

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “VICTOR BABEȘ” DIN  
TIMIȘOARA**

**MEDICINĂ GENERALĂ**

**Departamentul de Biochimie și Farmacologie**

**ȘCHIOPU C. CRISTIAN CĂTĂLIN**



**REZUMAT**

**al tezei de doctorat cu titlul**

**METODE GLICOMICE MODERNE DE DEPISTARE ȘI ANALIZĂ  
A POTENȚIALILOR BIOMARKERI TUMORALI CEREBRALI  
PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ**

**Conducător Științific:  
PROF. UNIV. DR. ȘIȘU EUGEN**

**Timișoara, 2017**

## – CUPRINS –

<b>INTRODUCERE</b>	XVI
<b>PARTEA GENERALĂ</b>	1
1. ASPECTE BIOMEDICALE ÎN PATOLOGIA TUMORALĂ	1
2. ASPECTE BIOCHIMICE ÎN PATOLOGIA TUMORALĂ	12
2.1. Spectrometria de masă	12
2.2. Lipide	13
2.3. Ganglioze	14
2.4. Proteine	36
<b>PARTEA SPECIFICĂ</b>	37
3. MATERIALE ȘI METODE	37
3.1. Reactivi și materiale de laborator	37
3.2. Selectarea și descrierea materialului de lucru. Analiza amestecurilor complexe de ganglioze extrase din țesut cerebral	38
3.3. Platforme analitice utilizate	39
3.4. Platforme informatice	45
4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	47
4.1. Studiul profilului ganglioze al hemangiomului cerebral comparativ cu țesutul cerebral sănătos, din punct de vedere structural, prin Chip nanoESI HCT MS	47
4.2. Studiul profilului ganglioze al meningiomului cerebral din punct de vedere structural, prin Chip nanoESI QTOF MS	61
4.3. Studiul profilului ganglioze al metastazei cerebrale a adenocarcinomului pulmonar, comparativ cu țesutul cerebral sănătos, din punct de vedere structural prin chip nanoESI QTOFMS	75
4.4. Software original gangliobase de identificare a ganagliozelor obținute prin screening-ul MS	96
4.5. Studiu pilot pentru testarea fezabilității metodelor de spectrometrie de masă dezvoltate pentru studiul interacțiunilor funcționale proteine - glicoconjugați	101
5. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	114
BIBLIOGRAFIE	119
ANEXE	137

**Cuvinte cheie:** tumori, spectrometrie de masă, ganglioze, biomarkeri, complecși necovalenți

## INTRODUCERE

În ultimii 15 ani, progresele tehnologice majore au permis continuarea adâncirii cunoștințelor la nivel molecular al matricilor vegetale și animale prin folosirea metodelor de analiză rapide, eficiente și ieftine.

Teza de doctorat de față este structurată în două capitole principale – Parte generală respectă proporția de 1/3 din teză și respectiv, Parte Specială – 2/3 pentru cea corespunzătoare cercetărilor personale. Cea de-a doua parte, „Partea Specifică”, include rezultatele originale ale cercetării în domeniul studiat, prezentate în cadrul a 5 studii experimentale.

**Noutatea și importanța acestui studiu** constă în primul rând în faptul că se înscrie în trendul general al caracterizării majorității constituenților, adică "om-ul" unui element dat (celulă, țesut, organ) ca de exemplu genele, a căror cercetare intensivă a condus la cartarea completă a genomului uman. În al doilea rând, mărimea seturilor de date experimentale a implicat utilizarea pe scară largă a programelor expert la interfața masină-utilizator, la timpi și viteze de procesare neînchipuite în precedentele decade. În al treilea rând, metodele "omics" (cu a noastră modestă contribuție în glicomică și lipidomică) devin din ce în ce mai targetate, conducând la direcții de cercetare independente ce se dezvoltă rapid precum genomul, transcriptomul, proteomul și metabolomul. Cu toate acestea, suntem încă departe de a înțelege pe deplin mecanismele de funcționalitate interdependente ale subpopulațiilor tumorale.

Studiul în amănunt al componentelor membranare cum sunt glicosfingolipidele pot oferi detalii importante despre patologia tumorală. Detectarea unor noi tipuri de markeri tumorali joacă un rol important în diagnosticul clinic precoce, dar și în evaluarea tratamentului pentru pacienții cu anumite patologii tumorale.

Glicosfingolipidele sialilate sau **ganglioizidele** sunt în mod special abundente în creier, unde se regăsesc în substanța cenușie de aproximativ 5 ori mai des decât în substanța albă. Ganglioizidele prezintă o diversitate și o complexitate structurală foarte mare, astfel, sunt necesare tehnici ultraperformante capabile să le identifice, să le izoleze și să le descifreze compoziția structurală. Una dintre cele mai fiabile tehnici, disponibilă astăzi pentru a îndeplini acest scop, este **spectrometria de masă (MS)**. Capacitatea MS de a efectua bioanalize structurale de mare sensibilitate a crescut considerabil după dezvoltarea tehnicii de ionizare prin electrospray care permite detectarea și identificarea biopolimerilor de la produși metabolici cu structuri mici până la glicani, lipide, acizi nucleici, peptide și proteine cu mase moleculare mari și/sau oricare dintre interacțiunile lor funcționale.

**Importanța și actualitatea temei** de cercetare este desprinsă din conceptul modern și inovativ al studiului în ansamblul său, dar și de metodele ultraperformante cu ajutorul cărora s-au efectuat analizele.

Dezvoltarea și rafinarea continuă a tehnicilor ESI MS, a culminat cu construirea de dispozitive de măsurare miniaturizate și automatizate pentru măsurători în regim high-throughput, bazate pe realizările nanotehnologiei în chipuri și robotică.

În combinație cu spectrometre de masă de înaltă rezoluție sau instrumente capabile de a efectua fragmentarea succesivă, în stagii multiple, chip-electrospray a demonstrat capacitatea sa unică de a oferi o caracterizare structurală a speciilor de ganglioizide minore în amestecuri complexe, care s-au dovedit a reprezenta posibili biomarkeri valoroși.

Platformele miniaturizate, integrate care funcționează pe conceptul "lab-on-a-chip" sau sisteme de analiză micro-totale au fost introduse în spectrometria de masă ca tehnologii pentru sursa de ioni ESI. Având la dispoziție astfel de sisteme pentru livrarea și ionizarea robotizată a probei bazată pe chip, poate fi atinsă o creștere fără precedent a sensibilității, fiabilității și eficienței analizei, cu reducerea la minimum a volumului de probă și a manipulării.

**Motivația acestui studiu** a avut la bază ideea dezvoltării unei metode performante bazată pe MS pentru studiul gangliozidelor din diverse tumori cerebrale și de a găsi, izola și caracteriza unele structuri cu rol de biomarker specific pentru fiecare tip de tumoră în parte. Atât la nivel internațional cât și, mai ales la nivel național studiile de glicomică bazată pe chip electrospray MS sunt încă în fază incipientă, iar cele asupra gangliozidelor din tumori cerebrale umane care fac obiectivul acestei teze și se înscriu în glicolipidomică, se număra printre primele din lume. Din 2006 până în prezent, o parte din studiile demarate de acest grup s-au focusat pe studiul gangliozidelor [3-16], pentru determinarea expresiei și structurii gangliozidelor din diferite regiuni ale creierului normal și tumoral, de diferite vârste. Pe de altă parte, ca urmare a generării de către chip-MS a unui set mare de date și având în vedere complexitatea probei, procesarea informației relevante a devenit condiție obligatorie și indispensabilă pentru a îmbunătăți fiabilitatea rezultatului interpretării și de a face tehnologia mai rapidă și ușor de utilizat.

Plecând de la aceste premize **obiectivul general** al prezenței tezei de doctorat este funcționalizarea și optimizarea tehnicilor ultramoderne bazate pe spectrometrie de masă de înaltă rezoluție asociate cu metode de infuzie robotică, pentru detectarea și cartografierea unor structuri gangliozidice complexe de tip biomarker în diferite tumori cerebrale. De aici, **obiectivele** se ramifică și se etapează căpătând un **contur științific** pentru fiecare activitate în parte. Astfel în această teză sunt incluse 3 studii care au avut ca scop cartarea gangliozidelor în tumori cerebrale în comparație cu țesut cerebral sănătos, un studiu privind interacțiunile necovalente proteo-zaharidice și un studiu informatic ce are ca produs finit programul unic și original denumit GanglioBase.

## **OBIECTIVE**

**Primul studiu** are ca obiective următoarele:

- ✓ Angrenarea platformei analitice bazată pe spectrometrie de masă cu capcană ionică de mare capacitate și ionizare prin electropulverizare (chip-nanoESI HCT MS) și optimizarea acesteia în scopul elucidării expresiei gangliozidelor într-o tumoră cerebrală benignă și anume **hemangiom** versus țesut cerebral sănătos;
- ✓ Analiza gangliozidelor extrase din hemangiom comparativ cu țesutul sănătos;
- ✓ Analiza statistică a datelor obținute prin intermediul platformei unice GanglioBase;
- ✓ Interpretarea rezultatelor în corelație cu studiile științifice de literatură;
- ✓ Publicarea rezultatelor într-o revistă prestigioasă din domeniu.

**Al doi-lea studiu** fixează următoarele obiective:

- ✓ Implicarea și optimizarea, de această dată, a unei alte platforme analitice bazată chip-nanoESI QTOF MS în scopul elucidării expresiei gangliozidelor într-o tumoră cerebrală benignă și anume **meningiom**;

- ✓ Dezvoltarea și optimizarea platformei analitice bazată pe MS pentru studiul gangliozidelor din meningiom;
- ✓ Analiza gangliozidelor extase din meningiom;
- ✓ Investigarea detaliată a compoziției gangliozidelor, urmată de analiza de fragmentare a speciilor individuale regăsite în meningiom utilizând o metodă avansată de spectrometrie de masă bazată pe nanoESIchip QTOF MS și CID MS/MS;
- ✓ Analiza statistică a datelor obținute prin intermediul platformei Gangliobase și interpretarea rezultatelor obținute;
- ✓ Publicarea rezultatelor într-o revistă prestigioasă din domeniu.

**Al trei-lea studiu** își propune următoarele obiective:

- ✓ Funcționalizarea platformei chip-nanoESI QTOF MS în vederea analizei compoziționale și structurale a expresiei gangliozidelor în **metastaza cerebrală a adenocarcinomului pulmonar** (metaADK) versus țesut cerebral sănătos;
- ✓ Cartografierea gangliozidelor extase din metaADK comparativ cu țesut sănătos;
- ✓ Analiza statistică a datelor obținute și interpretarea rezultatelor;
- ✓ Publicarea rezultatelor într-o revistă prestigioasă din domeniu.

**Al patru-lea studiu**, care s-a focusat pe **interacțiunile necovalente** proteo-zaharidice și care trasează următoarele obiective:

- ✓ Elaborarea unei metodologii inovatoare care să includă ionizarea complet automată bazată pe Chip nanoESI, cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă rezoluție pe un instrument quadrupole time-of-flight (QTOF MS) în vederea evaluarea interacțiunilor necovalente dintre maltohexaoză ( $\text{Glc}_6$ ) și  $\beta$ -lactoglobulină;
- ✓ Să surprindă formarea complexului în soluție tampon de acetat de amoniu (pH 6,0) și apoi în apă pură;
- ✓ Publicarea rezultatelor cercetării într-o revistă importantă.

Ultimul studiu este de fapt punerea în practică a unui concept informatic care să deservească nevoile impuse de cerințele actuale – analiza datelor obținute să fie precisă și să fie obținută într-un timp cât mai scurt. Desigur, și această etapă a solicitat timp, studiu individual și ajutor din partea unor specialiști. Cu toate acestea, rezultatul final a fost pe măsura așteptărilor și este acum folosit de rutină pentru identificarea structurilor gangliozidice oferite prin MS.

Folosind una dintre cele mai moderne metode pe care medicina moleculară le are astăzi la dispoziție: ionizarea complet automată a probei printr-un robot NanoMate cuplat cu MS și fragmentare automată prin mai multe stagii MS ( $\text{MS}^n$ ) am putut colecta și valorifica date importante privind compoziția specifică de gangliozide, secvența de carbohidrați și structura ceramidei selectate. De asemenea, rezultatele prezentate în cadrul tezei au constituit un punct de plecare pentru desemnarea unui kit de biomarkeri specifici pentru diverse tipuri de tumori.

În final, aceste rezultate atestă fezabilitatea și eficiența acestor metode ce pot fi considerate sistemele ideale în acest sens, datorită faptului că sunt capabile să manipuleze volume de probă de ordinul nanolitrilor și oferă un randament sporit experimentelor, informații compoziționale și structurale precise la concentrații subpicomolare.

Obiectivele stabilite au fost multe și îndrăznețe iar factorul timp nu a fost un aliat. Cu eforturi intense și susținute dar și cu un ajutor imens primit din partea mentorilor, a echipei de cercetare din care fac parte și a tuturor celor implicați în acest proiect, am reușit să îndeplinesc aceste obiective. Astfel, rezultatele acestei teze de doctorat se pot regăsi sub forma a 4 lucrări științifice ce fost publicate în jurnale ISI cu factor de impact ridicat și au fost apreciate la nivel național și internațional. Ca urmare, aceste 4 lucrări au colectat până în prezent un număr de 63 de citări, au fost prezentate la numeroase conferințe internaționale și au generat idei valoroase pentru cercetarea viitoare în acest domeniu.

## MATERIALE ȘI METODE

Reactivii folosiți în acest studiu au avut un grad înalt de puritate analitică. Pentru dizolvare și omogenizare probele uscate au fost dizolvate în solvenți, iar ulterior diluțiile lor, au fost vortexate într-un aparat vortex cu o capacitate de până la 2500 rpm. Până în momentul când au fost analizate prin MS, toate probele au fost păstrate în congelator la  $-20^{\circ}\text{C}$ . Spectrometrul de masă utilizat a fost calibrat de fiecare dată înaintea efectuării măsurărilor utilizând soluții standard de calibrare „tuning mix”. Experimentele de tip chip nanoESI s-au desfășurat prin injectarea automată a probelor folosind robotul NanoMate prin intermediul chip-urilor de siliciu ce conțin 400 de orificii. La experimentele de tip QTOF s-au folosit capilare de sticlă cu pereții interiori ce au formă de omega și care, în prealabil au fost dimensionate și pregătite pentru infuzia probelor.

Amestecurile complexe de ganglioze native din probele de tumori cerebrale prelevate de la pacienți precum și cele de țesut cerebral sănătos au fost inițial extrase și purificate. Toate probele au fost obținute de la Universitatea de Medicină din Zagreb, Croatia în urma colaborării științifice cu grupul de cercetare al Prof. Dr. Željka Vukelić. Toate experimentele au respectat cu strictețe codurile de etică în cercetarea biomedicală. Astfel, au fost respectate prevederile Legii nr. 206/2004 cu privire la conduita în cercetarea științifică, dezvoltare tehnologică și inovare. Activitățile desfășurate în cadrul studiilor au respectat reglementările internaționale în domeniu precum și legislația specifică a Uniunii Europene. Permisivitatea pentru experimente ce implică subiecți umani în scopuri științifice a fost obținută din partea Comisiei de Etică a Facultății de Medicină din Zagreb, în cadrul Proiectului nr. 108120, finanțat de Ministerul Croat al Științei și Tehnologiei. Proba de hemangiom cerebral localizat în emisfera dreaptă a cortexului cerebral frontal a fost obținută în timpul procedurii chirurgicale de extirpare a tumorii de la un pacient adult de sex masculin, în vârstă de 42 de ani. Mostra de țesut normal frontal cerebral cortical (NFC) de la un subiect de sex masculin de aceeași vârstă, decedat într-un accident de circulație, a fost disecat pentru a servi pentru comparație; această probă a fost obținută de la Departamentul de Medicină Legală, Facultatea de Medicină, Zagreb, Croatia. La fel s-a procedat și pentru celelalte probe, respectiv o probă de țesut cu meningiom și o probă de țesut conținând o tumoră metastatică a unui adenocarcinom pulmonar și corespondentul acesteia (țesut cerebral sănătos provenit de la un pacient de aceeași vârstă). Ulterior, amestecurile native de ganglioze au fost extrase și purificate respectând protocoalele descrise anterior în condiții identice, după metodele dezvoltate de Svennerholm și Fredman și modificate de Vukelić et. al. Înaintea procedurii de extracție a gangliozelor, fiecare țesutul a fost omogenizat în apă rece ( $+1^{\circ}\text{C}$ ). În final, extractul pur a fost evaporat până la deshidratare

completă folosind un evaporator SpeedVac cuplat la o pompă de vid. Probele uscate astfel obținute au fost cântărite și depozitate la -27° C până la efectuare analizelor prin MS.

Aparținând erei post-genomice, spectrometria de masă dobândește un avânt constant și este considerată una dintre cele mai puternice tehnici analitice de elucidare a compoziției și structurii moleculare din diverse matrici umane, cum este sangele, lichidul cefalorahidian, saliva, urina, lapte, precum și țesuturile sănătoase și patologice. În aceste studii elaborate în cadrul tezei de doctorat s-au folosit 2 tipuri de spectrometre de masă de înaltă performanță, ambele cuplate cu un robot NanoMate pentru automatizarea infuziilor. Astfel, pentru screeningul de masă al hemangiomului (și țesutului cerebral sănătos aferent) s-a folosit platforma nanoESI HCT MS, iar pentru screeningul MS al meningiomului și al metastazei adenocarcinomului pulmonar (împreună cu țesutul cerebral sănătos corespondent) s-a folosit platforma nanoESI QTOF MS. Câteva experimente de spectrometrie de masă s-au derulat folosind un spectrometru de masă cu capcană ionică de mare capacitate (HCT Ultra PTM Discovery) de la firma Bruker Daltonics (Bremen, Germania). HCT MS cu disociere indusă prin ciocnire-CID, cu disociere prin transfer de electroni-ETD și kit de reacție cu transfer de protoni (PTR), kituri și software-ul corespunzător funcționând până la MS<sup>11</sup> în modul manual și MS<sup>5</sup> în cel automat de selectare și fragmentarea a ionilor a fost utilizat ca echipament principal pentru caracterizarea exhaustivă a gangliozidelor din țesut cerebral cu hemangiom și țesut cerebral sănătos. Astfel, am obținut date valoroase cu privire la compoziția și structura (secvența oligozaharidică, profil sialilare structura fragmentelor de lipide, caracterizarea modificărilor existente) acestor molecule. HCT este interfațat cu un computer pe care se rulează pachetul integrat Compass 1.2, incluzând modulele Hystar 3.2.37 și Esquire 6.1.512 pentru funcționalizarea aparatului și achiziționarea spectrelor de masă, a cromatogramelor și un software Data Analysis 3.4.179 pentru stocarea cromatogramelor, spectrelor dar și pentru procesarea datelor de MS.

Robotul NanoMate a fost primul sistem din lume complet automat pentru pulverizarea probelor prin ESI în MS. Pentru studiul gangliozidelor extrase din țesutul cerebral cu metastaza a adenocarcinomului pulmonar, țesutul cerebral sănătos folosit pentru comparație și țesutul cerebral cu meningiom s-a folosit MS cuadropolar cu timp de zbor (QTOF) Micro (Micromass/Waters, Manchester, UK). Acest tip de spectrometru hibrid MS/MS combină simplitatea cuadropolului cu eficiența ridicată a analizorului cu timp de zbor (Time of Flight, TOF) cu accelerare ortogonală (QTOF). Punând laolaltă performanțele analitice ale acestui sistem cu capacitățile extraordinare de prelucrare a rezultatelor experimentale obținute (prin intermediul aplicației software dedicate MassLynx) rezultate au fost generate în cel mai scurt timp și la un nivel de precizie foarte ridicat.

## **REZULTATE, CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE**

Complexitatea și originalitatea acestei teze de doctorat se datorează faptului că aceasta reunește domenii importante de cercetare și anume medicina, biochimia, fizica și informatica. Încă de la început, fixarea obiectivelor s-a realizat într-o notă modernă, îndrăzneță și pragmatică totodată. Este dificil să realizezi lucruri mărețe, care au potențial de a ajunge modele de referință pentru proiecte de cercetare viitoare, fără o tehnologie performantă și o

echipă solidă și unită care să sprijine aceste demersuri. Având aceste cerințe minime și obligatorii asigurate, lucrarea de față se dorește a fi o contribuție onestă la cercetarea fundamentală în sfera glicolipidomicii utilizând spectrometria de masă. O astfel de abordare plasează prezenta contribuție în categoria tezelor ce au la bază cercetarea fundamentală și este diferită de tot ce poate oferi cercetarea clinică, unde numărul cazurilor incluse în lot primează asupra rezultatelor obținute.

Astfel, această teză de doctorat a contribuit prin rezultatele sale la dezvoltarea și aplicarea în practică a două metode diferite de spectrometrie de masă, optimizate pentru screening-ul ganglioizidelor extrase din tumori cerebrale și analizarea lor, comparativ cu cele extrase din țesut cerebral sănătos.

Prima metodă a utilizat un spectrometru de masă cu analizor cu capcană ionică de mare capacitate, HCT MS cuplat cu sistemul automat NanoMate de infuzie a probei prin chip, pentru screening-ul de masă al ganglioizidelor extrase din hemangiom și din țesutului cerebral sănătos.

Cea de-a doua tehnică a avut la bază spectrometria de masă cu analizor cuadripolar hibrid cu timp de zbor (QTOF MS), ionizare prin nanoESI și fragmentare prin CID MS/MS și a fost aplicată pentru analiza ganglioizidelor extrase dintr-o probă de meningiom cerebral și dintr-o probă de metastază cerebrală a unui adenocarcinom pulmonar (împreună cu țesutul cerebral sănătos corespondent). De asemenea, această metodă s-a aplicat și pentru studiul complexilor proteo-zaharici și care a fost prezentat ca și subcapitol referitor la perspectivele viitoare de cercetare. Din rezultatele prezentate în această teză se desprind următoarele concluzii:

- 1). Cercetare de față a avut ca rezultat dezvoltarea unei metodologii moderne pentru investigarea expresiei și structurii ganglioizidelor într-o tumoră benignă a creierului uman. La momentul publicării rezultatelor, acesta a fost **primul studiu** consacrat ganglioizidelor dintr-un hemangiom cerebral.
- 2). Referitor la aceeași contribuție, putem afirma că pentru prima dată s-a folosit metoda avansată de spectrometrie de masă complet automatizată bazată pe chip-nanoESI cuplat direct la HCT și CID MS<sup>2</sup> pentru elucidarea ganglioizidelor din hemangiom cerebral.
- 3). Modificarea compoziției ganglioizidelor analizate din hemangiom în raport cu expresia ganglioizidelor din creierul uman sănătos a fost relevantă prin următorul aspect: CFH afișează ganglioizidele monosialilate scurte, în timp ce în CFN apar ca specii majore ganglioizidele mono- și polisialilate precum și componentele O-acetilate. Cu toate acestea, în proba de hemangiom s-a detectat o specie O-Ac-GM4 și o specie O-Ac-GD2. Astfel, prezența O-Ac-GD2 se poate asocia cu gradul redus de malignitate al tumorii cerebrale investigate.
- 4). Totodată, GT1 (d18:0/20:0) detectat ca un ion de intensitate scăzută, pare a fi un alt marker găsit doar în CFH și nu în cortexul sănătos.
- 5). Un aspect notabil este utilizarea metodelor MS ultrasensibile și precise pentru determinarea compozițiilor modificate ale ganglioizidelor cerebrale aflate uneori sub limita de detecție a altor metode spectrometrice. De asemenea trebuie subliniată reproductibilitatea (aproape de 100%), viteza și sensibilitatea analizei, consumul unei cantități reduse de probă și nu în ultimul rând costul redus al unei analize.



6). NanoESI HCT MS și CID MS<sup>n</sup> bazate pe chip oferă posibilitatea de a fi introduse ca metode de diagnostic medical pentru analiza comparativă a structurilor și compoziției glicoconjugatilor omologi și din alte țesuturi sau fluide ale organismului.

Cea de a doua direcție de cercetare a vizat investigarea în detaliu a compoziției gangliozidelor într-o probă de țesut cerebral cu meningiom urmată de analiza prin fragmentare a speciilor individuale utilizând o metodă avansată de spectrometrie de masă bazată pe nanoESIchip QTOF MS și CID MS/MS referitor la care se desprind următoarele concluzii

7). Prin MS nanoESIchip-QTOF se identifică un număr mult mai mare de structuri decât cele raportate anterior de literatura de specialitate. Astfel, acest studiu a furnizat date despre 34 de noi specii diferite de gangliozide, ceea ce depășește cu mult pe cele raportate anterior pentru meningioame.

8). În meningiomul studiat, comparativ cu alte tumori, structurile identificate prezintă lanțuri oligozaharidice mai scurte, cu un grad de sialilare nu mai mare de doi. Nu s-au descoperit modificări de O-fucozilarea, O-acetilarea sau O-GalNAc așa cum s-au găsit în hemangiom.

9). Pentru a elucida structura celor mai abundenti ioni, s-a efectuat fragmentarea simultană a acestor ioni prin CID MS/MS. Datele obținute în urma fragmentării au arătat că pentru fiecare GM1(d18:1/24:1) și GM1(d18:1/24:0), izomerii a cât și izomerii b sunt exprimați simultan.

10). Datele noastre sugerează că speciile GM1 și speciile GM3 pot fi în general recunoscute ca un marker incontestabili pentru acest tip de tumori. Cu atât mai mult, posibilul rol al GM1 justifică explorarea și examinarea lui în continuare (ținând cont de diversitatea relativ ridicată a ceramidelor din compoziția sa) urmand ca studiile viitoare sa certifice rolul prezumat.

11). Experimentele efectuate folosind un singur specimen de meningiom au demonstrat că nanoESIchip QTOF MS și CID MS/MS pot fi metodele de elecție pentru analiza amestecurilor complexe de gangliozide cu probleme majore de ionizare.

A treia direcție de cercetare a fost legată de investigarea gangliozidelor din metastaza cerebrală a adenocarcinomului pulmonar, referitor la care se desprind următoarele concluzii:

12). Combinând MS de înaltă performanță bazată pe chip-nanoESI cu HPTLC și scanare densitometrică a fost posibilă detectarea și elucidarea structurală a 125 de specii distincte de gangliozide exprimate în metastaza cerebrală a adenocarcinomului pulmonar.

13). S-a constatat de asemenea o scădere de 14 ori a conținutului total de gangliozide în acest tip de metastază comparativ cu țesutul cerebral sănătos (compoziția gangliozidelor din proba de metaADK fiind evident modificată în comparație tesutul cerebral sănătos).

14). MetaADK este caracterizată de specii scurte de gangliozide cu conținut redus de acid sialic și cu prevalență de tip GM, în timp ce țesutul cerebral sănătos este dominat de structuri de la mono- până la hexasialilate cu o expresie mai mare a structurilor de tip GD și GT.

15). Datele MS au pus în evidență prezența în metaADK a mai multor specii monosialilate neobișnuit modificate prin fucozilare sau O-acetilare. Prin MS tandem utilizând CID, componenta oligozaharidica a speciei GD3(d18:1/18:0) asociată cu metastaza cerebrală a fost elucidată structural. În același timp, un număr de ioni amprentă pentru ceramidă au permis, descifrarea structurii componentei lipidice.

16). În cadrul experimentelor de analiza a gangliozidelor din metaADK s-a atins performanța ca screening-ul MS urmat de CID MS/MS să necesite doar 500 fmoli de material la un debit de

aproximativ 100 nL/min, timpul de achiziție de 1 min, o concentrație de probă de numai 2,5 pmol/pl ceea ce corespunde la un consum de 250 fmol de extract biologic). Aceste date singure, fac din platforma bioanalitică utilizată o metodă de rutină, ultrarapidă și sensibilă aplicabilă altor tipuri de cancer și markeri moleculari.

A patra direcție de cercetare din cadrul tezei a constituit-o conceperea și elaborarea de programe aferente interpretărilor de date structurale furnizate de metodele și tehnicile de spectrometrie de masă, în acest sens concluzionând ca și contribuții originale următoarele:

17). Elaborarea și implementarea unui software original denumit GanglioBase, capabil să calculeze, analizeze și afișeze toate variantele structurale de ganglioze care corespund unui ion pseudomolecular dat de utilizator. Avantajele utilizării sale sunt numeroase, cele mai importante fiind timpul redus de analiză a rezultatelor generate de MS și exactitatea acestora. Software-ul este de 3 ani la dispoziția tuturor cercetătorilor ce lucrează în lipidică, glicomică și glicolipidică.

O a cincea direcție de studiu a prilejuit-o analiza prin spectrometrie de masă a posibilității de formare a unor complecși necovalenți între proteine și oligozaharide, în particular între  $\beta$ -LG și Glc<sub>6</sub> reținându-se următoarele contribuții:

18). Folosind platforma chip-nanoESI QTOF MS a fost pus în evidență complexul  $\beta$ -LG-Glc<sub>6</sub> sub forma sa monosodiată și hexaprotonată; s-a pus în evidență complexul atât în soluție tampon cât și în soluție apoasă efectuându-se un studiu complet privind concentrația versus timpul de reacție. Pentru demonstrarea existenței complexului în experimente de CID-MS au fost suficiente 2 minute pentru obținerea unui spectru de masă elocvent care să evidențieze complexul format și doar 5 min pentru experimentul top-down de caracterizare completă a complexului necovalent.

19). Ca urmare a întregii expertize dobândite de-a lungul studiilor de analiză a ganglioazelor și a complexelor necovalente se poate certifica faptul că chip-nanoESI QTOF MS și CID MS/MS a fost capabilă să furnizeze o caracterizare structurală și compozițională completă cu o viteză și o sensibilitate de analiză remarcabilă și la un preț de cost redus. Dacă la aceste performanțe se adaugă un consum de consumabile extrem de redus, realizăm că utilizarea pe viitor, în cadrul unor trialuri clinice focusate pe detectarea unor markeri biochimici specifici pentru diagnosticul precoce al neoplaziilor, poate fi cheia spre succes în managementului acestor cazuri.

20). În ultimul timp se discută tot mai des conceptul de medicină personalizată și posibilitățile pe care aceasta le poate oferi pacienților. MS a fost utilizată în mod obișnuit în medicina de laborator, în special în contextul testelor toxicologice și al monitorizării terapeutice a medicamentelor. Cuantificarea medicamentelor din sânge pentru a personaliza dozarea în funcție de variabilele farmacocinetice individuale și verificarea conformității (monitorizarea terapeutică a medicamentelor) se face pentru un număr tot mai mare de compuși în special pentru bolile psihiatrice și infecțioase.

21). MS este o tehnică unică prin faptul că poate analiza direct orice moleculă biologică susceptibilă la ionizare. Evoluția tehnologică constantă a MS oferă beneficii cumulative din punct de vedere analitic (de exemplu, îmbunătățiri ale sensibilității și selectivității) dar și funcțional, având ca rezultat potențial extinderea și implementarea acestei tehnici pentru a deservi un număr cât mai mare de specialități clinice medicale.

Bibliografia este reprezentată de un screening de literatură și conține 290 de referințe citate conform formatului Vancouver. Teza conține 44 de figuri și 8 tabele ce ilustrează și sistematizează rezultatele cercetării.

**„VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
TIMIȘOARA**

**FACULTY OF MEDICINE**

**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY**

**ȘCHIOPU C. CRISTIAN CĂTĂLIN**



## **SUMMARY**

**of the thesis**

**MODERN GLYCOMIC METHODS FOR BRAIN TUMOR  
POTENTIAL BIOMARKER DETECTION AND ANALYSIS BY  
MASS SPECTROMETRY**

**Scientific Coordinator: PROF. DR. ȘIȘU EUGEN**

**Timișoara, 2017**

## – TABLE OF CONTENTS –

<b>INTRODUCTION</b>	XVI
<b>THE GENERAL PART</b>	1
1. BIOMEDICAL ASPECTS IN TUMORAL PATHOLOGY	1
2. BIOCHEMICAL ASPECTS IN TUMORAL PATHOLOGY	12
2.1. Mass Spectrometry	12
2.2. Lipids	13
2.3. Gangliosides	14
2.4. Proteins	36
<b>THE SPECIFIC PART</b>	37
3. MATERIALS AND METHODS	37
3.1. Reagents and laboratory materials	37
3.2. Selection and description of the working material. Analysis of complex ganglioside mixtures extracted from cerebral tissue	38
3.3. Analytical platforms	39
3.4. Computer platforms	45
4. RESULTS AND DISCUSSION	47
4.1. The study of the ganglioside profile from cerebral hemangioma compared to healthy brain tissue by Chip nanoESI HCT MS Studiul profilului ganglioizidic al hemangiomului cerebral comparativ cu țesutul cerebral sănătos, din punct de vedere structural, prin Chip nanoESI HCT MS	47
4.2. The study of the ganglioside profile from cerebral meningioma via Chip nanoESI QTOF MS	61
4.3. The study of the ganglioside profile of cerebral metastasis of lung adenocarcinoma, compared to healthy brain tissue via nanoESI QTOFMS	75
4.4. Original gangliobase software used to identify the ganagliosides species obtained by MS screening	96
4.5. Pilot study to test the feasibility of mass spectrometry methods developed here for the study of protein- glycoconjugates functional interactions	101
5. CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS	114
REFERENCES	119
APPENDIX	137

**Key words:** tumors, mass spectrometry, gangliosides, biomarkers, non-covalent interactions

## INTRODUCTION

Over the last 15 years, major technological advances have allowed the molecular knowledge of vegetal and animal matrices to be further enhanced through the use of fast, efficient and inexpensive analysis methods.

The present PhD thesis is structured in two main chapters – The General Part respects the ratio of 1/3 of the thesis and 2/3, respectively, for the one corresponding to the personal researches. The second part, "The special Part", includes the original results of the research in the studied field, presented in 5 different experimental studies.

**The novelty and importance** of this study lies firstly in the fact that it is part of the general trend of characterizing the majority of constituents, the "om" of a given element (cell, tissue, organ) such as genes whose intensive research has led to full mapping of the human genome. Secondly, the size of the experimental data sets involved the widespread use of expert software on the machine-user interface at unmatched processing times and speeds in the previous decades. Thirdly, the "omics" methods (with our modest contribution to glycomics and lipidomics) are becoming more and more targeted, leading to fast-growing independent research directions such as the genome, transcriptome, proteome and metabolome. However, we are still far from fully understanding the mechanisms of interdependent functionality of tumor subpopulations.

Detailed study of membrane components such as glycosphingolipids may provide important details about tumor pathology. Detection of new types of tumor markers plays an important role in early clinical diagnosis, but also in evaluating treatment for patients with certain tumor pathologies.

Sialylated glycosphingolipids or gangliosides are particularly abundant in the brain, where they are found in the gray matter about 5 times more often than in the white matter. Gangliosides exhibit a very wide diversity and complexity, so high-performance techniques capable to identify, isolate and decipher their structural composition are required. One of the most reliable techniques available today to fulfill this goal is mass spectrometry (MS). The ability of MS to perform high sensitivity structural bioassays has increased considerably following the development of electrospray ionization technique that allows the detection and identification of biopolymers from low molecular weight metabolic products to glycans, lipids, nucleic acids, peptides and high molecular weight proteins and/or any of their functional interactions.

**The importance and timeliness** of the research theme is derived from the modern and innovative concept of the study as a whole, but also from the highly performance methods used for analyze.

The continuous development and refinement of ESI MS techniques culminated with the construction of miniaturized and automated measuring devices for high-throughput measurements based on the advances in nanotechnology, chips and robotics.

In combination with high resolution mass spectrometers or instruments capable of performing sequential fragmentation in multiple stages, chip-electrospray has demonstrated its unique ability to provide a structural characterization of minor ganglioside species in complex mixtures that have been proven to represent valuable biomarkers. Integrated miniaturized platforms that work on the "lab-on-a-chip" concept or micro-total analysis systems have been introduced into mass spectrometry as technologies for the ESI ion source. Having such systems

for robotic delivery and ionization of the chip based sample, an unprecedented increase in sensitivity, reliability and efficiency of analysis can be achieved with minimal sample volume and handling.

**The motivation** of this study was based on the idea of developing a MS based method for the study of gangliosides in various brain tumors and to find, isolate and characterize some biomarker-specific structures for each type of tumor. At both international and national level, MS-based electrospray-based glycomic assays are still a novelty, and those on human brain tumor gangliosides that make the theses objective, were among the first in the world. Since 2006, some of the studies started by our group have focused on the study of gangliosides to determine the expression and structure of gangliosides in different regions of the normal and tumor brain of different ages. On the other hand, as a result of chip-MS generation of a large set of data and in view of the complexity of the sample, the processing of relevant information has become a mandatory and indispensable condition to improve the reliability of the interpretation result and to make technology faster and easy to use.

Starting from these premise, **the overall objective** of the PhD thesis is the functionalization and optimization of ultramodern techniques based on high resolution mass spectrometry associated with robotic infusion methods for the detection and mapping of complex biomarker structures in various brain tumors. Hence, the objectives are branched out and stepped in with a scientific outline for each activity. Thus, in this thesis three studies were included which aimed at mapping gangliosides in cerebral tumors compared to healthy brain tissue, a study on proteomics - non-covalent interactions, and a computer study that produced the unique and original program called GanglioBase.

## OBJECTIVES

### **The first study has the following objectives:**

- ✓ Engaging the analytical platform based on mass spectrometry with high capacity ion trap and electrospray ionization (chip-nanoESI HCT MS) and optimizing it in order to elucidate the expression of gangliosides in a benign brain tumor, namely hemangioma versus healthy brain tissue;
- ✓ Analysis of gangliosides from hemangioma versus healthy tissue;
- ✓ Statistical analysis of the data obtained through the unique GanglioBase platform;
- ✓ Interpretation of results in correlation with scientific literature studies;
- ✓ Publishing the results in a prestigious ISI journal.

### **The second study sets the following objectives:**

- ✓ Involvement and optimization of another QTOF MS chip-based analytical platform to elucidate the expression of gangliosides in a benign brain tumor, namely meningioma;
- ✓ Development and optimization of the MS-based analytical platform for the study of gangliosides in meningioma;
- ✓ Examination of meningioma gangliosides;

- ✓ Detailed investigation of the composition of gangliosides, followed by fragmentation analysis of individual species found in meningioma using an advanced mass spectrometry method based on nanoESIchip QTOF MS and CID MS/MS;
- ✓ Statistical analysis of data obtained through the GanglioBase platform and interpretation of the obtained results;
- ✓ Publishing the results in a prestigious ISI journal.

**The third study aims at:**

- ✓ Functionalization of chip-nanoESI QTOF MS platform for the compositional and structural analysis of ganglioside expression in cerebral metastatic brain metastasis (metaADK) versus healthy brain tissue;
- ✓ Mapping the gangliosides from metaADK compared to healthy tissue;
- ✓ Statistical analysis of the data obtained and interpretation of the results;
- ✓ Publishing the results in a prestigious ISI journal.

**The fourth study, which focused on protein- carbohydrate non-covalent interactions and targets the following objectives:**

- ✓ Developing an innovative methodology that includes fully automated Chip nanoESI-based ionization coupled with high-resolution mass spectrometry on a quadrupole time-of-flight instrument (QTOF MS) to evaluate non-covalent interactions between maltohexaose (Glc<sub>6</sub>) and  $\beta$ - lactoglobulin;
- ✓ To surprise formation of the complex in ammonium acetate buffer (pH 6.0) and then in pure water;
- ✓ Publishing the results of the research in a prestigious ISI journal.

**The last study** represents actually the implementation of an information concept that serves the needs of the current requirements - the analysis of the obtained data to be accurate and to be obtained in the shortest possible time. Of course, this stage also required time, individual study and help from some specialists. However, the end result was as expected and is now routinely used to identify the ganglioside structures provided by MS.

Using one of the most modern methods that molecular medicine has at disposal today: fully automated ionization of the sample through a MS-coupled NanoMate robot and multiple MS/MS (MS<sup>n</sup>) automated fragmentation, we were able to collect and exploit valuable informations about specific ganglioside, the carbohydrate sequence and the selected ceramide structure. Also, the results presented in this thesis were a starting point for the designation of a kit of biomarkers specific for various types of tumors.

Finally, these results demonstrate the feasibility and effectiveness of these methods, which can be considered ideal systems in this regard, because they are capable of manipulating sample volumes of nanotubes and provide enhanced experimental yields, precise compositional and structural information at sub-picomolar concentrations.

The set of the goals were numerous and ambitious, and the factor time was not an ally. With intense and sustained efforts and with huge help from mentors, the research team, and all those involved in this project, I managed to meet these goals. Thus, the results of this doctoral thesis



can be found in the form of 4 scientific papers that were published in ISI journals with a high impact factor and were appreciated at national and international level. As a result, these 4 papers have so far collected 63 citations, have been presented at numerous international conferences and have generated valuable ideas for future research in this field.

## **MATERIALS AND METHODS**

The reagents used in this study had a high degree of analytical purity. For dissolution and homogenization the dried samples were dissolved in solvents and subsequently their dilutions were vortexed in a vortex apparatus with a capacity of up to 2500 rpm. By the time they were analyzed by MS, all samples were stored in the freezer at -20 °C. The used mass spectrometer was calibrated each time before performing the measurements using standard tuning mix calibration solutions. NanoESI chip experiments were conducted by automatically sampling samples using the NanoMate robot through 400- nozzles silicon chips. In QTOF experiments, glass capillaries with omega-shaped inner walls were used and previously sized and prepared for sample infusion.

Complex mixtures of native gangliosides from cerebral tumor samples taken from patients as well as healthy brain tissues were initially extracted and purified. All the samples were obtained from Zagreb Medical University, Croatia, following the scientific collaboration with the research group of Prof. Dr. Željka Vukelić. All experiments strictly followed the codes of ethics in biomedical research. Thus, the provisions of Law no. 206/2004 on conduct in scientific research, technological development and innovation were respected. The activities carried out in the studies complied with the international regulations in the field as well as the specific legislation of the European Union. Permission for experiments involving human subjects for scientific purposes was obtained from the Ethics Commission of the Faculty of Medicine in Zagreb under Project no. 108120, funded by the Croatian Ministry of Science and Technology. The cerebral hemangioma sample located in the right hemisphere of the frontal cerebral cortex was obtained during the surgical procedure of tumor extirpation from a 42-year-old adult male patient. The normal cortical frontal cerebral tissue (NFC) sample from a male subject of the same age, deceased in a traffic accident, was dissected to serve for comparison; this sample was obtained from the Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Zagreb, Croatia. The same procedures were followed for the other samples, namely a tissue sample with meningioma and a tissue sample containing a metastatic tumor of a lung adenocarcinoma and its correspondence (healthy brain tissue from a patient of the same age). Subsequently, native ganglioside mixtures were extracted and purified according to the previously described protocols under identical conditions, according to the methods developed by Svennerholm and Fredman and modified by Vukelić et. al. Prior to the ganglioside extraction procedure, each tissue was homogenized in cold water (+ 1 °). Finally, the pure extract was evaporated to complete dehydration using a SpeedVac evaporator coupled to a vacuum pump. The dried samples thus obtained were weighed and stored at -27 °C until the analysis by MS.

In the post-genomic era, mass spectrometry gains a steady advance and is considered one of the most powerful analytical techniques for elucidating the composition and molecular

structure of various human matrices, such as blood, cerebrospinal fluid, saliva, urine, milk, and also healthy and pathological tissues. Two types of high-performance mass spectrometers, both coupled with a NanoMate robot for automatic infusion, were used in these studies. Thus, for the screening of hemangioma (and related healthy brain tissue), the nanoESI HCT MS platform was used. The nanoESI QTOF MS platform was used for the MS screening of meningioma and metastasis of lung adenocarcinoma (along with healthy healthy brain tissue). Several mass spectrometry experiments were performed using a high-capacity ion-trap mass spectrometer (HCT Ultra PTM Discovery) from Bruker Daltonics (Bremen, Germany). HCT MS with CID-collision-induced dissociation by electron-dissociation (ETD) and reaction kit for Proton Transfer (PTR) and corresponding software running up to MS<sup>11</sup> in manual mode and MS<sup>5</sup> in automatic selection and ion fragmentation has been used as the main equipment for the exhaustive characterization of gangliosides in brain tissue with hemangioma and healthy brain tissue. Thus, we obtained valuable data on composition and structure (oligosaccharide sequence, profile and structure of lipid fragments, characterization of existing modifications) of these molecules. HCT is interfaced with a computer running the Compass 1.2 integrated package, including Hystar 3.2.37 and Esquire 6.1.512 modules for device operation and mass spectra acquisition, chromatograms, and Data Analysis 3.4.179 software for storing chromatograms, spectra but also for processing MS data.

The NanoMate robot was the world's first fully automated system for spraying samples through ESI in MS.

For the study of gangliosides extracted from cerebral tissue with pulmonary adenocarcinoma metastasis, healthy cerebral tissue used for comparison, and meningioma cerebral tissue, QTOF Micro (Micromass/Waters, Manchester, UK) was used. This type of MS/MS hybrid spectrometer combines the quadrupole simplicity with the high efficiency of the Orthogonal Acceleration (QTOF) Time Flight Analyzer (TOF). Putting together the analytical performance of this system with extraordinary capabilities of processing the experimental results obtained (through the dedicated MassLynx software application), results were generated in the shortest time and at a very high level of accuracy.

## **RESULTS, CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS**

The complexity and originality of this doctoral thesis is due to the fact that it brings together important fields of research, namely medicine, biochemistry, physics and computer science. From the very beginning, the objectives were organised and achieved in a modern, bold and pragmatic note at the same time. It is difficult to achieve great things, which have the potential to become reference models for future research projects without advanced technology and a solid and reliable team to support these approaches.

With these minimum and mandatory requirements insured, the present paper is intended to be an invaluable contribution to fundamental research in the sphere of glycolipidomics using mass spectrometry. Such an approach puts this contribution in the category of theses based on fundamental research and is different from what clinical research can offer, where the number of cases included in the study prevails over the results obtained.

Thus, this PhD thesis has contributed through its results to the development and application in practice of two different methods of mass spectrometry optimized for the screening of gangliosides extracted from brain tumors and their analysis compared to those extracted from healthy brain tissue.

The first method used a mass spectrometer with a high-capacity ion trap analyzer, HCT MS coupled with the NanoMate automated chip infusion system for mass screening of gangliosides extracted from the hemangioma and healthy brain tissue.

The second technique was based on quadrupole hybrid flight time quadrupole (QTOF MS) mass spectrometry, nanoESI ionization and CID MS/MS fragmentation, and was applied for the analysis of gangliosides extracted from a meningioma sample brain and a cerebral metastasis sample of a lung adenocarcinoma (along with the corresponding healthy brain tissue). This method was also applied to the study of proteosaccharide complexes and was presented as a subchapter on future research perspectives. From the results presented in this thesis the following conclusions can be drawn:

- 1). This research has resulted in the development of a modern methodology to investigate the expression and structure of gangliosides in a benign brain tumor. At the time of publishing the results, this was the first study of gangliosides in a cerebral hemangioma.
- 2). Reflecting on the same contribution, we can say that for the first time, the fully automated chip-nanoESI based mass spectrometry method was directly coupled to HCT and CID MS<sup>2</sup> to elucidate gangliosides from cerebral hemangioma.
- 3). The modification of the composition of the gangliosides analyzed from the hemangioma relative to the expression of the gangliosides in the healthy human brain was relevant in the following way: CFH displays short monosylated gangliosides, while in the CFN mono- and polysialyzed gangliosides as well as O-acetylated components appear as major species. However, an O-Ac-GM4 species and an O-Ac-GD2 species were detected in the haemangioma sample. Thus, the presence of O-Ac-GD2 may be associated with the low degree of malignancy of the investigated brain tumor.
- 4). At the same time, GT1 (d18: 0/20: 0) detected as a low intensity ion appears to be another marker found only in CFH and not in the healthy cortex.
- 5). A notable aspect is the use of ultrasensitive and precise MS methods for the determination of modified brain ganglioside compositions, sometimes under the limit of detection of other spectrometric methods. Also, the reproducibility (close to 100%), the speed and sensitivity of the analysis, the consumption of a small amount of sample and, last but not least, the low cost of analyzes must be emphasized.
- 6). NanoESI HCT MS and CID MS<sup>2</sup> based on chip offer the opportunity to be introduced as medical diagnostic methods for the comparative analysis of the structures and composition of homologous glycoconjugates and other tissues or fluids of the body.

The second research direction aimed at investigating in detail the ganglioside composition in a meningioma cerebral tissue sample followed by fragmentation analysis of individual species using an advanced mass spectrometry method based on nanoESIchip QTOF MS and CID MS/ MS on which the following conclusions are drawn:

- 7). MS nanoESIchip-QTOF identifies a much larger number of structures than previously reported by the literature. Thus, this study provided data on 34 new different ganglioside species, which far exceeds those previously reported for meningiomas.
- 8). In the meningioma studied, compared to other tumors, the identified structures have shorter oligosaccharide chains with a sialilation degree of not greater than two. There have been no changes in O-fucosylation, O-acetylation or O-GalNAc as found in hemangioma.
- 9). To elucidate the structure of the most abundant ions, simultaneous fragmentation of these ions by CID MS/MS was performed. Data obtained from fragmentation showed that for each GM1(d18:1/24:1) and GM1(d18:1/24:0), a isomers and b isomers are expressed simultaneously.
- 10). Our data suggest that GM1 and GM3 species may generally be recognized as an unquestionable biomarker for this type of tumor. Moreover, the possible role of GM1 warrants further exploration and examination (taking into account the relatively high diversity of ceramides in its composition), and future studies will certify the presumed role.
- 11). Experiments performed using a single specimen of meningioma have demonstrated that nanoESIchip QTOF MS and CID MS/MS may be the methods of choice for the analysis of complex mixtures of gangliosides with major ionization problems.

The third research direction was related to the investigation of gangliosides from cerebral metastasis of lung adenocarcinoma, in relation to which the following conclusions can be drawn:

- 12). By combining high performance chip-nanoESI MS with HPTLC and densitometric scanning, it was possible to detect and structurally elucidate 125 distinct species of gangliosides expressed in brain metastasis of lung adenocarcinoma.
- 13). There was also a 14-fold decrease in the total ganglioside content in this type of metastasis compared to healthy brain tissue (the composition of the gangliosides in the metaADK sample is obviously modified in comparison to healthy brain tissue).
- 14). MetaADK is characterized by short species of low sialic acid and GM-like ganglioside, while healthy brain tissue is dominated by mono- to hexasialilate structures with greater expression of GD and GT.
- 15). MS data revealed the presence in metaADK of several monosiallated species unusually altered by fucosylation or O-acetylation. By tandem MS using CID, the oligosaccharide component of the GD3 species (d18:1/18:0) associated with cerebral metastasis was structurally elucidated. At the same time, a number of imprinted ions for ceramide allowed, deciphering the structure of the lipid component.
- 16). In the metaADK ganglioside analysis experiments, the performance as MS screening followed by CID MS/MS required only 500 fmol of material at a flow rate of about 100 nL/min, the acquisition time of 1 min, a concentration of sample of only 2.5 pmol/pl which corresponds to a consumption of 250 fmol of biological extract). These data alone make the bioanalytical platform a routine, ultrafast and sensitive method for other types of cancer and molecular markers.

The fourth research direction in the thesis was the conception and elaboration of programs related to the structural data interpretation provided by the mass spectrometry methods and techniques, thus concluding as original contributions the following:

17). Elaborate and implement an original software called GanglioBase, capable of computing, analyzing and displaying all structural variants of gangliosides corresponding to a pseudo-molecular ion given by the user. The advantages of its use are numerous, the most important being the reduced time of analysis of MS-generated results and their accuracy. The software is available for all researchers working in lipidomics, glycomics and glycolipidomic for 3 years.

A fifth study direction has led to the mass spectrometry analysis of the possibility of formation of non-covalent complexes between proteins and oligosaccharides, particularly between  $\beta$ -LG and Glc<sub>6</sub>, taking into account the following contributions:

18). Using the chip-nanoESI QTOF MS platform, the  $\beta$ -LG-Glc<sub>6</sub> complex was revealed in its monosodic and hexaprotonated form; the complex was revealed in both buffer and aqueous solution, performing a full concentration-versus reaction time study. To demonstrate the existence of the complex in CID-MS experiments, two minutes were sufficient to produce an eloquent mass spectrum that highlighted the formed complex and only 5 min for the top-down experiment of full characterization of the non-covalent complex.

19). As a result of all the expertise gained during ganglioside analysis and non-covalent complexes, it can be certified that chip-nanoESI QTOF MS and CID MS/MS has been able to provide a complete structural and compositional characterization at a rate and sensitivity of remarkable analysis and at a low cost price. If these consumptions are extremely low in consumption, we realize that future use in clinical trials focused on detecting specific biochemical markers for early diagnosis of neoplasia can be the key to success in managing these cases.

20). Lately, the concept of personalized medicine is increasingly being discussed and the possibilities it can offer to patients. MS has been commonly used in laboratory medicine, particularly in the context of toxicological tests and therapeutic monitoring of medicines. Quantification of blood products to customize dosing based on individual pharmacokinetic variables and compliance checking (therapeutic drug monitoring) is done for an increasing number of compounds, especially for psychiatric and infectious diseases.

21). MS is a unique technique because it can directly analyze any biological molecule susceptible to ionization. The constant technological evolution of the MS offers cumulative analytical benefits (eg. sensitivity and selectivity improvements) but also functional, potentially resulting in the expansion and deployment of this technique to serve as many clinical medical specialties as possible.

The bibliography is represented by a literature screening and contains 290 quoted references according to the Vancouver format. The thesis contains 44 figures and 8 tables illustrating and systematizing the results of the research.