

Sejtvonalakból izolált extracelluláris vezikulák glikozilációjának jellemzése

TURIÁK Lilla

MTA-HUN-REN TTK Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport, HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, 1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.

1. Bevezetés

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) a különböző sejtek által az extracelluláris térbe kibocsátott néhány 10 vagy néhány száz nanométer átmérőjű képletek. A sejtekhez hasonlóan foszfolipid kettős réteggel rendelkeznek. Tartalmaznak fehérjéket, lipideket és RNS molekulákat is, melyek összetételéről feltételezik, hogy a kibocsátó sejt aktuális állapotát tükrözik. Az EV-k csoportosítása korábban eredetük szerint történt, így megkülönböztettük az apoptózis során képződő apoptotikus testeket, az endoszomális eredetű exoszómákat és a plazmamembránról lefüződő mikrovezikulákat¹. Manapság a Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság ajánlásainak megfelelően méret alapján történik a nevezéktan, hiszen a különböző eredetű képződő EV-k között lehetnek méretbeli átfedések². Két fő csoportjuk a 200 nm-nél nagyobb átmérővel rendelkező nagyméretű és a 200 nm-nél kisebb átmérőjű kisméretű EV-k.

Az elmúlt két évtizedben az EV-k kutatása rendkívüli módon fellendült, különösen mióta felismerték fontosságukat a sejtek közötti jelátviteli folyamatokban³. Az EV-k képesek a bennük található molekulákat különböző sejteknek átadni, ezáltal számos biológiai folyamatra hatással vannak. A kisméretű EV-k testfolyadékokból, sejtvonalakból történő izolálása több módszerrel is lehetséges⁴. Minden módszernek vannak előnyei/hátrányai, amelyeket érdemes szem előtt tartani a kutatási kérdés szempontjából. A leggyakoribb technika a nagy sebességgel történő ultracentrifugálás. Ezt ki lehet egészíteni sűrűséggrádiens alkalmazásával, mely tisztább preparátumokat eredményez, hiszen az EV-ket úszási sűrűségük szerint is tisztítja. Manapság széleskörben alkalmazzák a méretkizárásos kromatográfiát, mely során jelentős mintahígulással kell számolni. Léteznek továbbá kereskedelmi forgalomban kapható EV-izoláló készletek is. Izolálást követően egy nagyon fontos lépés a preparátumok szerkezetjellemezése. Az EV preparátum tisztaságát, a vezikulák morfológiáját elsősorban transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) jellemzik. Emellett az EV-k méreteloszlását és részecskeszámát szükséges meghatározni, például mikrofluidikus ellenállás-impulzus méréssel (MRPS). Gyakran szoktak még Western Blot vizs-

gálatot is végezni a vezikula markerfehérjék jelenlétének igazolására.

A daganatos megbetegedések során a tumoros sejtek által kibocsátott EV-k képesek a tumor mikrokörnyezetének átalakítására és fontos szerepet játszanak az áttétképződésben is. Ezért a tumor-eredetű extracelluláris vezikulák, röviden TEV-k a tumor mikrokörnyezetében zajló folyamatok aktívan vizsgált szereplői⁵. Molekuláris alkotóik közül a proteoglikánok és glikoproteinek fontos szerepet játszanak a jelátvitelben, amit elsősorban az általuk hordozott glikánláncok közvetítenek⁶. A glikoziláció során a fehérjékhez vagy ritkább esetben lipidekhez kapcsolódnak különböző méretű és változatos szerkezetű cukorláncok. A sejtek és az EV-k membránjába ágyazott membránfehérjék többsége hordoz ilyen glikánláncokat. Ezek közül a kutatásaink fókuszában a glükózaminoglikánok (GAG-ok) és az *N*-glikoziláció vizsgálata áll. *N*-glikoziláció esetén a fehérjék meghatározott szekvencia szakaszaiban található aszparagin (N) aminosavakhoz (NXS/T, S= szerin, T=treonin, X= bármilyen aminosav, kivéve prolin) csatlakozik a változatos szerkezetű glikánlanc. Emlősökben az összes *N*-glikánra jellemző egy öttagú cukoregységből álló magszerkezet, melyek a hozzákapcsolódó további glikánok alapján három osztályba sorolhatóak: oligomannóz, komplex és hibrid. A proteoglikánokhoz kapcsolódó GAG láncok ismétlődő diszacharid egységekből felépülő lineáris poliszacharidok, melyek nélkülözhetetlen szerepet játszanak számos biológiai folyamatban, így a metasztázis képződésben és az angiogenezisben is⁷. A kondroitin-szulfát (CS) GAG osztály változatos számú glükuronsav és *N*-acetilgalaktózamin diszacharidból épül fel, továbbá az egységek különböző pozícióban tartalmazhatnak szulfát csoportokat. A láncon belüli szulfatáltság mértéke befolyásolja a különböző molekulák, pl. növekedési faktorok kötődését és már igazolták, hogy a szulfatációs mintázat rákos megbetegedésekben változik az egészséges szövethez képest⁸.

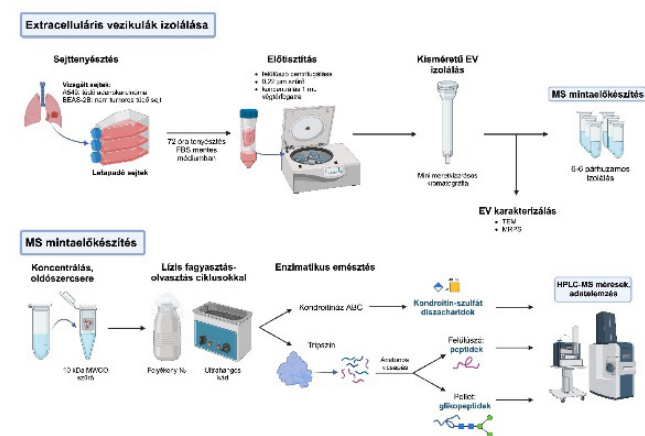
A glikoziláció szerekezetjellemezése elsősorban tömegspektrometria segítségével történik, mely lehetővé teszi összetett biológiai minták komponenseinek nagyhatékonyságú és érzékeny minőségi és mennyiségi meghatározását. A tömegspektrometriának fontos szerepe van többek között nagy

áteresztőképességű proteomikai vizsgálatokban, hiszen segítségével akár több ezer fehérje is meghatározhatóvá válik egyetlen mintából, segítve biológiai következtetések levonását vagy akár új gyógyszeres célpontok azonosítását. A TEV-kben jelen lévő szénhidrát láncok szerkezetéről azonban viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk, köszönhetően a glikánláncok szerkezeti összetettségének és az elemzésükkel kapcsolatos analitikai kihívásnak. A tüdőrák az egyik vezető daganatos megbetegedés. Tüdődaganatos betegekből vett szövetminták esetén már igazoltuk, hogy változások történnek a glikozilációban a daganatos és környező normál szövetrégiók között⁸⁻¹⁰. Kutatásaink hosszabb távú célja adott gyógyszeres kezelésben részesülő tüdődaganatos betegek plazmamintájából izolált TEV-ek glikozilációs mintázatának nyomkövetése, annak érdekében, hogy a terápiás választ előrejelezhessük.

2. Eredmények

Jelenleg A549 tüdőadenokarcinóma és BEAS-2B normál bronchiális epitel eredetű sejtvonalakból izolálunk kisméretű EV-ket (sEV) és ezek glikozilációs profiljait hasonlítjuk össze, hogy megérthessük a tüdődaganat hátterében bekövetkező glikozilációs eltéréseket¹¹.

A munkafolyamatot az 1. ábra szemlélteti, sejtvonalanként 6-6 párhuzamosan izoláltunk sEV-ket. Az A549 sejteket 10 V/V % hő-inaktivált magzati marha szérumot (FBS), valamint 1 V/V% penicillin/sztreptomocint tartalmazó F12 médiumban, a BEAS-2B sejteket pedig bronchiális hámsejt növesztő médiumban (BEGM) tenyésztettük. A sEV-k izolálása előtt 72 órával a tenyésztő médiumokat FBS-mentesre cseréltük, majd a sejtek felülúszóit 50 ml-es Falcon-csővekbe gyűjtöttük, amelyeket 30 percig, 4 °C-on, 10000 g-n centrifugáltunk. Ezt követően a felülúszókat 0,22 µm-es bakteriális szűrőn leszűrtük, majd 1 ml-esre töményítettük.



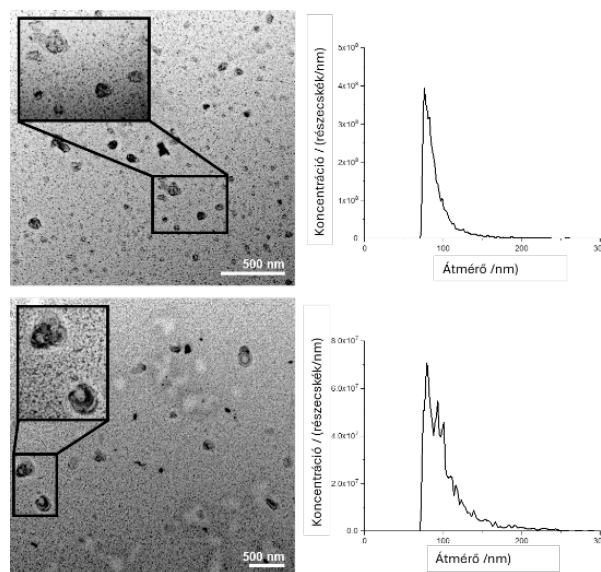
1. Ábra. A minta-előkészítési munkafolyamat

A sEV-ket házi készítésű mini méretkizárásos (SEC) oszlopon izoláltuk egy irodalmi protokollt követve¹².

Oldószercserét és töményítést követően a sejtek feltárása ismételt fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásával történt. A sEV minták egyik részét kondroitináz ABC enzimmel inkubáltuk, hogy a CS láncokat diszacharidokká hasítsuk. A minták egy másik részéhez pedig tripszin enzimet adtunk, hogy a mintában található fehérjéket peptidekké bontsuk. Az így nyert peptidkeverékből az *N*-glikozilált peptideket acetonos kicsapással dúsítottuk. Sómentesítést követően a CS diszacharidokat, peptideket és *N*-glikopeptideket nanoáramlásos ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriával (nanoUHPLC-MS/MS) vizsgáltuk.

2.1. Sejtvonalakból izolált sEV-k szerkezetjellemezése

Először TEM-mel megvizsgáltuk az izolált sEV-ek méretét és alakját, és MRPS-szel jellemeztük méretük eloszlását, az eredményeket a 2. ábra mutatja. A TEM-felvétel megerősítette a 200 nm-nél kisebb méretű gömb alakú részecskék jelenlétét. Az A549 mintákban általában kisebb részecskéket (30-120 nm) találtunk, mint a BEAS-2B mintákban (50-250 nm). Az MRPS-elemzés kissé alacsonyabb részecskeátmérőt jelzett, de az izolált részecskék méretét illetően ugyanaz a tendencia érvényesült, azaz a BEAS-2B sEV-kben nagyobb arányban találtunk nagyobb részecskéket, mint az A549 sEV-kben. Egy másik különbség a részecskekoncentrációban volt megfigyelhető, mivel az A549 mintákban lényegesen több volt a sEV.

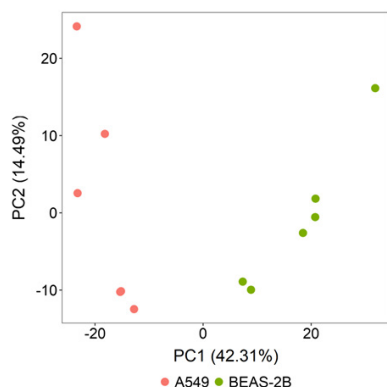


2. Ábra. A549 (felül) és BEAS-2B (alul) sejtekből izolált sEV-k szerkezetjellemezése

2.2. Proteomikai eredmények

Első lépésben elvégeztük a sEV minták átfogó proteomikai elemzését. Annak ellenére, hogy a sEV-k felülúszóból történő izolálása a sejtek 72 órás éheztetését követően történt, a minták tartalmaznak még magzati marha szérum fehérjéket szennyezőként. Ezért kontrollként megvizsgáltuk a sejtenyészteshez használt médium proteomikai profilját is 3-3

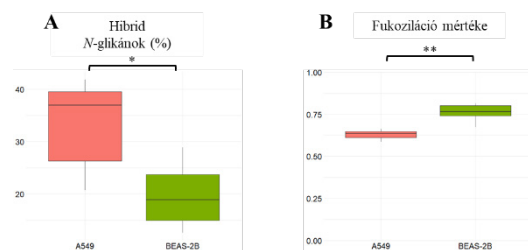
párhuzamosban. A kontroll mintában azonosított fehérjéket és azokat a fehérjéket, amiket nem azonosítottunk legalább a minták felében az adott mintacsoportban, nem vettük figyelembe a statisztikai elemzéskor. A sEV mintákban azonosított fehérjék között számos vezikulafehérje jelenlétét igazoltuk, pl. galektin-3-kötő fehérje, CD81. Főkomponens-analízis elemzés során a két mintacsoport jól elkünült egymástól, melyet a 3. ábra szemléltet. Összesen 408 fehérje mennyisége változott szignifikánsan az A549 és BEAS-2B sejtonalakból izolált sEV-k között, beleértve 7 proteoglikán vázfehérjét, például testikán-1 és szindekán-4.



3. Ábra. Főkomponens elemzés az A549 és BEAS-2B eredetű sEV mintákban azonosított fehérjék esetében

2.3. N-glikoproteomikai eredmények

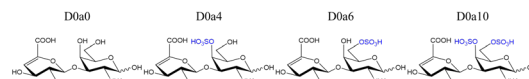
A munkafolyamat során alkalmazott glikopeptid dúsítási lépés célja az *N*-glikopeptidek részarányának növelése a mintákban. A proteomikai vizsgálat során ismertetett szűrési lépéseket követően 301 *N*-glikopeptiden végeztünk statisztikai elemzést, melyek 46 glikoprotein 103 *N*-glikozilációs helyéhez tartoznak. Főkomponens-analízis elemzés során azt tapasztaltuk, hogy jelentősek a különbségek a daganatos és normál sejtekből izolált sEV-k glikozilációjában, hiszen a két csoport elválik egymástól. Mindkét mintacsoportban a komplex *N*-glikánok domináltak, azonban a hibrid *N*-glikánok aránya szignifikánsan magasabb volt a tumor-eredetű sEV-ekben (4/A ábra). Egy további különbség a fukoziláció mértékének szignifikáns csökkenése az A549-eredetű sEV-ekben (4/B ábra).



4. Ábra. A hibrid *N*-glikánok mennyisége növekedett (4/A ábra), míg a fukoziláció mértéke csökkent (4/B ábra) az A549 sejtvonalból izolált sEV-ben

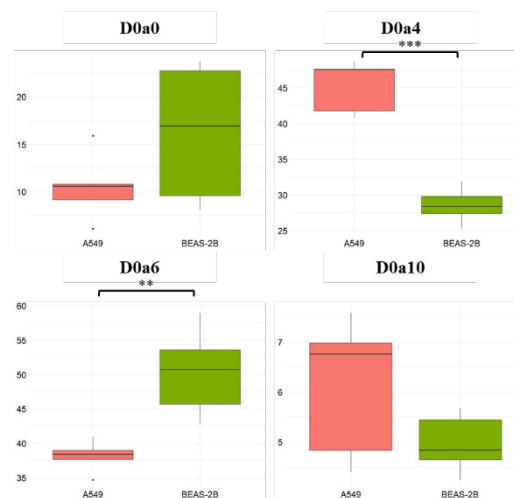
2.4. Kondroitin-szulfát diszacharid vizsgálat eredményei

A CS diszacharidok folyadékkromatográfiás elválasztása saját töltésű kapilláris oszlopokon történt a csoportban korábban kifejlesztett sógrádiens módszerrel¹³, detektálásuk pedig tömegspektrometriával negatív ionizációs módban. A vizsgált CS diszacharidok szerkezetét az 5. ábra tartalmazza. A pozicionális izomerek megkülönböztetésére tandem tömegspektrometriát használtunk.



5. Ábra. A vizsgált CS diszacharidok szerkezete

Az egyes diszacharidok relatív mennyiségének tekintetében is megfigyelhetők voltak változások a tumoros és nem-tumoros sejtvonalakból izolált sEV-ben. A nem-szulfatált D0a0 és az egyszeresen 6S szulfatált D0a6 csökkent, míg az egyszeresen 4S szulfatált D0a4 és a kétszeresen szulfatált D0a10 aránya nőtt az A549-ből izolált sEV-ben. Átlagosan 3,4-szer több CS/DS diszacharidot detektáltunk a tumor-eredetű EV-ben. Főkomponens-analízis vizsgálat során jól megkülönböztethető volt a két mintatípus a CS diszacharid profil alapján.



6. Ábra. A vizsgált CS diszacharidok relatív mennyisége az A549 és BEAS-2B eredetű sEV-ben

3. Összefoglalás

Eredményeink új információkat nyújtanak az A549 tüdő adenokarcinóma és a BEAS-2B nem tumoros sejtvonalakból származó sEV-k proteomikai, *N*-glikoproteomikai és CS GAG-profiljairól. Míg a sEV-ek proteomikai jellemzéséről sok irodalmi adat áll rendelkezésre, a glikozilációs és GAG-profilok továbbra is kevésbé feltártak. Az eredmények azt mutatják, hogy mindhárom elemzett profil nagymértékben tükrözi a sEV eredetét, mivel a hierarchikus klaszterezés és a főkomponens analízis következetesen megkülönbözteti a rákból származó sEV-eket a nem rákos sEV-ektől. A pro-

teomika számos CS proteoglikán, például a tesztikán-1 és a szindekán-4 jelentős diszregulációját mutatta ki, amelyek olyan folyamatokban vesznek részt, mint a sejtadhézió, a migráció és a tumorprogresszió. Az N-glikoproteomikai elemzés során a fukoziláció és a komplex glikánok arányának csökkenését figyeltük meg az A549 sEV-kben. Ez a mintázat ellentétben áll a sejtszinten általánosságban megfigyelt változásokkal, ami szelektív glikánszelekcióra utal a sEV-kben. A CS/DS-elemzés a rákos sEV-kben a teljes CS/DS-diszacharidtartalom 3,4-szeres növekedését mutatta ki, amelyet megváltozott 6S/4S arány kísért. Ez a megváltozott szulfatációs mintázat módosíthatja a sEV-nek a tumor mikro környezetében lévő receptorokkal való kölcsönhatását. Összefoglalva, tanulmányunk rávilágít a rákos és nem rákos sejtekből származó sEV-ek közötti jelentős proteomikai és glikozilációs különbségekre, hangsúlyozva e molekuláris mintázatok diagnosztikai markerként való felhasználásának lehetőségét. A betegek plazmájából izolált TEV-ken végzett jövőbeli vizsgálatok validálhatják ezeket az eredményeket, és lehetővé tehetik klinikai alkalmazásukat.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a bemutatott eredményekben való hozzájárulásukért Kollégáimnak az alábbi kutatócsoportokból: MTA-HUN-REN TTK Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport (*Balbisi Mirjam Horváth Virág, Pál Domonkos*), HUN-REN TTK Molekuláris és Élettudományi Intézet (*Langó Tamás, Nagy Nikolett, Tóth Otília, Vértessy Beáta*), HUN-REN TTK Anyag- és Környezatkémiai Intézet (*Ilyés Kinga, Varga Zoltán*), MTA-ELTE Lendület Ionmobilitás Tömegspektrometria Kutatócsoport (*Schlosser Gitta*), Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézet (*Kecskeméti Gábor, Szabó Zoltán*), Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet (*Visinovitz Tamás*).

A kutatás a Magyar Tudományos Akadémia Lendület pályázatának keretében valósult meg.

Hivatkozások

1. Turiák, L; Misják, P; Szabó, G, T; Aradi, B; Pálóczi, K; Ozohanics, O; Drahos, L; Kittel, Á; Falus, A; Buzás, E, I; Vékey, K. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics*. **2011**, *74*. 2025-2033. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.023>
2. Welsh J,A; Goberdhan D, C, I; O'Driscoll, L, Buzas, E, I; Blenkiron, C; Bussolati, B; Cai, H; Di Vizio, D; Driedonks, T, A, P; Erdbrügger, U; Falcon-Perez, J, M; Fu, Q, L; Hill, A, F; Lenassi, M; Lim, S,K; Mahoney, M, G; Mohanty, S; Möller, A; Nieuwland, R; Ochiya, T; Sahoo, S; Torrecillas, A, C; Zheng, L; Zijlstra, A; Abuelreich, S; Bagabas, R; Bergese, P; Bridges, E, M; Brucale, M; Burger, D; Carney, R, P; Cocucci, E; Crescitelli, R; Hanser, E; Harris, A, L; Haughey, N, J; Hendrix, A; Ivanov, A, R; Jovanovic-Talisman, T; Kruh-Garcia, N, A; Ku'ulei-Lyn Faustino, V; Kyburz, D; Lässer, C; Lennon, K, M; Lötvall, J; Maddox, A, L; Martens-Uzunova, E, S; Mizenko, R, R; Newman, L, A; Ridolfi, A; Rohde, E; Rojalin, T; Rowland, A; Saftics, A; Sandau, U, S; Saugstad, J, A; Shekari, F; Swift, S; Ter-Ovanesyan, D; Tosar, J, P; Useckaite, Z; Valle, F; Varga, Z; van der Pol, E; van Herwijnen, M, J, C; Wauben, M, H, M; Wehman, A, M; Williams, S; Zendri, A; Zimmerman, A, J. MISEV Consortium; Théry, C; Witwer, K,W. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. **2024**, *13*, e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
3. Y. Couch, Buzás, E, I; Di Vizio, D; Gho, Y,S; Harrison, p; Hill, A,F; Lötvall, J; Raposo, G; Stahl, P,D; Théry,C; Witwer, K.W.; Carter, D,R,F. A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. **2021**, *10*, e12144. <https://doi.org/10.1002/jev2.12144>
4. Ma, C., Jiang, F; Ma, Y. Isolation and Detection Technologies of Extracellular Vesicles and Application on Cancer Diagnostic. *Dose Response*. **2019**, *17*, 1559325819891004. <https://doi.org/10.1177/1559325819891004>
5. Yu, L., Zeng, X., Hu, X., Wen, Q; Chen, P. Advances and challenges in clinical applications of tumor cell-derived extracellular vesicles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2023**, *234*, 113704. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113704>
6. Li, Y; Wang, J; Chen, W; Lu, H. Comprehensive review of MS-based studies on N-glycoproteome and N-glycome of extracellular vesicles. *Proteomics*. **2023**, *24*. e2300065. <https://doi.org/10.1002/pmic.202300065>
7. Wang, Q; Chi, L. The Alterations and Roles of Glycosaminoglycans in Human Diseases. *Polymers*. **2022**, *14*, 5014. <https://doi.org/10.3390/polym14225014>
8. Pál, D; Tóth, G; Sugár, S; Fügedi, K, D; Szabó, D; Kovalszky, I; Papp, D; Schlosser, G; Tóth, C; Tornóczky, T; Drahos, L; Turiák, L. Compositional Analysis of Glycosaminoglycans in Different Lung Cancer Types-A Pilot Study. *Int J Mol Sci*. **2023**, *24*, 7050. <https://doi.org/10.3390/ijms24087050>
9. Balbisi, M; Sugár, S; Schlosser, G; Szeitz, B; Fillinger, J; Moldvay, J; Drahos, L; Szász, A,M; Tóth, G; Turiák, L. Inter- and intratumoral proteomics and glycosaminoglycan characterization of ALK rearranged lung adenocarcinoma tissues: a pilot study. *Sci Rep*. **2023**, *13*, 6268. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33435-1>

10. Sugár, S, N; Molnár, B,A, Bugyi, F; Kecskeméti, G; Szabó, Z; Laczó, I; Harkó, T; Moldvay, J; Turiák, L. Glycoproteomics Analysis of Triple Wild-Type Lung Adenocarcinoma Tissue Samples. *J Prot Res.* **2025**, *24*, 2419-2429. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c01063>
11. Balbisi, M; Langó, T; Horváth, V,N; Pál, D; Schlosser, G; Kecskeméti, G; Szabó, Z; Ilyés, K; Nagy, N; Tóth, O; Visnovitz, T; Varga, Z; Vértessy, B,G; Turiák, L. A549 tumorigenic and BEAS-2B non-tumorigenic cell line derived small extracellular vesicles show distinct proteomic, glycoproteomic and chondroitin/dermatan sulfate profiles. **2025**, *bioRxiv*. doi:10.1101/2025.03.13.643059. <https://doi.org/10.1101/2025.03.13.643059>
12. Ludwig, N; Razzo, B, M; Yerneni, S, S; Whiteside, T. L. Optimization of cell culture conditions for exosome isolation using mini-size exclusion chromatography (mini-SEC). *Exp Cell Res.* **2019**, *378*, 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.03.014>
13. Tóth, G; Vékey, K; Sugár, S; Kovalszky, I; Draho, L; Turiák, L. Salt gradient chromatographic separation of chondroitin sulfate disaccharides. *J Chrom A.* **2020**, *1619*, 460979. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460979>

Characterizing the glycosylation profiles of extracellular vesicles isolated from cell lines

Extracellular vesicles (EVs) are nanometer-sized membrane-bound particles released by cells into the extracellular space. They participate in intercellular signaling and EVs released by tumor cells have been found to play profound roles in the tumor microenvironment. Small EVs have a diameter smaller than 200 nm. Post-translational modifications (PTMs) of proteins present in EVs are challenging to analyze due to the relatively small sample amount available. Glycosylation is one of the most frequent PTMs and involves the attachment of diverse glycan chains to proteins or lipids. It is known to be heavily involved in various signaling events. During *N*-glycosylation the glycans are attached to asparagine residues within the consensus sequence (NXS/T, where X= any amino acid except proline). Mammalian *N*-glycans share a common pentasaccharide core, and based on further elongation can be divided into three classes: oligomannose, complex and hybrid. Proteglycans, a class of glycoproteins contain long linear polysaccharides, glycosaminoglycans (GAGs) composed of repeating disaccharides. The chondroitin sulfate (CS) GAG class consists of glucuronic acid and *N*-acetylgalactosamine units, with variable levels of sulfation influencing binding of signaling molecules.

Aberrant glycosylation has been described in several diseases including cancer. Although there are ample examples in the literature describing alterations occurring at the proteomic level in small EVs in cancer, their glycosylation profiles are still underexplored. Our long term goal is to explore the glycosylation profiles of tumor-derived EVs isolated from the plasma of lung cancer patients as predictive biomarkers. As a first step we performed the in-depth characterization of *N*-glycosylation and CS profiles of small EVs isolated from the A549 lung adenocarcinoma and the BEAS-2B non-tumorigenic cell line. We used nanoflow ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the structural analysis of these glycosylation features. The tumor-cell derived and non-tumor cell-derived small EVs could be differentiated from each other based on their proteomic, *N*-glycosylation and CS GAG profiles using principal component analysis. This highlights the utility of monitoring alterations at the glycosylation level e.g. in the case of diagnostic applications.