedén elveszíti a fukóz szubsztituenszt, mely nagymértékben bonyolítja a kiértékelést. A fragmentációs folyamatok elemzéséből levonható következtetéseket az értekezés „Megbeszélés” című fejezetében ismertetem.

### IV.3. Többszörösen fukozilált AGP glikoformok szerkezeti jellemzése

Az AGP fehérjének több genetikai variánsát is leírták és öt lehetséges *N*-glikozilációs helyet azonosítottak.[118] Kísérleteim során az A1AG2\_HUMAN Uniprot azonosítójú genetikai variáns N<sup>103</sup>-as glikozilációs helyén található glikoformokat vizsgáltam. Ezek közül a többszörös fukoziláció bemutatására az N6H7S4 alapvázú cukor-oldalláncot választottam. A 3+ töltésű, fukózt nem tartalmazó glikopeptid szekvenciája ENGTVSR-N6H7S4 ( $m/z=1427,205$ ), mely egy tetraantennás, minden antennán szializált szerkezetet jelöl. A vizsgált glikoformok szerkezetét az 12. ábra mutatja be a lehetséges fukozilációs helyekkel. A 13. ábra a vizsgált glikopeptidek extrahált ionkromatogramját (EIC, Extracted Ion Chromatogram) ábrázolja.

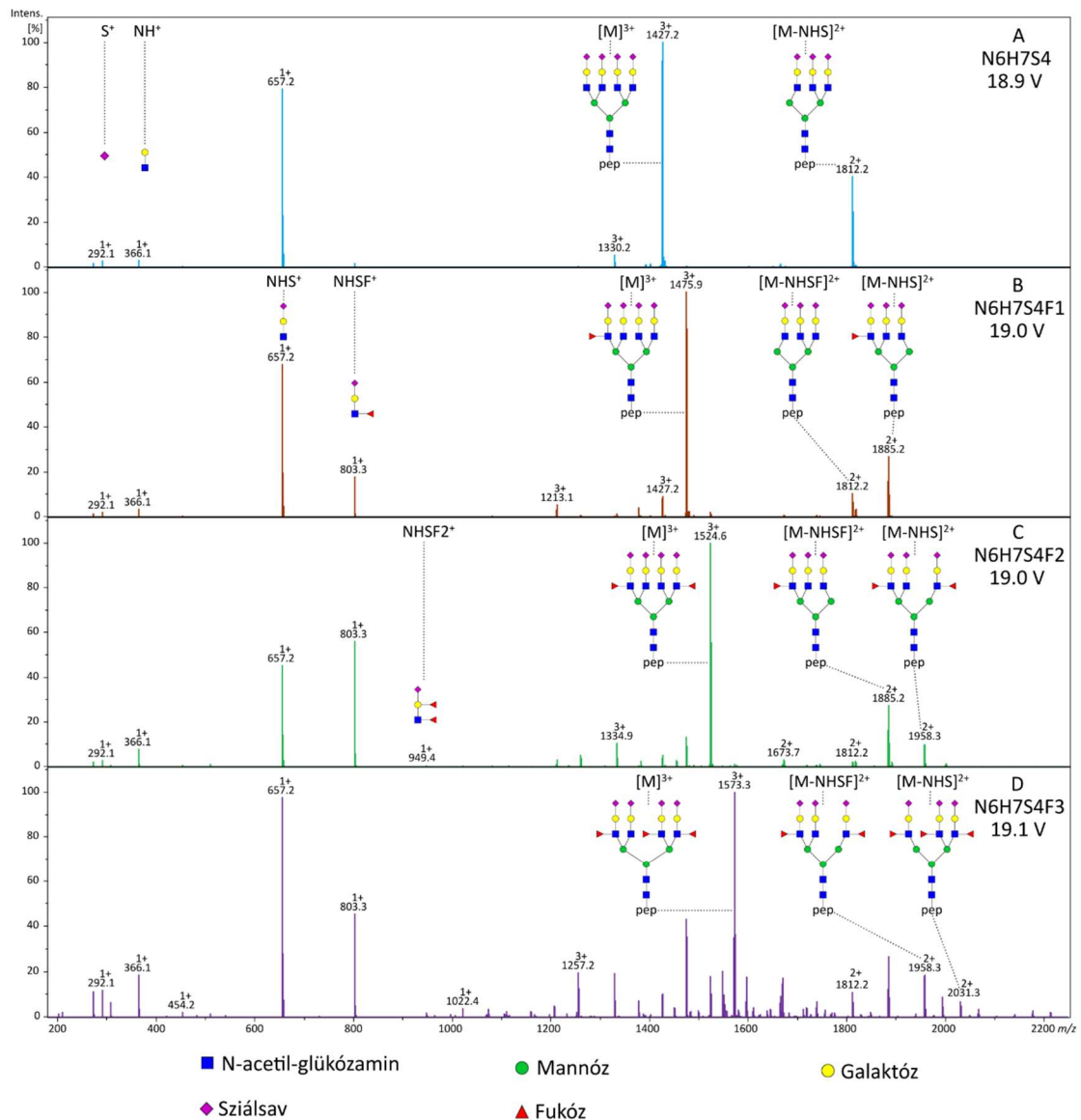


**12. ábra** Az AGP N<sup>103</sup>-as glikozilációs helyén található tetraantennás glikoformok szerkezete



### 13. ábra Az AGP-eredetű, 3+ töltésű, tetraantennás ENGTVSR glikopeptid extrahált ionkromatogramja

Jól látható, hogy az ENGTVSR-N6H7S4 glikopeptid széles csúcsban eluálódik, melynek legalább két lokális maximuma van. Az extrahált ionkromatogram különböző pontjairól származó MS/MS méréseket kiértékeltem. Ez alapján a fragmentációban eltérést nem tapasztaltam, az ENGTVSR-N6H7S4 glikopeptid az összes spektrumban igazolható, ezért a jelenség nagy valószínűséggel a különböző glikán izomerek jelenlétét jelzi. Az alacsony ütközési energián felvett MS/MS spektrumot a 14/A ábra mutatja be. Az alkalmazott ütközési energia minden vizsgált glikoform esetén a standard ütközési energia 50%-ának felel meg.



**14. ábra** Az AGP-eredetű, tetraantennás glikopeptid MS/MS spektruma a standard ütközési energia 50%-án: (A) az ENGTVSR-N6H7S4 glikopeptid ( $m/z=1427,205$ ); (B) az ENGTVSR-N6H7S4F1 glikopeptid ( $m/z=1475,891$ ); (C) az ENGTVSR-N6H7S4F2 glikopeptid ( $m/z=1524,577$ ); (D) az ENGTVSR-N6H7S4F3 glikopeptid ( $m/z=1573,263$ )

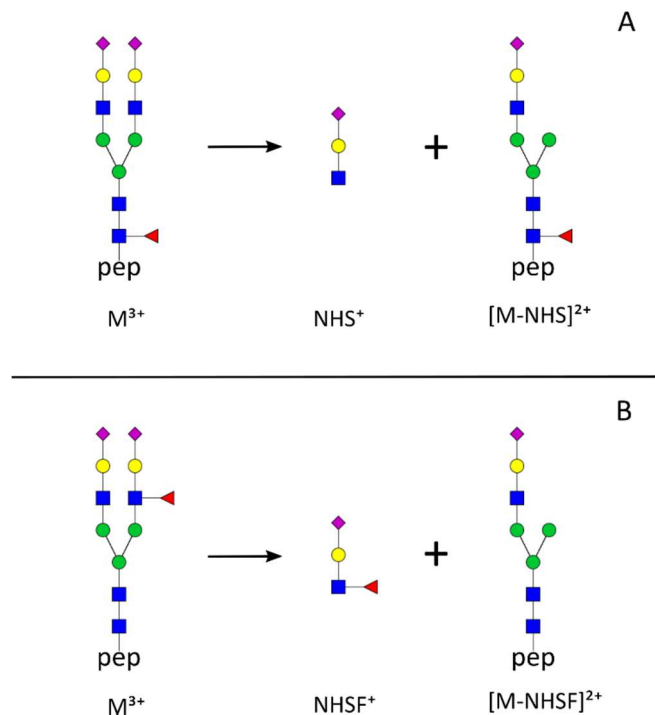
A molekulaion alacsony energián való fragmentációja a korábban ismertetett glikopeptidekkel analóg módon történik. A spektrumot dominálják a B-ion sorozatot alkotó fragmensionok, ezek közül is kiemelendő az egyik antenna elvesztésével keletkező  $NHS^+$  és a komplementer  $[M-NHS]^{2+}$  ion.  $NHSF^+$  ion értelemszerűen nincs, mivel a

glikoform nem tartalmaz fukóz szubsztituenset. A semleges veszteségek közül a semleges sziálsav veszteség kis intenzitású csúcsként jelenik meg. Az egyszeresen fukozilált glikoform (N6H7SF1,  $m/z=1475,891$ ) relatív csúcs alatti területe a fukóz nélküli glikoform 58%-a (13. ábra). Retenciós ideje körülbelül 0,1 perccel kisebb, mint a fukozilálatlan glikoformé. Ez jó összhangban van a korábbi megfigyelésekkel, mely szerint a fukóz szubsztituens jelenléte korábbi elúciót eredményez.[97] Az MS/MS felvételen (14/B ábra) a nem-fukozilált glikoformhoz hasonlóan a töltésszeparációs folyamatok a legnagyobb intenzitásúak. Az antennák lehasadásával megjelennek az  $NHS^+$  és  $NHSF^+$  fragmentumok, melyek aránya körülbelül 3:1, ami jól szemlélteti, hogy a négy antenna közül az egyik fukozilált. Emellett a komplementer  $[M-NHS]^{2+}$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok is jelen vannak. A spektrumban a semleges sziálsav veszteség mellett megfigyelhető a kis intenzitású semleges fukóz veszteség és e folyamatok kombinációja is. Az  $m/z$  alapján feltételezhetően bifukozilált glikoform (N6H7S4F2,  $m/z=1524,577$ ) extrahált ionkromatogramja hasonló az egy fukózt tartalmazó glikoforméhoz, retenciós ideje az extra fukóz szubsztituens következtében további 0,1 perccel kisebb. Relatív csúcs alatti területe a nem-fukozilált glikoform 20%-a (13. ábra). Az MS/MS spektrum (14/C ábra) fragmentációs folyamatai az egyszeresen fukozilált glikoformmal analógok. Megfigyelhetőek a töltésszeparációval létrejövő  $NHS^+$  és  $NHSF^+$  ionok, valamint a komplementer  $[M-NHS]^{2+}$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok is. Az  $[M-NHSF]^{2+}$  ion  $[M-NHS]^{2+}$  ionhoz viszonyított magasabb intenzitása valószínűsíthetően többlépéses fragmentációs folyamatok jelenlétére utal, mint például az  $[M-NHS]^{2+}$  ion semleges fukóz veszteség. Az  $NHS^+$  és  $NHSF^+$  ionok közel azonos intenzitása jó összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy a glikoform két fukozilált és két nem-fukozilált antennát tartalmaz. A semleges veszteségek között megfigyelhető az egy, illetve két semleges fukóz veszteség, valamint ezek semleges sziálsav veszteséggel történő kombinációi. Az intenzív ionok mellett megjelenik egy kis intenzitású ion is, mely a pontos tömeg és az izotóp-eloszlás alapján az  $NHSF_2^+$  szerkezetnek felel meg. A spektrumok jó minőségűek, alacsony a zajszint, így a nagyon alacsony intenzitású csúcsokat is megbízhatóan tudjuk azonosítani. Az ion intenzitása az  $NHS^+$  és  $NHSF^+$  ionok összintenzitásának 0,8%-a. A feltételezhetően trifukozilált glikoform (N6H7S4F3,  $m/z=1573,263$ ) az extrahált ionkromatogramon egy kis csúcsként jelenik meg, retenciós ideje a bifukozilált glikoformtól további 0,1 perccel kisebb. Relatív csúcs alatti területe a fukóz nélküli

glikoform 7%-a (13. ábra). A B-ion sorozat leggyakoribb fragmensionjai ( $\text{NHS}^+$ ,  $[\text{M-NHS}]^{2+}$ ,  $\text{NHSF}^+$ ,  $[\text{M-NHSF}]^{2+}$ ) megtalálhatóak a spektrumban (14/D ábra). A glikoform nagyon kis mennyiségéből adódóan a spektrum számos interferenciát tartalmaz.

## V. Megbeszélés

A fragmentációs folyamatokat különböző ütközési energiákon tanulmányozva következtethetünk a cukor-oldallánc szerkezeti felépítésére. A core- és antenna-fukoziláció elkülönítéséhez fontos azonosítani az adott típusú fukozilációra jellemző ún. diagnosztikus fragmenseket. A diagnosztikus fragmensek jelenlétéből, hiányából és az egymáshoz viszonyított arányából következtetni lehet a fukóz elhelyezkedésére. A vizsgálatokhoz olyan modellvegyületeket választottam, melyek az eddigi ismeretek alapján csak core- (PSA) vagy csak antenna-fukózt (AGP) tartalmaznak. Az egyik legjelentősebb fragmentációs folyamat az antennák lehasadása a core szerkezetről, melyet a 15. ábra mutat be.



**15. ábra** Az antenna és a core közötti hasítás folyamata (A) core-fukoziláció jelenlétében; (B) antenna-fukoziláció jelenlétében

### V.1. A core-fukoziláció azonosítása

Core-fukoziláció esetében a PSA fehérjéből származó NKSVILLGR-N4H5S2F1 glikopeptid energiafüggő MS/MS spektrumait tanulmányoztam. Alacsony energián



(7/A,B ábra) a legnagyobb intenzitású folyamat az antennák és a core közötti hasítás, ami a glikopeptidek jellemző tulajdonsága.[93, 132] Megtalálhatóak a spektrumban az antenna végén található szialsav ( $[M-S]^{2+}$ ) és az egyik, fukózt nem tartalmazó antenna lehasadásával ( $[M-NHS]^{2+}$ ) keletkezett fragmensionok és a hozzájuk tartozó B-ionok ( $S^+$ ,  $NHS^+$ ) is (15/A ábra). A kimutatási határ felett, az  $[M-NHS]^{2+}$  ion intenzitásának körülbelül 0,1%-ával azonosítható a fukóz hasítását jelző  $[M-F]^{2+}$  és az egy fukózt tartalmazó antenna elvesztésével keletkező  $[M-NHSF]^{2+}$  ion is (15/B ábra). Az  $NHSF^+$  ion is zajszinthez közeli intenzitású. Jelen van a semleges fukóz vesztésével keletkező  $[M-F^0]^{3+}$  ion, intenzitása a semleges szialsav vesztés ( $[M-S^0]^{3+}$ ) kevesebb, mint 10%-a. A core-fukoziláció jellemzését 4 lépésben lehet összefoglalni: 1, az első lépés megállapítani, hogy az intenzív ionok közül melyek jellemzik a core-fukózt, illetve mely ionok lennének intenzívek antenna-fukoziláció esetén. Alacsony ütközési energián a core-fukóz jelenlétére utal a fukózt nem tartalmazó antenna elvesztése ( $NHS^+$ ,  $[M-NHS]^{2+}$ ). 2, a második lépés megvizsgálni, hogy nyomokban előfordul-e antenna-fukoziláció ( $NHSF^+$ ,  $[M-NHSF]^{2+}$ ). 3, harmadik lépés az antenna-fukóz arányának kvalitatív becslése. 4, az utolsó, negyedik lépés az antenna-fukóz arányának kiszámítása egyenlet alapján. A PSA-glikopeptid esetében az alacsony ütközési energiás felvételek alapján a fukóz a core-hoz rendelhető, mivel az antenna-fukozilációt igazoló  $NHSF^+$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok nagyon kis intenzitásúak vagy hiányoznak, csak nyomokban fordulnak elő. Ezzel szemben a fukózt nem tartalmazó antennák hasításából képződő ionok ( $NHS^+$ ,  $[M-NHS]^{2+}$ ) a legintenzívebbek a spektrumban. Ez alapján alacsony ütközési energián a core-fukoziláció igazolása indirekt módon, az  $NHSF^+$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok hiányával történik. A minimális intenzitású töltésszeparációs fukóz fragmentáció ( $[M-F]^{2+}$ ) és semleges fukóz vesztés ( $[M-F^0]^{3+}$ ) arra utal, hogy a core-fukóz erősen kötődik a cukor-oldallánchoz. Magas ütközési energián (7/C ábra) az intenzív, két antenna elvesztésével keletkezett  $[M-NHS-NHS]^+$  ion egyértelmű bizonyítéka a core-fukozilációnak. Az  $[M-NHS-NHSF]^+$  ion az antenna-fukoziláció jelenlétére utal, azonban keletkezésére más magyarázat is van. Létrejöhet például a fukóz vándorlása eredményeképp vagy egy többlépéses, kombinált fragmentációs folyamatban ( $[M^{3+}-NHS^+ - NHS^+ - F^0]^+$ ).

A core- és antenna-fukoziláció megkülönböztethető a spektrumban fellelhető jellegzetes fragmensionok alapján. Ezen ionok egymáshoz viszonyított arányából következtetni lehet egy adott mintában található core- és antenna-fukoziláció mértékére. A fragmensionokat

többféle csoportosítás szerint, egyenletek felírásával is megvizsgálhatjuk. Az első általam javasolt egyenlet (1. egyenlet) főként alacsony ütközési energián használható, ahol túlnyomórészt az egylépéses fragmentációs folyamatok dominálnak.

$$F_1 = n * \frac{[M-NHSF]^{2+}}{[M-NHS]^{2+} + [M-NHSF]^{2+}} \quad 1. \text{ egyenlet}$$

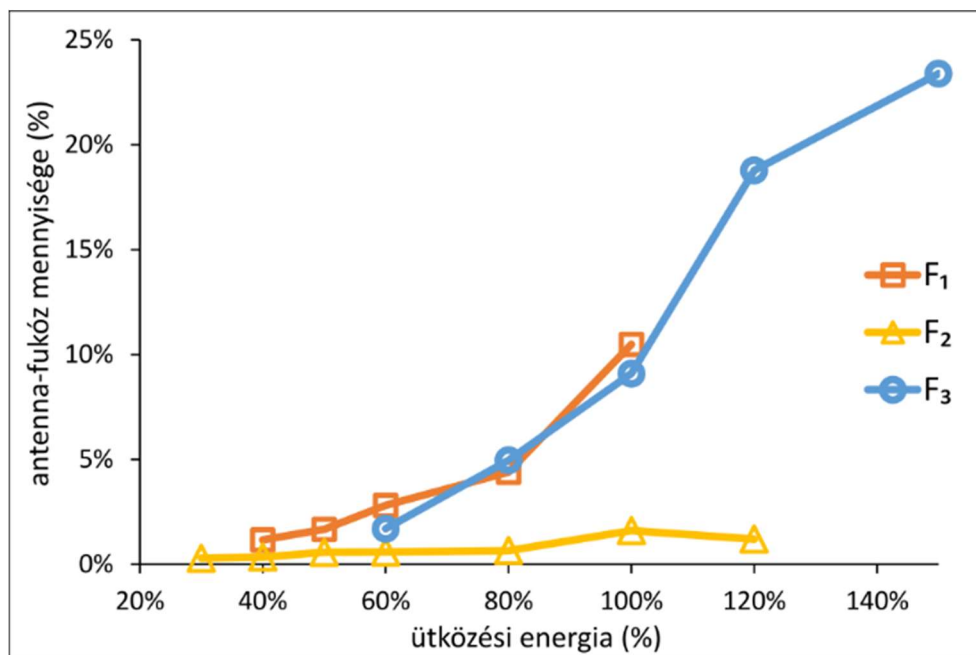
Az egyenletben az ionok intenzitását viszonyítjuk egymáshoz. Az  $n$  az antennák számát jelöli, ami jelen esetben kettő. A kétszeres szorzó kompenzálja azt a tényt, hogy két antenna van, de a teljes szerkezet csak egy fukózt tartalmaz, így csak az egyik antenna lehet fukozilált. Ebben az egyenletben azt feltételezzük, hogy: 1, az antenna hasítása ugyanolyan valószínűséggel történik meg a fukozilált és a nem-fukozilált antenna esetén; 2, az  $[M-NHS]^{2+}$  és  $[M-NHSF]^{2+}$  ionok további fragmentációja azonos valószínűségű; és 3, nincsenek kétlépéses folyamatok. A második becslés az oxóniumionok arányán alapul (2. egyenlet).

$$F_2 = n * \frac{NHSF^+}{NHS^+ + NHSF^+} \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Mivel az  $NHSF^+$  ion sokkal könnyebben fragmentálódik, mint az  $NHS^+$  ion, az egyenlet valószínűleg jelentősen alulbecsüli az antenna-fukoziláció és a fukóz vándorlás mértékét. A harmadik egyenlet a főként magas ütközési energián megfigyelhető, kétlépéses fragmentációs folyamaton, a két antenna elvesztésén alapul (3. egyenlet).

$$F_3 = \frac{[M-NHS-NHSF]^+}{[M-NHS-NHS]^+ + [M-NHS-NHSF]^+} \quad 3. \text{ egyenlet}$$

Az egyenletek alapján kiszámolt  $F_1$ ,  $F_2$  és  $F_3$  értékeket az ütközési energia függvényében az 16. ábra mutatja be.



**16. ábra** Az antenna-fukoziláció mértéke a PSA-eredetű NKSVILLGR-N4H5S2F1 glikopeptid esetében, az  $F_1$ ,  $F_2$  és  $F_3$  értékek alapján, a standard ütközési energia függvényében

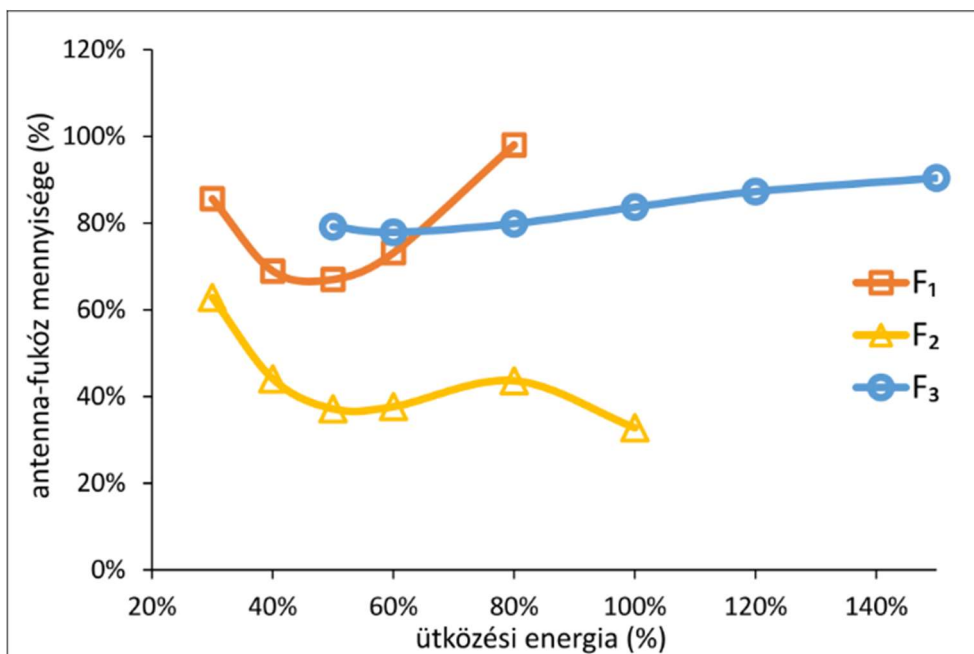
Az  $F_1$  és  $F_3$  értékek olyan szempontból analógiát mutatnak, hogy mindkét egyenlet értékét jelentősen befolyásolják a többlépéses fragmentációs folyamatok és a fukóz vándorlás. Véleményem szerint a többlépéses fragmentációs folyamatoknak nagyobb szerepe van, mint a fukóz vándorlásnak. Mindkét érték ( $F_1$  és  $F_3$ ) az ütközési energia növelésével egyértelmű növekedést mutat. Ennek magyarázata, hogy az ütközési energia növelésével növekszik a többlépéses fragmentációs folyamatok gyakorisága és a fukóz vándorlás mértéke a core-ról az antenna irányába. Megnyugtató, hogy a közepes ütközési energia tartományban (a standard ütközési energia 60-100%-a), ahol egy- és többlépéses fragmentációs folyamatok is jelen vannak, az  $F_1$  és  $F_3$  görbék lefutása szinte azonos. Az  $F_2$  érték az  $\text{NHSF}^+$  ion könnyű fragmentációja következtében egy jelentősen alulbecsült érték. Azonban ez az érték közvetlenül igazolja az antenna-fukóz jelenlétét, ami mivel a PSA tisztán core-fukozilált, megmutatja a fukóz vándorlás mértékét. Az  $F_2$  értéke nem változik jelentősen az ütközési energia növelésével, valószínűsíthetően azért, mert az  $\text{NHSF}^+$  ion növekvő fragmentációja és a növekvő fukóz vándorlás kompenzálják egymást. Az eredmények alapján elmondható, hogy alacsony energián mind a core-ról az antenna irányába történő fukóz vándorlásnak, mind a többlépéses folyamatoknak kevés

zavaró hatása van. Alacsony energián (standard ütközési energia 40-50%-a, a survival yield 40% feletti) az antenna-fukoziláció mértékére a legjobb becslést valószínűleg az  $F_1$  érték adja. Ilyen körülmények között az antenna-fukoziláció határértéke 2-3% körüli, mely a többlépéses fragmentációs folyamatok és a fukóz vándorlás eredménye. Ha az  $F_1$  érték ennél szignifikánsan nagyobb, az a valós antenna-fukoziláció jelenlétét mutatja. Az antenna-fukoziláció mértéke magasabb ütközési energián is meghatározható, azonban kisebb pontossággal. Ennek felső limitje, hogy a molekulaion még jól azonítható legyen a spektrumban (intenzitása legyen legalább 1%, jelen esetben ez a standard ütközési energia 80%-a). Ilyen esetben a fukóz vándorlásból és a többlépéses fragmentációs folyamatokból adódó hiba még relatíve alacsony, körülbelül 5%. Ennél magasabb ütközési energiákon (7/C ábra, a standard ütközési energia 150%-a) hiányzik a spektrumból a molekulaion és az egylépéses fragmentációs folyamatokban keletkező 2+ töltésű ionok. A core-fukoziláció egyértelműen meghatározható például a [peptid+NF]<sup>+</sup> vagy az [M-NHS-NHS]<sup>+</sup> ion alapján, azonban az antenna-fukoziláció jelenlétéről vagy mértékéről nem tudunk információt kapni. Általános felhasználáskor, a core-fukoziláció jellemzésére elsődlegesen javasolt az  $F_1$  érték kiszámítása, lehetőség szerint alacsony ütközési energián felvett spektrumból, mivel a fukóz vándorlás és az interferenciák mértéke még alacsony, az értékelést nem zavarják.

## V.2. Az antenna-fukoziláció azonosítása

Az antenna-fukoziláció vizsgálatára az AGP-ből származó, tisztán antenna-fukozilált NEEYNK-N4H5S2F1 glikopeptidet választottam. Alacsony ütközési energián (10/A ábra) a korábbi megfigyelésekhez hasonlóan a töltésszeparációs fragmentációs folyamatok dominálnak. A biantennás szerkezet egyik antennája fukozilált, a másik nem tartalmaz fukózt, így a spektrumban a fukozilált és nem-fukozilált fragmensionok is intenzívek. Az antenna-fukoziláció egyértelműen azonosítható az intenzív NHSF<sup>+</sup> és [M-NHSF]<sup>2+</sup> ionok jelenlétéből. Ezen ionok nagy intenzitásuk miatt az analitikai munkához rendkívül hasznosak. Azonban a spektrumban fellelhető ionok alapján a core-fukoziláció jelenléte nem zárható ki. Megfigyelhető a semleges sziálsav vesztéshez képest közel 10-szeres intenzitású semleges fukóz vesztés ([M-F<sup>0</sup>]<sup>3+</sup>). A core-fukozilált PSA glikopeptid esetén a semleges fukóz vesztés csak nyomokban volt megtalálható a spektrumban. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy az antenna-fukóz egy jóval gyengébb kötéssel kötődik,

mint a core-fukóz. Így valószínűleg a többlépéses fragmentációs folyamatok és a fukóz vándorlás is nagyobb mértékben fog jelentkezni, mint a core-fukoziláció esetén. Magas ütközési energián (10/C ábra) analitikai szempontból az egyik legfontosabb ion a két antenna szekvenciális elvesztésével keletkezett  $[M-NHS-NHSF]^+$  fragmentum, ami jól megfigyelhető a spektrumban. Emellett kis intenzitással, de egyértelműen azonosítható az  $[M-NHS-NHS]^+$  fragmentum is. Ennek jelenléte utalhat: 1, valószínűleg core-fukozilációra; 2, az antennáról a core-ra történő fukóz vándorlásra; 3, semleges fukóz veszteségre. Az antenna-fukoziláció mértéke meghatározható a korábban alkalmazott  $F_1$ ,  $F_2$  és  $F_3$  értékek segítségével. Az ütközési energia függvényében ábrázolt  $F_1$ ,  $F_2$  és  $F_3$  értékeket a 17. ábra mutatja be.



**17. ábra** Az antenna-fukoziláció mértéke az AGP-eredetű NEEYNK-N4H5S2F1 glikopeptid esetében, az  $F_1$ ,  $F_2$  és  $F_3$  értékek alapján, a standard ütközési energia függvényében

A kapott értékek látványosan különböznek a core-fukoziláció esetén megfigyelt eredményektől és már alacsony ütközési energiákon is nagymértékű ütközési energiafüggést mutatnak. Az  $F_1$  érték valószínűleg alulbecsült, az  $[M-NHSF]^{2+}$  ion mennyiségét befolyásolja az antennáról a core-ra történő fukóz vándorlás és a semleges fukóz vesztesés is ( $M^{3+}-NHS^+-F^0$  vagy  $M^{3+}-F^0-NHS^+$  formájában). Alacsony energián (a standard

ütközési energia 30%-a, survival yield 70%) az  $F_1$  érték 86% antenna-fukozilációt mutat. Mivel ismert, hogy az AGP tisztán antenna-fukozilált, az eredmények azt sugallják, hogy az a zavaró folyamatoknak, interferenciáknak jelentős hatása van, még alacsony ütközési energián is. Az interferáló folyamatok mértéke lényegesen nagyobb, mint a core-fukoziláció esetében. Az  $F_1$  érték alapján az antennáról a core-ra történő fukóz vándorlás mértéke még alacsony energián is 14%-nak adódik. Ez az érték részben a fukóz vándorlás, részben a semleges fukóz vesztes eredménye, azonban nem tudjuk megmondani, hogy milyen mértékben felelősek az egyes folyamatok. Az  $F_1$  érték az ütközési energia növelésével meredeken növekszik, a standard ütközési energia 40%-án, 40%-os survival yield esetében már 31%. Az  $F_2$  érték az  $\text{NHSF}^+$  ion könnyű fragmentációja miatt még rosszabb becslést mutat. A standard ütközési energia 30%-án 37%-os fukóz vándorlást jelez, ami az ütközési energia növelésével meredeken növekszik. Az  $F_3$  érték nagyjából 20%-os fukóz vándorlást indikál, mely az ütközési energia növelésével csak kis mértékben változik. Az antenna-fukoziláció jól jellemezhető a fukozilált antenna lehasadásával keletkező fragmensek segítségével ( $\text{NHSF}^+$ ,  $[\text{M-NHSF}]^{2+}$ ). Ezen csúcsok lehetővé teszik, hogy akár kismértékű antenna-fukozilációt is egyértelműen kimutassunk. Ugyanakkor, a core-fukozilációt elsősorban bizonyos csúcsok hiánya jelzi. Ebből következik, hogy nagymértékű antenna-fukoziláció mellett nehéz a kis mennyiségű core-fukoziláció jelenlétét igazolni. A tisztán antenna-fukozilált AGP-eredetű glikopeptid esetében az  $F_1$ ,  $F_2$  és  $F_3$  értékek 60-80% körüli antenna-fukozilációt mutatnak, mely jól szemlélteti, hogy a fukóz vándorlás mellett, antenna-fukóz esetében a semleges fukóz vesztes már nagyon kis energián is bekövetkezhet, és ez jelentősen zavarja a pontos számszerűsíthető eredményeket. Az antenna-fukoziláció jellemzésére az  $F_1$  értéket javaslom, mivel használatával az antenna-fukóz jelenléte egyértelműen igazolható, valamint a fukóz vándorlás és az interferenciák mértéke a lehetőségekhez mérten kevésbé befolyásolja. Érdeemes megemlíteni, hogy a fukóz pozíciójának meghatározása lehetséges  $2+$  vagy  $4+$  töltésű molekulaionból is. Azonban  $2+$  töltésű molekulaion esetén az oxóniumionok fragmentációjához nagyobb aktiválási energia szükséges, így a fukóz vándorlás és a semleges fukóz vesztes nagyobb mértékű lesz.[93]  $4+$  töltésű molekulaion esetén a többlépéses folyamatok kevesebb energiát igényelnek, így gyakrabban fognak előfordulni. Mindkét hatás növelni fogja az  $F_1$  és  $F_3$  értékeket, így a becsült antenna-

fukoziláció mértékét, ezért a 3+ töltésű molekulaion használata optimális megoldás a fukóz helyzetének meghatározására.

### V.3. Többszörösen fukozilált AGP glikoformok azonosítása

A fukóz szubsztituensek száma a különböző fehérjéken és a különféle glikánokon eltérő lehet. A szakirodalomban egynél több fukózt tartalmazó szerkezetek csak elvétve fordulnak elő. Az AGP egyik genetikai variánsán egy olyan tetraantennás, teljesen szializált cukor-oldalláncot (N6H7S4) azonosítottam, ahol fenn áll a lehetősége a többszörösen fukozilált glikoformok jelenlétének is. Az MS1 mérések során, a többszörösen fukozilált glikoformok teoretikusan számolt tömegénél jól azonosítható csúcsokat detektáltam, így ezekről az ionokról alacsony ütközési energián MS/MS felvételeket készítettem. Az egyszeresen fukozilált glikoform (N6H7S4F1) spektrumában (14/B ábra) a legintenzívebb fragmensionok az  $NHS^+$  és  $NHSF^+$  ionok. Az intenzív  $NHSF^+$  ion jelenléte, és az  $NHS^+$  ionhoz viszonyított 1:3 arány az antenna-fukoziláció közvetlen bizonyítéka. A korábbi energiafüggő fragmentációs vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy az antenna-fukóz lazán kötött, fragmentációra hajlamos, míg a core-fukóz alacsony ütközési energián nem fragmentálódik. Így a semleges fukóz vesztés megléte szintén az antenna-fukozilációt igazolja. A bifukozilált glikoform (N6H7S4F2) esetében az  $NHS^+$  és  $NHSF^+$  ionok ismét az egyik legintenzívebbek a spektrumban (14/C ábra). A két ion közel azonos intenzitása jelzi, hogy antennák fele fukozilált, a másik két antenna pedig nem. Az  $NHSF^+$  ion jelenléte egyértelműen jelzi az antenna-fukozilációt. A core-fukoziláció előfordulására egyetlen fragmens sem utal. Fontos megemlíteni, hogy abban az esetben, ha az egyik fukóz az antennán, a másik a core-on helyezkedne el, az  $NHS^+$  és  $NHSF^+$  ionok aránya a monofukozilált glikoformnál mért értékekhez lenne hasonló. A spektrumban ugyan kis intenzitással, de egyértelműen azonosítható az  $NHSF2^+$  ion. Alacsony ütközési energián csak minimális fukóz vándorlás várható, az  $NHSF2^+$  ion egy olyan szerkezetre utal, ahol a glikánon belül mindkét fukóz szubsztituens egyazon antennán helyezkedik le. Az egyik fukóz a korábbi megfigyelésekkel összhangban a GlcNAc-hoz kapcsolódik, a másik pedig valószínűleg a galaktózhoz. Hasonló szerkezetet írtak le a haptoglobín fehérje *N*-glikozilációs mintázatának vizsgálata során, ahol az egészséges, krónikus pankreatitiszben és pankreasz-tumorban szenvedő betegek mintáit vizsgálták.[133] Az antennán két fukózt

tartalmazó glikoform csak daganatos mintákban fordult elő. A szerkezet nagyfokú hasonlóságot mutat az ABO vércsoport-család Lewis Y-típusú glikánjával ( $\text{Fuca}\alpha 1\text{-}2\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\alpha 1\text{-}3\text{Fuc}$ ), ami a sejtfelszíni fehérjéken található *O*-glikánok gyakori összetevője.[133, 134] A trifukozilált glikoform esetén a legjelentősebb, töltésszeparációs fragmentációs folyamat fragmensionjai mind intenzíven azonosíthatóak a spektrumban (14/D ábra), azonban a glikoform nagyon kis mennyisége miatt jelentősek az interferenciák, így a részletes analízis nem kivitelezhető. A nem-fukozilált N6H7S4 glikoform egy relatíve intenzív komponens a glikoformok között. A nem-fukozilált és a mono-, bi- és trifukozilált glikoformok extrahált ionkromatogramján (13. ábra) jól megfigyelhető, hogy a fukózok számának növekedésével a glikoformok mennyisége meredeken csökken, közel exponenciálisan a fukoziláció mértékével. Ez alapján elmondható, hogy antenna-fukoziláció mértékét, ha csak részben is, de statisztikus faktorok határozzák meg. Az eredmények ismeretében felmerül a lehetőség, hogy a többszörös fukoziláció egy gyakran előforduló jelenség az emberi glikoproteineken, azonban ezen glikoformok azonosítása a kis mennyiség miatt elmarad.



## VI. Következtetések

A glikoproteomikai kutatások és a fehérje eredetű hatóanyagok gyógyszeripari alkalmazásának növekedésével megjelent az igény olyan minőségi paraméterek vizsgálatára, melyekre jelenleg rutinszerűen alkalmazott módszerek nem állnak rendelkezésre. Az egyik ilyen paraméter a fehérjéken található cukor-oldalláncok szerkezetének meghatározása. A cukor-szerkezet egyik építőeleme a fukóz, melynek jelentőségét számos biológiai folyamatban leírták. Az egyik gyakran kért információ a fukóz szubsztituens cukorláncon belüli elhelyezkedésének azonosítása. Azonban a fukóz pozíciójának meghatározására jelenleg nincsen széles körben elfogadott analitikai módszer. Az értekezésben egy olyan technikát mutatok be, ahol alacsony ütközési energián felvett MS/MS spektrumokból a fukóz pozíciója megállapítható és mennyisége kvantifikálható. A gyakori core-fukoziláció mellett már kis mennyiségű antenna-fukóz is jól kimutatható. Továbbá a rutinszerűen, magas ütközési energián felvett spektrumokból is levonhatók kvalitatív következtetések, illetve a különböző minták még magas ütközési energián felvett spektrumok alapján is összehasonlíthatók. A módszer nagy előnye, hogy nem igényel derivatizációt és a hagyományos proteomikai munkafolyamatba könnyen beilleszthető. A módszerfejlesztés során *N*-glikopeptideket vizsgáltam, azonban nincs elméleti akadálya a módszer kiterjesztésének *O*-glikopeptidek analízisére, ez további kutatási terveink közt szerepel. A korábbi szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a fukóz elhelyezkedésének azonosítását megzavarhatja a fukóz vándorlás folyamata. Az értekezésben bemutatom, hogy a fukóz vándorlás ténylegesen jelen van, de az ütközési energia csökkentésével a mértéke jelentősen lecsökken és a gyakorlatban nem jelent problémát. Emellett a semleges fukóz veszteséssel járó szekvenciális folyamatok is megnehezítik az értékelést, azonban az ütközési energia csökkentésével e folyamatok jelentősége is csökken. Alacsony energiájú CID fragmentáció esetén, mikor a molekulaion a legintenzívebb csúcs a spektrumban (pl. a survival yield 50% feletti), a fukóz vándorlás és a többi zavaró folyamat minimálisra csökkenthető. A fragmentációs vizsgálatokhoz a 3+ töltésű glikopeptidek használatát javaslom, mivel ezek spektruma a leginformatívabb és az interferenciák előfordulása is kevésbé valószínű. Fontos kiemelni, hogy a jelen vizsgálatokat egy kvadrupól és repülési idő analizátorral szerelt tömegspektrométeren (Q-TOF) végeztem. Ioncsapda típusú analizátorral rendelkező

készüléken az analizátorban töltött hosszabb tartózkodási idő miatt a fragmentációs mechanizmusok eltérőek lehetnek, a fukóz vándorlás és az interferenciák előfordulásának esélye megnő. A core-fukóz erősen kötődik a core szerkezethez. Ezzel szemben az antenna-fukóz lazán kötött, fragmentációra és vándorlásra hajlamos. Abban az esetben, ha kizárólag csak tisztán core-fukoziláció vagy tisztán antenna-fukoziláció van jelen, a fukóz pozíciója alacsony ütközési energián könnyen meghatározható, a fukóz vándorlás ellenére is. Erre a célra megfelel az  $\text{NHS}^+/\text{NHSF}^+$  vagy az  $[\text{M-NHSF}]^{2+}/[\text{M-NHS}]^{2+}$  ionpárok intenzitásarányának összehasonlítása. A fukóz elhelyezkedésének azonosítása magasabb ütközési energiákon is lehetséges. Ilyen esetben a szekvenciális fragmentációs folyamatokban keletkezett  $[\text{M-NHS-NHSF}]^+/\text{[M-NHS-NHS]}^+$  vagy  $[\text{peptid+NF}]^+/\text{[peptid+N]}^+$  ionpárok arányait célszerű megvizsgálni. Amennyiben a core- és antenna-fukoziláció egyidejű jelenléte is lehetséges, az antenna-fukoziláció mértékének megbecslésére az  $F_1$  értéket javaslom ( $F_1 = [\text{M-NHSF}]^{2+}/([\text{M-NHS}]^{2+} + [\text{M-NHSF}]^{2+})$ ). Fontos megjegyezni azonban, hogy core-fukóz esetén körülbelül 2%, antenna-fukóz esetén nagyjából 14% mértékű interfencia várható a fukóz vándorlás és a többlépéses fragmentációs folyamatok eredményeképp. Analitikai vizsgálatok esetében, amennyiben referencia anyagok rendelkezésre állnak, a mennyiségi meghatározás könnyen elvégezhető az  $F_1$  érték vagy a korábban említett, intenzív diagnosztikus ionok relatív mennyiségének megállapításával. Ha referencia anyagok nem elérhetőek, az  $F_1$  érték vagy az intenzitás arányok változásával lehet nyomon követni a core- és antenna-fukoziláció mértékének változását a különböző minták között. Fontos kiemelni, hogy az alacsony ütközési energiájú CID használata nem csupán a fukóz vándorlás minimalizálása miatt előnyös, az így felvett MS/MS spektrumok rendkívül tiszták, nincs kémiai zaj és a diagnosztikus ionok a spektrum legintenzívebb csúcsai közé tartoznak. Alacsony ütközési energián, a többszörösen fukozilált glikoformok is azonosíthatóak és meghatározható a fukóz szubsztituensek elhelyezkedése. Ezen glikoformokról jelenleg még kevés ismeret áll rendelkezésre, a nagyobb kereső-adatbázisokban még nem szerepelnek. A glikozilációt, és azon belül a fukoziláció mértékét gyakran vizsgálják biomarker kutatás céljából.[110, 135] A többszörösen fukozilált glikoformok azonosítása egy fontos jellemző lehet a fukoziláció folyamatának részletes leírásához és lehetséges a biomarkerként való alkalmazás.

## VII. Összefoglalás

Doktori munkám során az *N*-glikoziláció egy fontos jellemzője, a fukoziláció szerkezeti jellemzésével és glikoformok szerkezetazonosításával foglalkoztam. A fukoziláció jelentőségét sokféle biológiai és élettani folyamatban leírták, jelentősége a biológikumok elterjedésével a gyógyszeriparban is megnövekedett. A fukóz szubsztituens a cukor-oldalláncon belül elhelyezkedhet a fehérjélánchoz közeli core szerkezeti egységen vagy az antennán. A fukóz pozíciójának meghatározására jelenleg nincsenek rutinszerűen alkalmazott technikák.

Munkám során egy olyan módszert dolgoztam ki, mellyel a core- és antenna-fukoziláció egyértelműen elkülöníthető. A módszer fejlesztéséhez modellvegyületként az AGP és a PSA fehérjét használtam, melyek természetes módon az emberi szervezetben is jelentős mennyiségben előfordulnak és biomarkerként való hasznosíthatóságuk intenzív kutatási terület. Kutatócsoportunk a kifejlesztett technikát jelenleg is alkalmazza immunglobulinok és monoklonális antitestek analízise során.

A fukóz helyzetének meghatározásához tandem tömegspektrometriás CID technikával különböző ütközési energiákon vizsgáltam a fragmentációs folyamatokat és diagnosztikus fragmensionokat azonosítottam. Meghatároztam azt az ütközési energiát, mely az adott fukóz-pozíció jellemzésére optimális. A fragmentációs folyamatokat letörési görbék segítségével hasonlítottam össze, és számszerűen jellemeztem. Az így meghatározott paraméterekkel a core- és antenna-fukoziláció jól megkülönböztethető és kvantifikálható. Az analízist nehezíti a fukóz kismértékű vándorlása illetve fragmentációja, de ezt az ütközési energia optimalásával sikerült visszaszorítani, így ez a szerkezetvizsgálat során nem jelentett jelentős problémát. A kifejlesztett módszer alkalmazásával igazoltam az AGP-ben egy ritka, bifukozilált glikoform jelenlétét. A kifejlesztett módszer előnye, hogy nem igényel származékképzést és a proteomikai munkafolyamatba egyszerűen beilleszthető. A glikán struktúrák részletes jellemzése hozzájárul a biológiai eredetű gyógyszerkészítmények minőségellenőrzésének fejlesztéséhez és a biomarker kutatást fontos új eszköze lehet.

## VIII. Summary

During my PhD work I performed structure analysis of various fucosylated *N*-glycoforms. Importance of fucosylation has been described in various biological and physiological processes, and also in the pharmaceutical industry, with respect to biological medicine. The fucose unit may be located in the core or on the antenna of a complex *N*-glycan. However, currently there are no routine techniques for identifying the position of fucose.

During my work I have developed a method for distinguishing core and antenna fucosylation, using special, energy dependent tandem mass spectra. For this study I have used AGP and PSA proteins as model compounds, which are often studied human glycoproteins. The method is currently used in our group to analyse immunoglobulins and monoclonal antibodies.

To determine the position of fucose, I have examined the fragmentation processes of selected glycopeptides using tandem mass spectrometry at various collision energies. I have identified diagnostic fragment ions and the optimal collision energy, which are capable for identification of core and antenna fucosylation. Fragmentation processes were compared using breakdown curves and novel numeric parameters developed for this purpose. These parameters are well suitable to distinguish and quantify core and antenna fucosylation. This method also confirmed presence of a rare bifucosylated glycoform in AGP. A major advantage of this technique, that it does not require derivatization and can be easily incorporated into a proteomic workflow. This improved characterization of glycan structures may also contribute for accurate characterization of biological pharmaceuticals and facilitate biomarker research.

## IX. Irodalomjegyzék

1. Graves PR, Haystead TAJ. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66: 39-63.
2. Chae YK, Gonzalez-Angulo AM. (2014) Implications of functional proteomics in breast cancer. *Oncologist*, 19: 328-335.
3. Consortium IHGS. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431: 931-945.
4. Duan G, Walther D. (2015) The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol*, 11: e1004049-e1004049.
5. Wong CH. (2005) Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *J Org Chem*, 70: 4219-4225.
6. Haynes PA. (1998) Phosphoglycosylation: A new structural class of glycosylation? *Glycobiology*, 8: 1-5.
7. Ihara Y, Inai Y, Ikezaki M, Matsui I-SL, Manabe S, Ito Y. C-Mannosylation: Modification on Tryptophan in Cellular Proteins. In: Taniguchi N, Endo T, Hart GW, Seeberger PH, Wong C-H (szerk.), *Glycoscience: Biology and Medicine*. Springer Japan, Tokyo, 2015: 1091-1099.
8. Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW. (1988) Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, 239: 753-759.
9. Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ. (2001) Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*, 11: 45r-59r.
10. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1473: 4-8.
11. Nilsson IM, von Heijne G. (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 268: 5798-5801.

12. Zielinska DF, Gnad F, Wisniewski JR, Mann M. (2010) Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell*, 141: 897-907.
13. Aebi M. (2013) N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 1833: 2430-2437.
14. Breitling J, Aebi M. (2013) N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a013359.
15. Mohorko E, Glockshuber R, Aebi M. (2011) Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J Inher Metab Dis*, 34: 869-878.
16. Barker MK, Rose DR. (2013) Specificity of Processing alpha-glucosidase I is guided by the substrate conformation: crystallographic and in silico studies. *J Biol Chem*, 288: 13563-13574.
17. Henrissat B, Surolia A, Stanley P. A Genomic View of Glycobiology. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH (szerk.), *Essentials of Glycobiology 3rd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2017: 99-111.
18. Jöud M, Möller M, Olsson ML. (2018) Identification of human glycosyltransferase genes expressed in erythroid cells predicts potential carbohydrate blood group loci. *Sci Rep*, 8: 6040.
19. Stanley P. (2011) Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3: a005199.
20. Haji-Ghassemi O, Gilbert M, Spence J, Schur MJ, Parker MJ, Jenkins ML, Burke JE, van Faassen H, Young NM, Evans SV. (2016) Molecular Basis for Recognition of the Cancer Glycobiomarker, LacdiNAc (GalNAc[ $\beta$ 1->4]GlcNAc), by *Wisteria floribunda* Agglutinin. *J Biol Chem*, 291: 24085-24095.
21. Schachter H, Freeze HH. (2009) Glycosylation diseases: quo vadis? *Biochim Biophys Acta*, 1792: 925-930.
22. Fang M, Shen Z, Huang S, Zhao L, Chen S, Mak TW, Wang X. (2010) The ER UDPase ENTPD5 promotes protein N-glycosylation, the Warburg effect, and proliferation in the PTEN pathway. *Cell*, 143: 711-724.

23. Hennet T, Cabalzar J. (2015) Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycoalyx dysfunction. *Trends Biochem Sci*, 40: 377-384.
24. Plomp R, Ruhaak LR, Uh H-W, Reiding KR, Selman M, Houwing-Duistermaat JJ, Slagboom PE, Beekman M, Wuhler M. (2017) Subclass-specific IgG glycosylation is associated with markers of inflammation and metabolic health. *Sci Rep*, 7: 12325.
25. Seeling M, Bruckner C, Nimmerjahn F. (2017) Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat Rev Rheumatol*, 13: 621-630.
26. Peixoto A, Relvas-Santos M, Azevedo R, Santos LL, Ferreira JA. (2019) Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks. *Front Oncol*, 9: 380.
27. Barkeer S, Chugh S, Batra SK, Ponnusamy MP. (2018) Glycosylation of Cancer Stem Cells: Function in Stemness, Tumorigenesis, and Metastasis. *Neoplasia*, 20: 813-825.
28. Rodrigues JG, Balmaña M, Macedo JA, Poças J, Fernandes Â, de-Freitas-Junior JCM, Pinho SS, Gomes J, Magalhães A, Gomes C, Mereiter S, Reis CA. (2018) Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. *Cell Immunol*, 333: 46-57.
29. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. (2018) Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol*, 333: 65-79.
30. Moreno-Villanueva M, Morath J, Vanhooren V, Elbert T, Kolassa S, Libert C, Bürkle A, Kolassa IT. (2013) N-glycosylation profiling of plasma provides evidence for accelerated physiological aging in post-traumatic stress disorder. *Transl Psychiatry*, 3: e320.
31. Becker DJ, Lowe JB. (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13: 41R-53R.
32. Llop E, Ferrer-Batalle M, Barrabes S, Guerrero PE, Ramirez M, Saldova R, Rudd PM, Aleixandre RN, Comet J, de Llorens R, Peracaula R. (2016) Improvement of Prostate Cancer Diagnosis by Detecting PSA Glycosylation-Specific Changes. *Theranostics*, 6: 1190-1204.

33. Abu Bakar N, Voermans NC, Marquardt T, Thiel C, Janssen MCH, Hansikova H, Crushell E, Sykut-Cegielska J, Bowling F, Mørkrid L, Vissing J, Morava E, van Scherpenzeel M, Lefeber DJ. (2018) Intact transferrin and total plasma glycoprofiling for diagnosis and therapy monitoring in phosphoglucomutase-I deficiency. *Transl Res*, 199: 62-76.
34. Zhang S, Shang S, Li W, Qin X, Liu Y. (2016) Insights on N-glycosylation of human haptoglobin and its association with cancers. *Glycobiology*, 26: 684-692.
35. Imre T, Kremmer T, Héberger K, Molnár-Szöllösi É, Ludányi K, Pócsfalvi G, Malorni A, Drahos L, Vékey K. (2008) Mass spectrometric and linear discriminant analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein in cancer patients and healthy individuals. *J Proteomics*, 71: 186-197.
36. Sarrats A, Saldova R, Pla E, Fort E, Harvey DJ, Struwe WB, de Llorens R, Rudd PM, Peracaula R. (2010) Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Proteomics Clin Appl*, 4: 432-448.
37. Pompach P, Ashline DJ, Brnakova Z, Benicky J, Sanda M, Goldman R. (2014) Protein and Site Specificity of Fucosylation in Liver-Secreted Glycoproteins. *J Proteome Res*, 13: 5561-5569.
38. Doherty M, Theodoratou E, Walsh I, Adamczyk B, Stöckmann H, Agakov F, Timofeeva M, Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Duffy F, McManus CA, Farrington SM, Dunlop MG, Perola M, Lauc G, Campbell H, Rudd PM. (2018) Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. *Sci Rep*, 8: 8655.
39. Leymarie N, Griffin PJ, Jonscher K, Kolarich D, Orlando R, McComb M, Zaia J, Aguilan J, Alley WR, Altmann F, Ball LE, Basumallick L, Bazemore-Walker CR, Behnken H, Blank MA, Brown KJ, Bunz S-C, Cairo CW, Cipollo JF, Daneshfar R, Desaire H, Drake RR, Go EP, Goldman R, Gruber C, Halim A, Hathout Y, Hensbergen PJ, Horn DM, Hurum D, Jabs W, Larson G, Ly M, Mann BF, Marx K, Mechref Y, Meyer B, Möglinger U, Neusüß C, Nilsson J, Novotny MV, Nyalwidhe JO, Packer NH, Pompach P, Reiz B, Resemann A, Rohrer JS, Ruthenbeck A, Sanda M, Schulz JM, Schweiger-Hufnagel U, Sihlbom C, Song E, Staples GO, Suckau D, Tang H, Thaysen-Andersen M, Viner RI, An Y, Valmu L, Wada Y, Watson M, Windwarder M, Whittall R, Wuhrer M, Zhu Y, Zou C. (2013) Interlaboratory study on differential analysis of protein glycosylation by mass



- spectrometry: the ABRF glycoprotein research multi-institutional study 2012. *Mol Cell Proteomics*, 12: 2935-2951.
40. Nagel T, Klaus F, Ibanez IG, Wege H, Lohse A, Meyer B. (2018) Fast and facile analysis of glycosylation and phosphorylation of fibrinogen from human plasma—correlation with liver cancer and liver cirrhosis. *Anal Bioanal Chem*, 410: 7965-7977.
  41. Brown KJ, Vanderver A, Hoffman EP, Schiffmann R, Hathout Y. (2012) Characterization of Transferrin Glycopeptide Structures in Human Cerebrospinal Fluid. *Int J Mass Spectrom*, 312: 97-106.
  42. Jia L, Zhang J, Ma T, Guo Y, Yu Y, Cui J. (2018) The Function of Fucosylation in Progression of Lung Cancer. *Front Oncol*, 8: 565.
  43. Miyoshi E, Moriwaki K, Terao N, Tan CC, Terao M, Nakagawa T, Matsumoto H, Shinzaki S, Kamada Y. (2012) Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. *Biomolecules*, 2: 34-45.
  44. Ahn JM, Sung HJ, Yoon YH, Kim BG, Yang WS, Lee C, Park HM, Kim BJ, Kim BG, Lee SY, An HJ, Cho JY. (2014) Integrated glycoproteomics demonstrates fucosylated serum paraoxonase 1 alterations in small cell lung cancer. *Mol Cell Proteomics*, 13: 30-48.
  45. Olejnik B, Kratz EM, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. (2015) Glycoprotein fucosylation is increased in seminal plasma of subfertile men. *Asian J Androl*, 17: 274-280.
  46. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnar-Szollosi E, Kremmer T, Malorni A, Vekey K. (2005) Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 40: 1472-1483.
  47. Toth E, Vekey K, Ozohanics O, Jeko A, Dominczyk I, Widlak P, Drahos L. (2016) Changes of protein glycosylation in the course of radiotherapy. *J Pharm Biomed Anal*, 118: 380-386.
  48. Turiak L, Sugar S, Acs A, Toth G, Gomory A, Telekes A, Vekey K, Drahos L. (2019) Site-specific N-glycosylation of HeLa cell glycoproteins. *Sci Rep*, 9: 14822.

49. Schneider M, Al-Shareffi E, Haltiwanger RS. (2017) Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology*, 27: 601-618.
50. Reusch D, Tejada ML. (2015) Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology*, 25: 1325-1334.
51. Zhang P, Woen S, Wang T, Liao B, Zhao S, Chen C, Yang Y, Song Z, Wormald MR, Yu C, Rudd PM. (2016) Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov Today*, 21: 740-765.
52. Sakae Y, Satoh T, Yagi H, Yanaka S, Yamaguchi T, Isoda Y, Iida S, Okamoto Y, Kato K. (2017) Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fc $\gamma$  receptor IIIa. *Sci Rep*, 7: 13780.
53. Bruggeman CW, Dekkers G, Bentlage AEH, Treffers LW, Nagelkerke SQ, Lissenberg-Thunnissen S, Koeleman CAM, Wuhrer M, van den Berg TK, Rispen T, Vidarsson G, Kuijpers TW. (2017) Enhanced Effector Functions Due to Antibody Defucosylation Depend on the Effector Cell Fc $\gamma$  Receptor Profile. *J Immunol*, 199: 204-211.
54. Tobinai K, Klein C, Oya N, Fingerle-Rowson G. (2017) A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. *Adv Ther*, 34: 324-356.
55. Broccoli A, Argnani L, Zinzani PL. (2017) Peripheral T-cell lymphomas: Focusing on novel agents in relapsed and refractory disease. *Cancer Treat Rev*, 60: 120-129.
56. Takahashi S, Sugiyama T, Shimomura M, Kamada Y, Fujita K, Nonomura N, Miyoshi E, Nakano M. (2016) Site-specific and linkage analyses of fucosylated N-glycans on haptoglobin in sera of patients with various types of cancer: possible implication for the differential diagnosis of cancer. *Glycoconj J*, 33: 471-482.
57. Holst S, Wuhrer M, Rombouts Y. (2015) Glycosylation characteristics of colorectal cancer. *Adv Cancer Res*, 126: 203-256.
58. Green C. (1989) The ABO, Lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. *FEMS Microbiol Immunol*, 1: 321-330.

59. Dimitroff CJ. (2019) I-branched carbohydrates as emerging effectors of malignant progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 13729-13737.
60. Taylor ME, Drickamer K. (2019) Mammalian sugar-binding receptors: known functions and unexplored roles. *FEBS J*, 286: 1800-1814.
61. Liang J-X, Liang Y, Gao W. (2016) Clinicopathological and prognostic significance of sialyl Lewis X overexpression in patients with cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*, 9: 3113-3125.
62. Mondal N, Dykstra B, Lee J, Ashline DJ, Reinhold VN, Rossi DJ, Sackstein R. (2018) Distinct human  $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferases drive Lewis-X/sialyl Lewis-X assembly in human cells. *J Biol Chem*, 293: 7300-7314.
63. Li J, Hsu HC, Mountz JD, Allen JG. (2018) Unmasking Fucosylation: from Cell Adhesion to Immune System Regulation and Diseases. *Cell Chem Biol*, 25: 499-512.
64. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, Shigeta M, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N. (2007) Carbohydrate Binding Specificity of a Fucose-specific Lectin from *Aspergillus oryzae*: a novel probe for core fucose. *J Biol Chem*, 282: 15700-15708.
65. Norton P, Comunale MA, Herrera H, Wang M, Houser J, Wimmerova M, Romano PR, Mehta A. (2016) Development and application of a novel recombinant *Aleuria aurantia* lectin with enhanced core fucose binding for identification of glycoprotein biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 16: 3126-3136.
66. Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J. (2009) Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology*, 19: 527-536.
67. Yamashita F, Tanaka M, Satomura S, Tanikawa K. (1996) Prognostic significance of *Lens culinaris* agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*, 111: 996-1001.
68. Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kitabatake S, Kuzuya T, Nonogaki K, Shimizu J, Yamaguchi A, Isogai M, Kaneoka Y, Washizu J, Satomura S. (2005) Relationship between *Lens culinaris*

- agglutinin-reactive  $\alpha$ -fetoprotein and pathologic features of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 25: 848-853.
69. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tanaka J, Kagebayashi C, Satomura S. (2014) High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 49: 555-563.
  70. Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, Miyoshi E, Hirabayashi J, Kawagishi H. (2012) A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J Biol Chem*, 287: 33973-33982.
  71. Yamasaki K, Yamasaki T, Tateno H. (2018) The trimeric solution structure and fucose-binding mechanism of the core fucosylation-specific lectin PhoSL. *Sci Rep*, 8: 7740.
  72. O'Flaherty R, Harbison AM, Hanley PJ, Taron CH, Fadda E, Rudd PM. (2017) Aminoquinoline Fluorescent Labels Obstruct Efficient Removal of N-Glycan Core  $\alpha$ (1-6) Fucose by Bovine Kidney  $\alpha$ -L-Fucosidase (BKF). *J Proteome Res*, 16: 4237-4243.
  73. Vainauskas S, Kirk CH, Petralia L, Guthrie EP, McLeod E, Bielik A, Luebbbers A, Foster JM, Hokke CH, Rudd PM, Shi X, Taron CH. (2018) A novel broad specificity fucosidase capable of core  $\alpha$ 1-6 fucose release from N-glycans labeled with urea-linked fluorescent dyes. *Sci Rep*, 8: 9504.
  74. Scudder P, Neville DC, Butters TD, Fleet GW, Dwek RA, Rademacher TW, Jacob GS. (1990) The isolation by ligand affinity chromatography of a novel form of alpha-L-fucosidase from almond. *J Biol Chem*, 265: 16472-16477.
  75. Collin M, Olsén A. (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J*, 20: 3046-3055.
  76. Gaunitz S, Nagy G, Pohl NLB, Novotny MV. (2017) Recent Advances in the Analysis of Complex Glycoproteins. *Anal Chem*, 89: 389-413.
  77. Wührer M, Koeleman CA, Hokke CH, Deelder AM. (2006) Mass spectrometry of proton adducts of fucosylated N-glycans: fucose transfer between antennae gives rise to misleading fragments. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20: 1747-1754.

78. Zhou S, Wooding KM, Mechref Y. Analysis of Permethylated Glycan by Liquid Chromatography (LC) and Mass Spectrometry (MS). In: Lauc G, Wuhrer M (szerk.), High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols. Springer New York, New York, 2017: 83-96.
79. Lettow M, Mucha E, Manz C, Thomas DA, Marianski M, Meijer G, von Helden G, Pagel K. (2019) The role of the mobile proton in fucose migration. *Anal Bioanal Chem*, 411: 4637-4645.
80. Klapoetke S, Zhang J, Becht S, Gu X, Ding X. (2010) 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: 315-324.
81. Nwosu C, Yau HK, Becht S. (2015) Assignment of Core versus Antenna Fucosylation Types in Protein N-Glycosylation via Procainamide Labeling and Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 87: 5905-5913.
82. Saveliev S, Bratz M, Zubarev R, Szapacs M, Budamgunta H, Urh M. (2013) Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spectrometry analysis. *Nat Methods*, 10: 1134.
83. Heissel S, Frederiksen SJ, Bunkenborg J, Højrup P. (2019) Enhanced trypsin on a budget: Stabilization, purification and high-temperature application of inexpensive commercial trypsin for proteomics applications. *PLoS One*, 14: e0218374.
84. Zhu Z, Desaire H. (2015) Carbohydrates on Proteins: Site-Specific Glycosylation Analysis by Mass Spectrometry. *Annu Rev Anal Chem*, 8: 463-483.
85. Desaire H. (2013) Glycopeptide analysis, recent developments and applications. *Mol Cell Proteomics*, 12: 893-901.
86. Zhou S, Dong X, Veillon L, Huang Y, Mechref Y. (2017) LC-MS/MS analysis of permethylated N-glycans facilitating isomeric characterization. *Anal Bioanal Chem*, 409: 453-466.
87. Karpievitch YV, Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. (2010) Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat*, 4: 1797-1823.

88. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Pasa-Tolic L. (2014) High-throughput proteomics. *Annu Rev Anal Chem*, 7: 427-454.
89. Schaffer LV, Millikin RJ, Miller RM, Anderson LC, Fellers RT, Ge Y, Kelleher NL, LeDuc RD, Liu X, Payne SH, Sun L, Thomas PM, Tucholski T, Wang Z, Wu S, Wu Z, Yu D, Shortreed MR, Smith LM. (2019) Identification and Quantification of Proteoforms by Mass Spectrometry. *Proteomics*, 19: e1800361.
90. Kozlik P, Goldman R, Sanda M. (2017) Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *Electrophoresis*, 38: 2193-2199.
91. Yang Y, Franc V, Heck AJR. (2017) Glycoproteomics: A Balance between High-Throughput and In-Depth Analysis. *Trends Biotechnol*, 35: 598-609.
92. Johnson AR, Carlson EE. (2015) Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Natural Product Structure Elucidation. *Anal Chem*, 87: 10668-10678.
93. Vékey K, Ozohanics O, Tóth E, Jekő A, Révész Á, Krenyácz J, Drahos L. (2013) Fragmentation characteristics of glycopeptides. *Int J Mass Spectrom*, 345-347: 71-79.
94. Dong Q, Yan X, Liang Y, Stein SE. (2016) In-Depth Characterization and Spectral Library Building of Glycopeptides in the Tryptic Digest of a Monoclonal Antibody Using 1D and 2D LC-MS/MS. *J Proteome Res*, 15: 1472-1486.
95. Hinneburg H, Stavenhagen K, Schweiger-Hufnagel U, Pengelley S, Jabs W, Seeberger PH, Silva DV, Wührer M, Kolarich D. (2016) The Art of Destruction: Optimizing Collision Energies in Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF) Instruments for Glycopeptide-Based Glycoproteomics. *J Am Soc Mass Spectrom*, 27: 507-519.
96. Domon B, Costello CE. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj J*, 5: 397-409.
97. Ozohanics O, Turiak L, Puerta A, Vekey K, Drahos L. (2012) High-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry methodology for analyzing site-specific N-glycosylation patterns. *J Chromatogr A*, 1259: 200-212.

98. Pett C, Nasir W, Sihlbom C, Olsson B-M, Caixeta V, Schorlemer M, Zahedi RP, Larson G, Nilsson J, Westerlind U. (2018) Effective Assignment of  $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-Sialic Acid Isomers by LC-MS/MS-Based Glycoproteomics. *Angew Chem Int Ed*, 57: 9320-9324.
99. Tajiri M, Kadoya M, Wada Y. (2009) Dissociation Profile of Protonated Fucosyl Glycopeptides and Quantitation of Fucosylation Levels of Glycoproteins by Mass Spectrometry. *J Proteome Res*, 8: 688-693.
100. Jonsson M, Linse S, Frohm B, Lundwall A, Malm J. (2005) Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochem J*, 387: 447-453.
101. Rao AR, Motiwala HG, Karim OMA. (2008) The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int*, 101: 5-10.
102. Kasler M, Otto S, Kenessey I. (2017) The current situation of cancer morbidity and mortality in the light of the National Cancer Registry. *Orv Hetil*, 158: 84-89.
103. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. (2018) The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8: a030361.
104. Gretzer MB, Partin AW. (2002) PSA Levels and the Probability of Prostate Cancer on Biopsy. *Eur Urol Suppl*, 1: 21-27.
105. Song E, Mayampurath A, Yu CY, Tang HX, Mechref Y. (2014) Glycoproteomics: Identifying the Glycosylation of Prostate Specific Antigen at Normal and High Isoelectric Points by LC-MS/MS. *J Proteome Res*, 13: 5570-5580.
106. Behnken HN, Ruthenbeck A, Schulz JM, Meyer B. (2014) Glycan Analysis of Prostate Specific Antigen (PSA) Directly from the Intact Glycoprotein by HR-ESI/TOF-MS. *J Proteome Res*, 13: 997-1001.
107. Li QK, Chen L, Ao MH, Chiu JH, Zhang Z, Zhang H, Chan DW. (2015) Serum fucosylated prostate-specific antigen (PSA) improves the differentiation of aggressive from non-aggressive prostate cancers. *Theranostics*, 5: 267-276.
108. Lang R, Rolny V, Leinenbach A, Karl J, Swiatek-de Lange M, Kobold U, Schrader M, Krause H, Mueller M, Vogeser M. (2019) Investigation on core-fucosylated prostate-specific antigen as a refined biomarker for differentiation of benign prostate hyperplasia and prostate cancer of different aggressiveness. *Tumor Biol*, 41: 1010428319827223.

109. Wang C, Höti N, Lih T-SM, Sokoll LJ, Zhang R, Zhang Z, Zhang H, Chan DW. (2019) Development of a glycoproteomic strategy to detect more aggressive prostate cancer using lectin-immunoassays for serum fucosylated PSA. *Clin Proteomics*, 16: 13.
110. Fujita K, Hayashi T, Matsuzaki K, Nakata W, Masuda M, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, Tsuchiya M, Kobayashi Y, Nojima S, Uemura M, Morii E, Miyoshi E, Nonomura N. (2016) Decreased fucosylated PSA as a urinary marker for high Gleason score prostate cancer. *Oncotarget*, 7: 56643-56649.
111. Vermassen T, Van Praet C, Vanderschaeghe D, Maenhout T, Lumen N, Callewaert N, Hoebeke P, Van Belle S, Rottey S, Delanghe J. (2014) Capillary electrophoresis of urinary prostate glycoproteins assists in the diagnosis of prostate cancer. *Electrophoresis*, 35: 1017-1024.
112. Tajiri M, Ohyama C, Wada Y. (2007) Oligosaccharide Profiles of the Prostate Specific Antigen in Free and Complexed Forms from the Prostate Cancer Patient Serum and in Seminal Plasma: a Glycopeptide Approach. *Glycobiology*, 18: 2-8.
113. Yoneyama T, Ohyama C, Hatakeyama S, Narita S, Habuchi T, Koie T, Mori K, Hidari KIPJ, Yamaguchi M, Suzuki T, Tobisawa Y. (2014) Measurement of aberrant glycosylation of prostate specific antigen can improve specificity in early detection of prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 448: 390-396.
114. Pihikova D, Kasak P, Kubanikova P, Sokol R, Tkac J. (2016) Aberrant sialylation of a prostate-specific antigen: Electrochemical label-free glycoprofiling in prostate cancer serum samples. *Anal Chim Acta*, 934: 72-79.
115. Ishikawa T, Yoneyama T, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Kurosawa T, Nakamura K, Narita S, Mitsuzuka K, Duivenvoorden W, Pinthus JH, Hashimoto Y, Koie T, Habuchi T, Arai Y, Ohyama C. (2017) An Automated Micro-Total Immunoassay System for Measuring Cancer-Associated alpha2,3-linked Sialyl N-Glycan-Carrying Prostate-Specific Antigen May Improve the Accuracy of Prostate Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*, 18: 470.
116. Kaya T, Kaneko T, Kojima S, Nakamura Y, Ide Y, Ishida K, Suda Y, Yamashita K. (2015) High-Sensitivity Immunoassay with Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy Using a Plastic Sensor Chip: Application to Quantitative Analysis of Total Prostate-Specific Antigen and GalNAc $\beta$ 1-



- 4GlcNAc-Linked Prostate-Specific Antigen for Prostate Cancer Diagnosis. *Anal Chem*, 87: 1797-1803.
117. Haga Y, Uemura M, Baba S, Inamura K, Takeuchi K, Nonomura N, Ueda K. (2019) Identification of Multisialylated LacdiNAc Structures as Highly Prostate Cancer Specific Glycan Signatures on PSA. *Anal Chem*, 91: 2247-2254.
  118. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1482: 157-171.
  119. Luo Z, Lei H, Sun Y, Liu X, Su DF. (2015) Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. *J Physiol Biochem*, 71: 329-340.
  120. Hocheptied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. (2003)  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 25-34.
  121. Tu C, Rudnick PA, Martinez MY, Cheek KL, Stein SE, Slebos RJC, Liebler DC. (2010) Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J Proteome Res*, 9: 4982-4991.
  122. Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, Holdt LM, Teupser D, Mann M. (2016) Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Syst*, 2: 185-195.
  123. Xiao K, Su L, Yan P, Han B, Li J, Wang H, Jia Y, Li X, Xie L. (2015) alpha-1-Acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis. *J Crit Care*, 30: 744-751.
  124. Singh-Manoux A, Shipley MJ, Bell JA, Canonico M, Elbaz A, Kivimaki M. (2017) Association between inflammatory biomarkers and all-cause, cardiovascular and cancer-related mortality. *CMAJ*, 189: E384-E390.
  125. Åström E, Stål P, Zenlander R, Edenvik P, Alexandersson C, Haglund M, Rydén I, Pålsson P. (2017) Reverse lectin ELISA for detecting fucosylated forms of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein associated with hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 12: e0173897.
  126. Balmaña M, Giménez E, Puerta A, Llop E, Figueras J, Fort E, Sanz-Nebot V, de Bolós C, Rizzi A, Barrabés S, de Frutos M, Peracaula R. (2016) Increased  $\alpha$ 1-3 fucosylation of  $\alpha$ -1-acid glycoprotein (AGP) in pancreatic cancer. *J Proteomics*, 132: 144-154.

127. Yazawa S, Takahashi R, Yokobori T, Sano R, Mogi A, Saniabadi AR, Kuwano H, Asao T. (2016) Fucosylated Glycans in  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein for Monitoring Treatment Outcomes and Prognosis of Cancer Patients. *PLoS One*, 11: e0156277.
128. Turiak L, Ozohanics O, Marino F, Drahos L, Vekey K. (2011) Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *J Proteomics*, 74: 942-947.
129. Kolli V, Dodds ED. (2014) Energy-resolved collision-induced dissociation pathways of model N-linked glycopeptides: implications for capturing glycan connectivity and peptide sequence in a single experiment. *Analyst*, 139: 2144-2153.
130. Collette C, Drahos L, Pauw ED, Vékey K. (1998) Comparison of the internal energy distributions of ions produced by different electrospray sources. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 12: 1673-1678.
131. Nakano M, Kakehi K, Tsai M-H, Lee YC. (2004) Detailed structural features of glycan chains derived from  $\alpha$ 1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology*, 14: 431-441.
132. Yang H, Yang C. (2018) Characterization of glycopeptides using a stepped higher-energy C-trap dissociation approach on a hybrid quadrupole orbitrap. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 32: 1353-1362.
133. Nakano M, Nakagawa T, Ito T, Kitada T, Hijioka T, Kasahara A, Tajiri M, Wada Y, Taniguchi N, Miyoshi E. (2008) Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: a novel approach for the development of tumor markers. *Int J Cancer*, 122: 2301-2309.
134. Gebrehiwot AG, Melka DS, Kassaye YM, Rehan IF, Rangappa S, Hinou H, Kamiyama T, Nishimura S-I. (2018) Healthy human serum N-glycan profiling reveals the influence of ethnic variation on the identified cancer-relevant glycan biomarkers. *PLoS One*, 13: e0209515.
135. Fabrizio C, Vanessa P. (2007) The Acute Phase Protein  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein: A Model for Altered Glycosylation During Diseases. *Curr Protein Pept Sci*, 8: 91-108.

## **X. Saját publikációk jegyzéke**

### **X.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények**

1. Ács A, Ozohanics O, Vékey K, Drahos L, Turiák L. (2018) Distinguishing Core and Antenna Fucosylated Glycopeptides Based on Low-Energy Tandem Mass Spectra. *Anal Chem*, 90: 12776-12782.

IF: 6,350

2. Ács A, Turiák L, Révész Á, Vékey K, Drahos L. (2019) Identification of bifucosylated glycoforms using low-energy CID spectra. *J. Mass Spectrom.*

IF: 2,267

## X.2. Egyéb közlemények

1. Turiak L, Toth G, Ozohanics O, Revesz A, Acs A, Vekey K, Zaia J, Drahos L. (2018) Sensitive method for glycosaminoglycan analysis of tissue sections. *J Chromatogr A*, 1544: 41-48.

IF: 3,858

2. Gogl G, Biri-Kovacs B, Poti AL, Vadaszi H, Szeder B, Bodor A, Schlosser G, Acs A, Turiak L, Buday L, Alexa A, Nyitray L, Remenyi A. (2018) Dynamic control of RSK complexes by phosphoswitch-based regulation. *Febs J*, 285: 46-71.

IF: 4,739

3. Kovacs AF, Lang O, Turiak L, Acs A, Kohidai L, Fekete N, Alasztics B, Meszaros T, Buzas EI, Rigo J, Jr., Pallinger E. (2018) The impact of circulating preeclampsia-associated extracellular vesicles on the migratory activity and phenotype of THP-1 monocytic cells. *Sci Rep*, 8: 5426.

IF: 4,011

4. Turiak L, Ozohanics O, Toth G, Acs A, Revesz A, Vekey K, Telekes A, Drahos L. (2019) High sensitivity proteomics of prostate cancer tissue microarrays to discriminate between healthy and cancerous tissue. *J Proteomics*, 197: 82-91.

IF: 3,537

5. Kovács ÁF, Fekete N, Turiák L, Ács A, Kőhidai L, Buzás EI, Pállinger É. (2019) Unravelling the Role of Trophoblastic-Derived Extracellular Vesicles in Regulatory T Cell Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 3457.

IF: 4,183

6. Turiak L, Sugar S, Acs A, Toth G, Gomory A, Telekes A, Vekey K, Drahos L. (2019) Site-specific N-glycosylation of HeLa cell glycoproteins. *Sci Rep*, 9: 14822.

IF: 4,011

7. Müller A, Langó T, Turiák L, Ács A, Várady G, Kucsma N, Drahos L, Tusnády GE. (2019) Covalently modified carboxyl side chains on cell surface leads to a novel method toward topology analysis of transmembrane proteins. *Sci Rep*, 9: 15729.

IF: 4,011

## **XI. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Vékey Károlynak és Prof. Telekes Andrásnak, hogy a képzés alatt mindvégig mellettem álltak, mindenben segítettek és a magánéletben barátokká válhattunk.

Szeretném megköszönni Turiák Lillának, hogy egyengette utamat és mindenben számíthatok rá.

Szeretném megköszönni korábbi és jelenlegi kollégáimnak, név szerint Ozohanics Olivér, Drahos László, Révész Ágnes, Tóth Eszter, Gömöry Ágnes, Újszászi Kálmán, Bazsó Fanni, Gulyássy Péter, Jekő Anita, Borsos Katalin, Tóth Gábor, Sugár Simon, Szabó Dániel, Milley Márton, Bugyi Fanni a rengeteg szakmai segítséget, a remek hangulatot a laboratóriumban és az együtt töltött időt.

Szeretném megköszönni együttműködő partnereimnek, különösen Prof. Sármay Gabriellának, Auer Feliciának, Szarka Eszternek, Langó Tamásnak és Müller Annának az izgalmas projekteket.

Köszönöm családomnak és barátnőmnek, hogy kitartottak mellettem és mindvégig bátorítottak.