Analiza N-glikoma IgG u serumu štakora

Car, Iris

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:434655

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski studij

Biotehnologija u medicini

Iris Car

Analiza N-glikoma IgG u serumu štakora

Diplomski rad

Rijeka, 2019

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski studij

Biotehnologija u medicini

Iris Car

Analiza N-glikoma IgG u serumu štakora

Diplomski rad

Rijeka, 2019

Mentor: izv.prof.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Master’s program

Biotechnology in medicine

Iris Car

Analysis of the rat serum IgG N-glycome

Master’s thesis

Rijeka, 2019

Ovaj diplomski rad obranjen je 16. siječnja 2018. godine pred komisijom u sastavu:

Prof.dr.sc. Đuro Josić

Izv.prof.dr.sc. Dean Marković

Izv.prof.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić

Ovaj diplomski rad ima 67 stranica, 21 sliku, 6 tablica te 58 referenci.

Zahvala

Željela bih se zahvaliti mentorici izv.prof.dr.sc. Sandri Kraljević Pavelić što mi je pružila mogućnost izrade rada tijekom koje sam stekla mnoga znanja te na strpljenju i savjetima koje mi je dala. Veliku zahvalu želim uputiti prof.dr.sc. Đuri Josiću što mi je omogućio izradu dijela diplomskog rada u Laboratoriju za proteomiku i analitičku biotehnologiju.

Dr.sc. Tamari Martinović želim zahvaliti na iznimnoj pomoći, savjetima, strpljenju i ohrabrivanju tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada. Dr.sc. Urošu Anđelkoviću, Mariji i Silviji želim zahvaliti na savjetima i svakojakim raspravama tijekom rada u laboratoriju.

Mojim prijateljima, a posebno Patriku, želim zahvaliti što su me ohrabrivali tijekom izrade diplomskog rada!

Sažetak

Imunoglobulin gama (IgG) je najzastupljenije protutijelo u serumu. Njegove imunološke funkcije regulirane su posttranslacijskim modifikacijama glikozilacijama. N-glikozilacije IgG se odnose na šećerne skupine vezane za IgG preko aminokiseline asparagin na poziciji 297 u polipeptidnom lancu. Šećerne skupine fukoza, galaktoza ili sijalinska kiselina važne su za regulaciju protuupalnih ili proupalnih svojstava IgG tako što utječu na vezanje regije Fc IgG na aktivirajuće ili inhibirajuće receptore Fc gama na imunološkim stanicama. Fiziološki status te stres mogu utjecati na N-glikozilaciju IgG zbog čega istraživanje profila N-glikoma može omogućiti otkriće novih biomarkera. Uz miševe, štakori su drugi najčešće korišteni modelni organizam u znanstvenim istraživanjima. Karakterizacija N-glikoma IgG zdravog štakora može se stoga koristiti u istraživanjima patogeneze bolesti ili za analize mehanizama djelovanja lijekova. Analiza N-glikoma je tehnički vrlo zahtjevna i ovisi o metodama za izolaciju, pročišćavanje i identifikaciju N-glikana. Izolacija IgG iz seruma štakora u ovom je radu provedena uz pomoć afinitetne visokoprotočne monolitne kromatografije. Prednost korištenja monolitnih kolona je u kraćem vremenu analize, većoj rezolucijite boljoj stabilnosti kolone pri većim tlakovima. Kao ligand za vezanje IgG je korišten imobilizirani protein L zbog visokog afiniteta za kapa lake lance IgG. Potvrda izolacije IgG provedena je uz pomoć MALDI-TOF masene spektrometrije (MS). U radu su također uspoređeni protokoli za tripsinsku digestiju u gelu iz literature s protokolom razvijenim na Odjelu za biotehnologiju, tzv. *in-house* protokol. Usporedba je pokazala da je s protokolom iz literature identifikacija IgG uz pomoć MALDI-TOF MS bila pouzdanija . Identifikacija N-glikana provedena je također uz pomoć MALDI TOF MS nakon derivatizacije glikana čime se omogućila identifikacija glikana koji sadrže ostatak α2,6-NeuAc.

Tehnička reproducibilnost identifikcije N-glikana u serumu štakora nije bila zadovoljavajuća te je protokol za pripremu uzorka potrebno dalje optimizirati.

Ključne riječi: imunoglobulin G, glikozilacija, afinitetna monolitna kromatografija, MALDI-TOF masena spektrometrija

Abstract

Immunoglobulin gamma is the most abundant antibody present in serum. Its functions are regulated by glycosylation which is a type of posttranslational protein modification. IgG N-glycosylation describes oligosaccharides linked to the polypeptide chain through the asparagine residue 297. Sugar moieties such as fucose, galactose or sialic acid mediate IgG's anti-inflammatory or pro-inflammatory properties by affecting the binding of the Fc region on IgG to activating or inhibitory Fc gamma receptors located on immune cells. Due to the fact that the physiological state and stress have a great impact on IgG N-glycosylation, research of N-glycome profiles can result with discovering novel biomarkers. After mice, rats are the second most used animal model in scientific research. Characterization of IgG N-glycome of a healthy rat can be compared to physiologically altered states such as disease, or it can be used to analyze drug mechanisms of action. N-glycome analyzes are technically very challenging and therefore strongly depend on implementing precise and sensitive methods for isolation, purification and identification of N linked glycans. In this thesis, isolation of IgG from rat serum was performed by affinity monolithic chromatography. Advantages of using monolithic columns include shorter time of analysis, narrower detection peak and, greater physical stability at higher pressures. Immobilized protein L was used as a ligand due to high affinity for IgG *kappa* light chains. Confirmation of IgG isolation was performed by MALDI-TOF mass spectrometry. A comparison between protocols for in-gel tryptic digestion was carried out wherein a protocol developed by Shevchenko et al.. was compared with an in-house protocol developed at the Department of Biotechnology. The comparison showed that the protocol developed Shevchenko et al. achieved more reliable results compared to the results obtained through the in-house developed protocol. N-glycan identification was performed using MALDI-TOF MS. Identification of glycans largely depends on the derivatization process. Derivatization protocols used in this thesis have not achieved the desired technical reproducibility for all samples and glycans from only two samples were successfully identified. In the future, better protocol optimization could identify the complete N-glycan profile of IgG.

Keywords: immunoglobulin G, glycosylation, affinity monolithic chromatography, MALDI-TOF mass spectrometry

Sadržaj

1 Uvod 1
1.1 Imunološki sustav štakora 1
1.2 Receptori IgG 4
1.3 Efektorske funkcije IgG 5
1.4 Glikozilacija imunoglobulina G 7
1.5 Terapijski značaj glikozilacija IgG 11
1.6 Metode analize glikozilacije imunoglobulina G 11
1.6.1 Afinitetna monolitna kromatografija 12
1.6.2 MALDI-TOF MS 15
2 Cilj rada 18
3 Materijali i metode 20
3.1 Eksperimentalne životinje 20
3.2 Afinitetna monolitna kromatografija 20
3.3 Kvatifikacija proteina 21
3.4 Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE, engl. sodium dodecyl suplhate- polyacrilamide gel electrophoresis) 21
3.5 Digestija u gelu 22
3.6 ZipTip pročišćavanje i ukoncentriranje uzorka 23
3.7 PNGase F digestija u gelu 23
3.8 Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama 24
3.9 MALDI TOF masena spektrometrija 24
3.9.1 Analiza imunoglobulina G 25
3.9.2 Analiza glikana 25
4 Rezultati 26

4.1 Izolacija imunoglobulina G iz seruma štakora 26
4.2 Validacija izolacije imunoglobulina G štakora 28
4.3 Validacija izolacije imunoglobulina G MALDI TOF MS 30
4.4 Glikozilacija imunoglobulina G štakora 44
5 Diskusija 51
6 Zaključak 56
7 Literatura 58
8 Popis slika 63
9 Popis tablica 66

1 Uvod

Istraživanje N-glikoma imunoglobulina G (IgG), odnosno šećernih skupina vezanih za asparagin na mjestu 297, danas predstavlja izvor novih potencijalnih biomarkera. Fiziološko stanje, spol, dob, stres i okolina utječu na stvaranje profila glikana, a promjene u strukturi glikana mogu ukazivati na čitav niz patologija pa tako i na razvoj tumora u organizmu. Zbog promjene okolišnih faktora i fiziološkog stanja, glikomski profili se kontinuirano mijenjaju te je stoga važno poznavati sastav N-glikoma zdravog organizma, odnosno odrediti njegove najbitnije karakteristike. Takav profil bi se mogao koristiti za usporedbe s profilom u bolesnim stanjima i za bolje razumijevanja djelovanja postojećih lijekova[1].

Uz različite modele miševa, štakori su najčešće korišteni modelni organizam u znanosti. Laboratorijski štakor koji se danas najčešće koristi uzgojen od smeđeg štakora, *Rattus norvegicus*, te su iz njega dobiveni modeli za proučavanje bolesti poput multiple skleroze ili reumatoidnog artritisa (RA)[2]. U znanstvenoj zajednici fokus je pretežno na istraživanjima bolesnog stanja organizma pa je za usporedbu potrebno poznavati zdravo stanje organizma. Stoga je cilj ovog rada bio doprinijeti boljem razumijevanju sastava N-glikoma zdravih štakora.

1.1 Imunološki sustav štakora

Imunološki sustav štakora sastoji se od urođenog i adaptivnog imunološkog sustava. Njihove zajedničke uloge su prepoznavanje infekcija u tijelu, obrana organizma od izvora infekcije te stvaranje i osiguravanje imunološkog pamćenja. Glavne efektorne komponente imunološkog sustava su leukociti, odnosno stanice ubojice (NK, engl. *natural killers*), monociti, makrofazi, granulociti (neutrofili, eozinofili, bazofili) i limfociti te tzv. cirkulirajuće tvari u tjelesnim tekućinama kao primjerice protutijela, bjelančevine komplementa i citokini. Primjerice, B i T limfociti su lokalizirani u limfnim čvorovima, te se kod infekcije, B i T limfociti

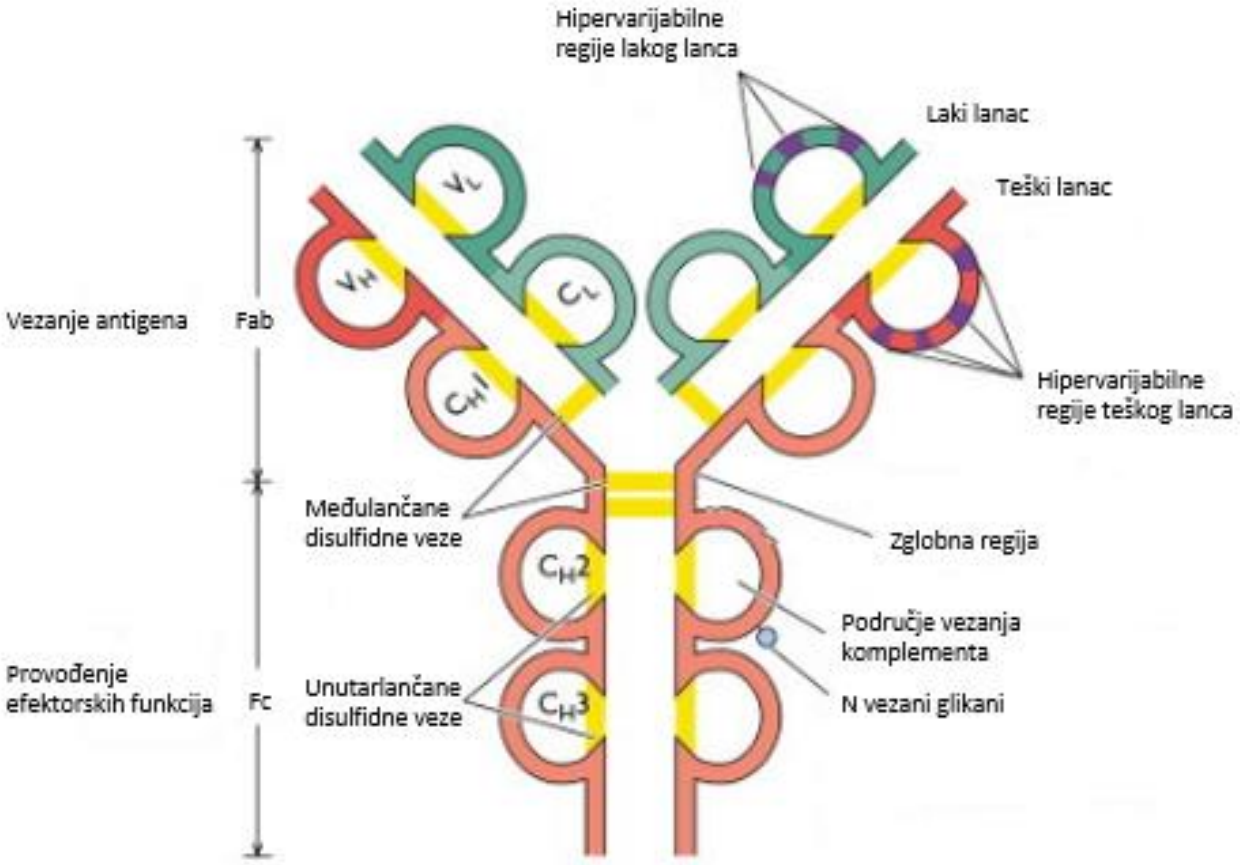
aktiviraju, međusobno surađuju te se B stanica aktivira i diferencira u plazma stanice. Plazma stanice izlučuju imunoglobuline (Ig), glikoproteine koji su visoko specijalizirani za prepoznavanje antigena[3].

Ig čine dvije vrste polipeptidnih lanaca, laki i teški, te svaki Ig sadrži dva laka i dva teška lanca međusobno povezana disulfidnim vezama. Ig štakora se mogu podijeliti u pet klasa ili izotipova na temelju vrste teških lanaca: IgG, IgA, IgE, IgD i IgM. IgG se dalje može podijeliti u četiri podskupine: IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG2c[4], a molekulska težina teškog lanca iznosi 50 kDa. U tablici 1 nalaze se serumske koncentracije pojedinih izotipova i podskupina izotipova Ig štakora. Laki lanci imaju molekulsku težinu od 25 kDa, a postoje lanci lambda (λ) i kapa (κ)[3]. U jednom Ig je moguće pronaći isključivo jedan tip lakog lanca, a omjer κ:λ kod štakora iznosi 99:1[5].

Tablica 1. Koncentracija (mg/ml) izotipova imunoglobulina u serumu štakora u normalnim uvjetima. Preuzeto s www.labome.com/method/Rat_Antibody

	Koncentracija (mg/ml)
IgA	0,05
IgD	0,008
IgE	0,0001
IgG1	1,48
IgG2a	2,38
IgG2b	2,61
IgG2c	1,40
IgM	0,83

Digestijom Ig uz pomoć enzima papaina mogu se istražiti njihove funkcije. Papain naime cijepa Ig u zglobnoj regiji čime se odvajaju njegove dvije funkcionalne jedinice, jedne poznate kao Fc regija (engl. *fragment crystallizable*) i dvije Fab regije (engl. *fragment antibody binding*)[3]. Fab regija sudjeluje u prepoznavanju antigena, a Fc regija stupa u interakciju s Fc gama receptorima[6]. Zglobna regija koja povezuje te funkcionalne jedinice svojom duljinom i aminokiselinskim sastavom utječe na fleksibilnost proteina[7]. Na slici 1 prikazana je struktura Ig.



Slika 1. Prikaz strukture imunoglobulina, izrađeno prema izvoru www.microbiologyinfo.com, 21.12.2018.

1.2 Receptori IgG

Stanice na svojoj površini eksprimiraju Fcγ receptore tipa I koji se dijele u tri skupine: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) i FcγRIII (CD16). Njihova je uloga vezanje za Fc fragment IgG te pokretanje signalne transdukcije. Signalna transdukcija se kod FcγRI pokreće vezanjem monomernog IgG, a kod FcγRII i FcγRIII je potrebna je agregacija više molekula IgG[2].

Fcγ receptori su transmembranski glikoproteini tipa 1. Sastoje se od dvije do tri izvanstanične domene, jedne transmembranske i jedne citosolne domene. Signalna transdukcija aktivirajućih receptora kreće fosforilacijom imunoreceptor aktivirajućih motiva temeljenih na tirozinu (ITAM, engl. *immunoreceptor tyrosine-based activating motif*) uz pomoć obitelji kinaza SRC[6]. Inhibirajući FcγR djeluju preko svojih imunoreceptor inhibirajućih

motiva temeljenih na tirozinu (ITIM, engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) na B stanične receptore zbog čega se inhibira stvaranje protutijela[8]. Fosforilacijom ITIM motiva pomoću obitelji kinaza SRC se stvara vezujuće mjesto za Src homologne 2 domene koje sadrže tirozin fosfataze-1 (SHP-1, engl. *Src homology 2 containing tyrosine phosphatase-1*)[9]. Djelovanjem SHP-1 se prekida signalizacija B staničnim receptorom.

FcγRI je eksprimiran na mijeloidnim stanicama (makrofazi i antigen-prezentirajuće stanice - dendritske stanice) i na granulocitima. To je aktivirajući receptor za koji se veže monomerni IgG. IgG u kompleksu s antigenom se veže za FcγRI i endocitozom ulazi u stanicu nakon čega slijedi njegova degradacija[10].

FcγRIIb je inhibirajući receptor eksprimiran na B stanicama i plazma stanicama. Djeluje uz B stanični receptor gdje unakrsnim povezivanjem stvara inhibitorni signal i inhibira sintezu protutijela[11].

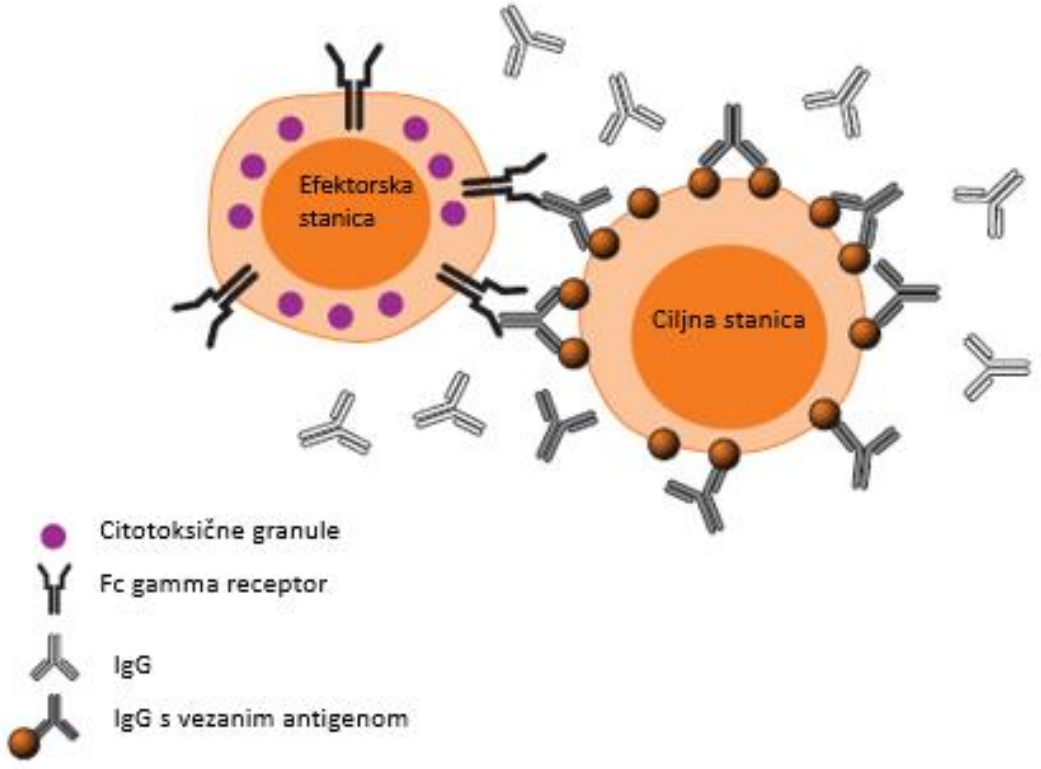
FcγRIII je aktivirajući receptor i postoji kao dvije izoforme, FcγRIIIa i FcγRIIIb. FcγRIIIb nije eksprimiran kod štakora[6]. FcγRIIIa je transmembranski protein eksprimiran na NK stanicama te sudjeluje u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima[12].

1.3 Efektorske funkcije IgG

IgG djeluje citotoksično na ciljne stanice u ovisnosti o protutijelima (ADCC, engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) i aktivacijom preko sustava komplementa. Ovi su procesi usko u vezi s glikozilacijama Fc regije i njezinom interakcijom s FcγR[6]. Mutiranjem područja glikozilacije ili uklanjanjem glikana uz pomoć glikozidaza može se naime, dokinuti interakcija Fc regije s FcγF[13].

ADCC je jedan od mehanizama obrane organizma koji je posredovan interakcijom IgG i FcγR. Ukratko, mehanizam uključuje efektorske stanice, protutijela i ciljne stanice obložene antigenima (slika 2). Efektorske

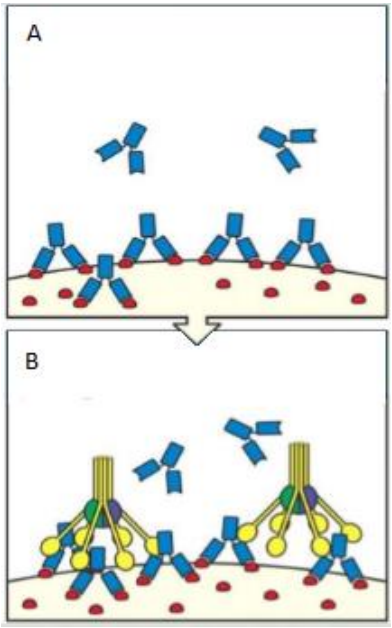
stanice na svojoj površini imaju eksprimirane FcγR uz pomoć kojih se vežu za Fc regije IgG koji je vezao antigen. Efektorske stanice potom ispuštaju enzime perforin i granzim te ubijaju ciljnu stanicu. Efektorske stanice su NK stanice, makrofazi ili granulociti (eozinofili, neutrofili, bazofili) i one na svojoj površini eksprimiraju FcγR. Glavnim receptorom u posredovanju ADCC smatra se FcγRIIIa koji je najviše eksprimiran na NK stanicama[13].



Slika 2 Prikaz stanične citotoksičnosti posredovane protutijelima. Gómez Román VR, Murray JC, Weiner LM. Chapter 1 - Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). In: Ackerman ME, Nimmerjahn F (eds). Antibody Fc. Academic Press: Boston, 2014, pp 1–27.

Sustav komplementa je kaskadni obrambeni mehanizam koji se može aktivirati na tri načina: klasičnim putem, lektinskim putem i alternativnim putem. Klasični put u ovisnosti je o protutijelu i započinje interakcijom antigena stanične membrane ili receptora sa imunoglobulinima, odnosno vezanjem C1q komponente komplementa za Fc regiju IgG koji je vezao antigene na površini patogena[11]. C1q uz serinske proteaze C1r i C1s čini C1 kompleks koji kaskadno aktivira stvaranje kompleksa koji u membranama patogena stvara pore[3]. Na vezanje C1q komponente za IgG

ili IgM, za koju se preferencijalno vežu galaktozilirani Ig, utječe CH2 područje na kojem se nalaze N vezani glikani i struktura zglobne regije. Na slici 3 se može vidjeti shematski prikaz interakcije IgG i C1 komponente komplementa. Lektinski put komplementa ne iziskuje postojanje protutijela, a aktivacija počinje spajanjem serumskog lektina koji veže manozu (MBL, engl. *mannose-binding lectin*) s manozom i Fc glikanima koji ne sadrže sijalinsku kiselinu[3] ili galaktozu[14].

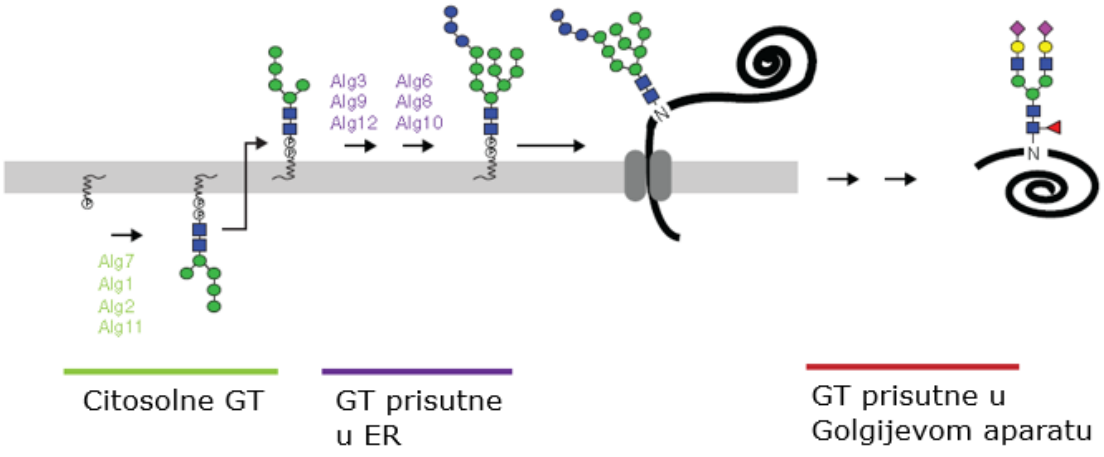


Slika 3. A) prikaz vezanja IgG za antigene na površini patogena (npr. mikroorganizama). B) vezanje C1 komponente komplementa za kompleks IgG:antigen.

1.4 Glikozilacija imunoglobulina G

IgG ima evolucijski očuvano mjesto glikozilacije asparagin 297 (N297) koje se nalazi između CH2 i CH3 domena teškog lanca[11]. Glikani koji se ondje nalaze utječu na konformaciju i funkciju IgG[6]. Proces glikozilacije IgG u organizmu prikazan je shematski na slici 4. U prvom koraku, glikoziltransferaze izgrađuju oligosaharid koji je vezan za lipidnu splav. U drugom koraku, lipidna splav prelazi iz citosolnog područja u lumen endoplazmatskog retikuluma (ER). Proteini koji imaju očuvani slijed asparagin – X serin/treonin (N – X – S/T) će biti primatelji oligosaharida.

Takav redoslijed aminokiselina u polipeptidnom lancu primatelja utječe na veću nukleofilnost amidne skupine asparagina. X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina. U završnom koraku, oligosahariltransferaze kataliziraju prijenos cjelokupnog glikana na primatelja[15]. Glikan se u tom stadiju sastoji od dva N-acetilglukozaminska, devet manoznih i tri glukozna ostatka (Glc3-Man9-GlcNAc2)[11]. Krajnji ostaci glukoze i manoze, uz lektinske receptore, sudjeluju u pravilnom smatanju proteina[14] te se stoga pretpostavlja da je to glavni razlog zbog kojeg je slijed Glc3-Man9-GlcNAc2 evolucijski očuvan[16]. IgG s početnim glikanom odlazi u Golgijev aparat gdje glikozilhidrolaze i glikoziltransferaze obrađuju početni glikan te se kao osnova glikana dobije pentasaharidna jezgra Man3-GlcNAc2[17].

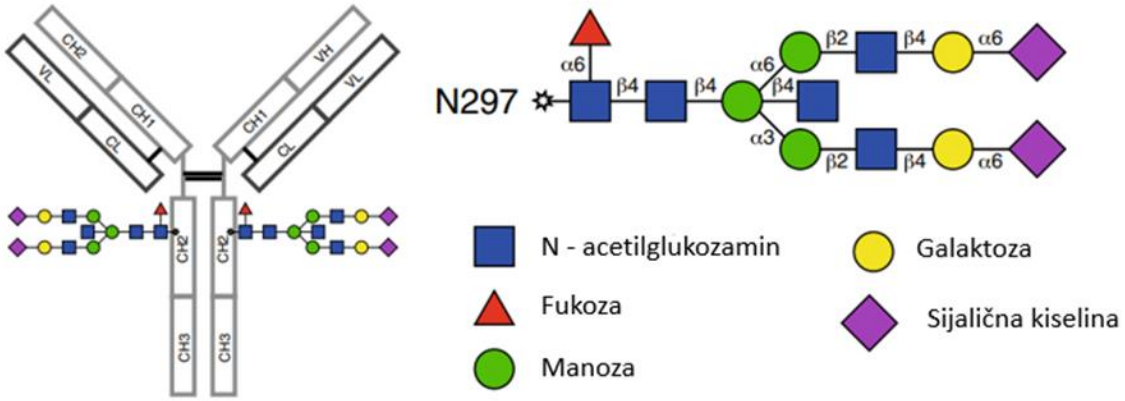


Slika 4 Prikaz glikozilacije proteina uz pomoć glikoziltransferaza (GT) u citosolu, ER i Golgijevom aparatu. Preuzeto iz Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. Curr Opin Struct Biol 2011; 21: 576–582.

Moguće modifikacije početnog glikana uključuju dodavanje fukoznih, galaktoznih i sijalinskih grupa pomoću fukoziltransferaza, galaktoziltransferaza i sijaliltransferaza[18].

Dob, spol, fiziološko stanje, metaboliti i stres aktivno utječu na izgradnju finalne strukture glikana i prema tome, mogu utjecati na interakcije Fc regije s pripadajućim receptorima[14]. Razlike u strukturi glikana utječu na brojne biološke procese kao što su upalni procesi i stanična signalizacija[1].

Pregledom literature, može se ustvrditi kako je 85% glikana fukozilirano, ali da je u odnosu na to dodavanje galaktoznih ostataka rjeđe pa samo 40% glikana sadrži jedan galaktozni ostatak (G1), a dva (G2) ili niti jedan ostatak (G0) sadrži 20–40% glikana. Na to velik utjecaj imaju spol i dob. Najrjeđa modifikacija je dodatak sijalinske kiseline (NeuAc) pa samo 5–10% serumskih glikana ima jednu sijalinsku kiselinu (S1), a manje od 1% ima dvije sijalinske kiseline (S2). Prikaz strukture N-vezanog glikana se može vidjeti na slici 5. Antigen vezujuća domena IgG je glikozilirana u samo 15–20% serumskih IgG. Pretpostavka je da glikani Fab regije utječu na jačinu vezanja protutijela i antigena[11].

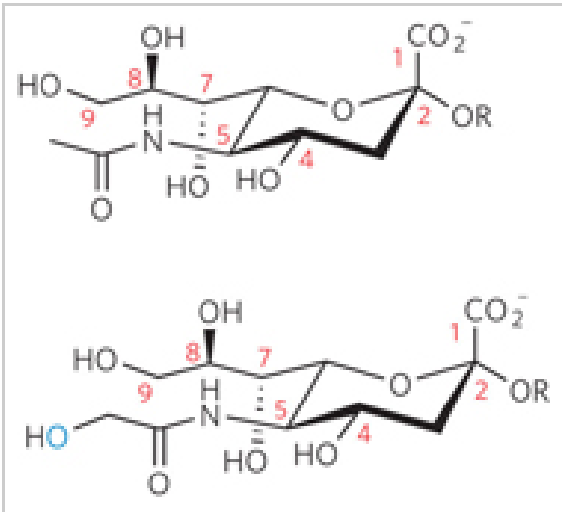


Slika 5 Prikaz strukture N-glikana. Quast I, Peschke B, Lünemann JD. Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. Cell Mol Life Sci 2017; **74**: 837–847.

Dodatak fukoze na IgG utječe na njegovo vezanje za FcγRIII na način da smanjuje staničnu citotoksičnosti ovisnu o protutijelima[11]. U studiji koju je izradio Sakae i sur.[19] zaključeno je kako položaj fukoze u glikanu ometa interakcije između IgG i receptora FcγRIIIa te tako ometa ADCC. Uz fukozu, je istraženo i djelovanje galaktoznih ostataka na ADCC i zaključeno je kako je utjecaj minimalan u odnosu na afukozilirane IgG[20]. S druge strane, galaktozni ostaci imaju drugačiji utjecaj na IgG. Galaktozilacija IgG je u *in vitro* testovima pokazala pojačano vezanje IgG i C1q komponente komplementa[21]. Smanjena galaktozilacija je primijećena

kod pacijenata koji boluju od kroničnih upalnih bolesti kao što su multipla skleroza, astma ili RA[22]. Privremeno povećanje stupnja galaktozilacije se dogodi u trudnoći te je bilo pokazano da u tijeku trudnoće pacijentice s RA ulaze u remisiju što ukazuje na protuupalnu funkciju galaktoze[11]. Povećani stupanj galaktozilacije je utvrđen i nakon cijepljenja pa je zbog toga moguće koristiti stupanj galaktozilacije kao biomarker imunološke aktivacije[23]. Galaktozni ostaci također daju osnovu na koju se veže sijalinska kiselina. Sijalinska kiselina kao i galaktoza ima protuupalni učinak. Zbog utjecaja na konformaciju polipetidnog lanca u svojoj blizini, sijalinska kiselina djeluje na interakcije IgG, poglavito na interakcije s inhibitornim FcγRIIb te sa C1q komponentom komplementa[11], djelujući protuupalno [6]. U studiji grupe Harre i sur. ukazano je na utjecaj smanjene razine sijalilacije IgG i gubitka koštane mase kod pacijenata s RA[24].

Kod štakora sijalinska kiselina dolazi u dva oblika, N-acetilneuraminska kiselina (NeuAc) i N-glikolilneuraminska kiselina (NeuGc). Razlika između ovih formi je što NeuGc sadrži jedan kisik više nego NeuAc oblik (slika 6).



Slika 6. Prikaz sijalinskih kiselina NeuAc (gore) i NeuGc (dolje). Plavom bojom je označen kisik koji razlikuje te sijalinske kiseline. Varki, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. Nature 446, 1023-1029 (2007).

1.5 Terapijski značaj glikozilacija IgG

Postojeće terapije monoklonalnim protutijelima i intravenoznim imunoglobulinima (IVIG) moguće je poboljšati ciljanim izmjenama Fc glikozilacije. Primjerice, glikoinženjering protutijela anti-CD20, poznatijeg kao obinutuzumab, je dao protutijelo sa smanjenom razinom fukozilacije i povećanom razinom GlcNAc. Obinutuzumab se koristi u terapiji folikularnog limfoma i kronične limfocitne leukemije kod pacijenata koji nisu odgovarali na terapiju rituximabom odnosno fukoziliranim anti-CD20 protutijelom. Afukozilirani obinutuzumab ima viši afinitet za receptor FcγRIIIa[13] povezan s ADCC te na taj način pozitivno djeluje u terapiji tumora[11]. Nadalje, u studiji koju je izradio Lood i sur. se ispitivao EndoS, enzim koji cijepa glikan u području početnih GlcNAc šećernih ostataka. IgG s pocijepanim N-glikanom stvara manje imunoloških kompleksa te se smanjuje upala zbog interakcije IgG s Fcγ receptorima. Ova se spoznaja želi iskoristiti za stvaranje nove terapije za sistemski eritematozni lupus[25]. Slično, IVIG s visokim stupnjem sijalilacije (S4-IVIG) pokazuju značajan protuupalni učinak zbog interakcije s inhibitornim FcγRIIb[6]. Također, imaju smanjenu interakciju s C1q komponentom komplementa[11] i dužu retenciju u serumu[26].

1.6 Metode analize glikozilacije imunoglobulina G

U analizi glikozilacija IgG neophodno je koristiti metode visoke razlučivosti gdje će se s velikom sigurnošću moći analizirati N-glikom. Osobito su u tu svrhu dobre metode visokoprotočne tekućinske kromatografije (HPLC) s različitim kolonama u kombinaciji s masenim spektrometrima (MS)[27,28], primjerice s afinitetnim monolitnim kolonama[29] u sprezi s metodom masene spektrometrije (MS) kao što je matricom potpomognuta laserska ionizacija/desorpcija s analizatorom vremena preleta (MALDI-TOF, engl. *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight*)[30]. Za određivanje točne sekvence glikana IgG potrebno je koristiti MS, primjerice MALDI-TOF/TOF MS[31].

Glikozilaciju IgG moguće je istraživati kao glikozilacijski obrazac glikoproteina stanice, tkiva ili plazme, kao okarakteriziran ciljani glikopeptid ili analizom strukture enzimski oslobođenih glikana stanice, tkiva ili plazme. U ovom radu karakterizacija je provedena za enzimski oslobođene N-glikane te je stoga bilo potrebno optimizirati protokole za izolaciju IgG iz kompleksnog i proteinima bogatog seruma. Enzim peptidna N-glikozidaza F (PNGaza F) koristio se za kidanje veza između početnog šećera GlcNAc i asparaginskog ostatka[31]. Provedena je i optimizacija protokola za pročišćavanje IgG i MALDI-TOF masenu spektrometriju uz pomoć tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (HILIC, engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*).

1.6.1 Afinitetna monolitna kromatografija

Analiza N-glikoma IgG štakora može se provesti nakon izolacije IgG od ostalih proteina iz seruma. U tu svrhu dobre rezultate daje metoda afinitetne monolitne kromatografije na HPLC uređaju koja koristi svojstva reverzibilnih i jakih interakcija između tvari imobiliziranih na stacionarnoj fazi i tvari od interesa koju želimo izolirati za daljnju analizu[32]. Ova metoda je široko primjenjiva pa se njome osim proteina mogu izolirati protutijela i enzimi[33] ili ju se može koristiti za istraživanje kinetike između proteina i njihovog interakcijskog partnera[34].

Tijek izolacije analita u afinitetnoj monolitnoj kromatografiji sastoji se od četiri koraka (slika 7). Uzorak u kojem se nalazi protein od interesa nanese se na kolonu u uvjetima koji omogućavaju da se on snažno veže za imobilizirane ligande. Te uvjete osigurava ekvilibracijski pufer odgovarajućeg sastava i pH vrijednosti u kojem je uzorak razrijeđen. Tvari u uzorku koje se nisu vezale dovoljno snažno će biti isprane s puferom za ispiranje koji ima višu koncentraciju soli u sebi. Potom se propušta elucijski pufer koji zbog svojeg sastava i pH vrijednosti niže od ekvilibracijskog pufera omogućava otpuštanje tvari od interesa s kolone. Općenito, elucijski puferi, u odnosu na ekvilibracijski pufer, mogu imati

različitu pH vrijednost, polarnost ili ionsku snagu. Regeneracija kolone se postiže ponovnim propuštanjem ekvilibracijskog pufera. Ako su imobilizirani ligandi proteini, ekvilibracijski pufer obično ima pH vrijednost oko 7,5 čime se postiže njihovo vraćanje u početno stanje i moguće je nanošenje idućeg uzorka[32].



Slika 7. Grafički prikaz afinitetne kromatografije izrađen prema https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/affinity-chromatography/troubleshooting.html

Stacionarne faze sadrže ugljikohidrate jer tvore veće pore na koje se mogu imobilizirati druge tvari, imaju nisko nespecifično vezanje za mnoge biološke molekule i stabilne su u širem rasponu pH[32]. U afinitetnoj monolitnoj kromatografiji stacionarnu fazu čini monolit na koji je imobilizirana tvar pomoću koje možemo odvojiti protein od interesa iz cjelokupne smjese koju analiziramo. Monolitne kolone sadrže neprekinut porozni materijal nalik na kanale[35]. Kroz povijest, monolitne kolone su bile građene od poliuretanske pjene, sabijenih poliakrilamidnih gelova i drugih tvari. Zbog problema s kojima su se kolone suočavale, kao što su bubrenje uslijed nekompatibilnosti pufera ili nizak kapacitet uzorka, nisu uvijek bile kompatibilne s metodom HPLC[32].

Kompatibilnost je postignuta 90ih godina prošlog stoljeća kada su izrađeni prvi monoliti uz pomoć polimerizirajućih monomera u prisustvu porogenih

otapala. Veličina pora se mogla modificirati mijenjanjem omjera između porogenog otapala i monomera i mijenjanjem vrsta otapala i monomera. U usporedbi s drugim kolonama, monolitne kolone imaju niži povratni tlak i veću propustljivost analita[36]. U tablici 2 se može vidjeti usporedba svojstava monolitnih kolona i kolona s čestičnom stacionarnom fazom.

Tablica 2. Usporedba svojstava monolitnih kolona i kolona s čestičnom stacionarnom fazom.

	Monolitne kolone	Čestična stacionarna faza
Kraće vrijeme analize	Da	Ne
Niži povratni tlak	Da	Ne
Veća fizička stabilnost	Da	Ne
Uži detekcijski pik	Da	Ne
Veća površina	Ne	Da
Veća propusnost	Da	Ne

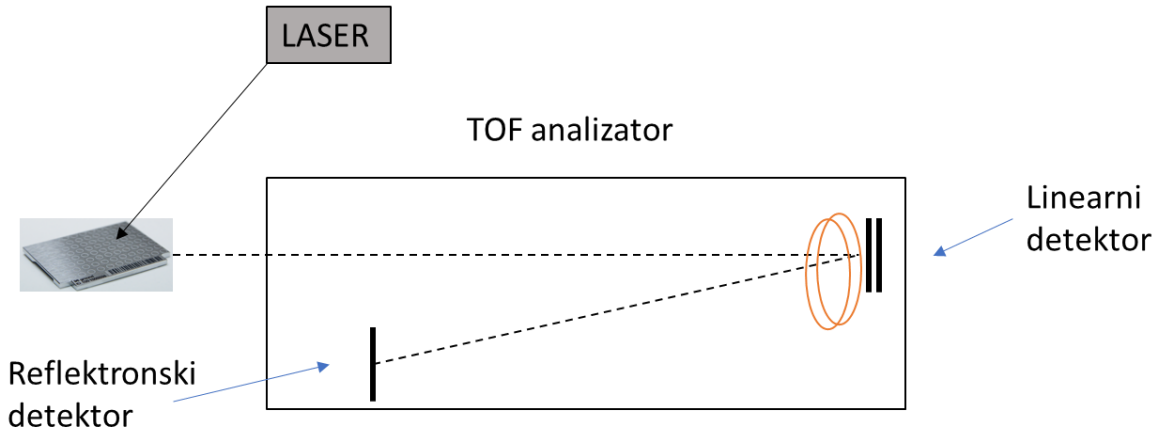
Dobra monolitna kolona za pročišćavanje IgG primjerice je izrađena od ko-polimera glicidil metakrilata (GMA, engl. *glycidyl methacrylate*) i etilen dimetilakrilata (EDMA, engl. *ethylene dimethacrylate*). Najčešći porogeni koji se koriste u proizvodnji GMA/EDMA kolona su 1-dodekanol i cikloheksanol uz termalne i fotoinicijatore[37]. Prednost ove kolone je hidrofilna površina kanala koja ima nisko nespecifično vezanje raznih bioloških molekula[38]. Unatoč širokim mogućnostima manipuliranja veličina kanala njihova je površina manja u usporedbi s drugim monolitnim i nemonolitnim kolonama pa se zbog toga može vezati manja količina afinitetnih liganda[32]. Afinitetni ligand u ovakvoj koloni za pročišćavanje IgG može biti protein L koji se imobilizira na kolonu putem epoksi metode. Protein L je izoliran iz bakterije *Peptostreptococcus magnus*[39] te veže

imunoglobuline isključivo za njihov kapa laki lanac. Kao što je već spomenuto, omjer kapa i lambda lanaca u IgG štakora iznosi 99:1 te ovako možemo postići visok stupanj izolacije IgG iz seruma. Epoksi metodom se još mogu vezati i protein G i A koji također vežu Fc fragmente imunoglobulina[40].

1.6.2 MALDI-TOF MS

MS je u današnje vrijeme osnovna metoda u analizi posttranslacijskih modifikacija kao što je N-glikozilacija proteina. Profiliranje glikoformi, raznovrsnih monosaharidnih struktura, veza i poretka, koje sačinjavaju N-glikom zahtjeva korištenje preciznih i osjetljivih metoda. MALDI-TOF MS daje vezu između glikanskog sastava i masa glikoformi[31]. Problemi koji se pojavljuju pri analizi glikana, poglavito sijalinske kiseline, je nizak stupanj ionizacije te njihova labilna i hidrofilna priroda zbog čega ih je potrebno stabilizirati prije analize[30].

Kod MALDI-TOF MS (slika 8) analit se na ploču nanosi u smjesi s matricom. U trenutku djelovanja lasera, matrica daje analitu naboj te on prelazi u plinovito stanje. Nabijeni analit ulazi u analizator masa pod vakuumom gdje se, u slučaju TOF analizatora, na detektoru mjeri vrijeme preleta. Zbog razlike u omjeru masa i naboja (m/z) teži analit putuje sporije od lakšega do detektora. Kako bi rezolucija bila veća i detekcija uspješnija koristi se reflektronski TOF analizator. Ovaj tip analizatora omogućuje povećanje puta kojeg analit mora preletjeti tako što visokom voltažom odbija analit u smjeru reflektronskog detektora. Dulji put preleta osigurava da se mase sličnijih vrijednosti bolje razdvoje i na spektru masa prikažu kao jasno razdvojeni pikovi[41].



Slika 8. Shematski prikaz MALDI-TOF MS. Na slici je vidljiv laser koji djeluje na ploču s kristaliziranim uzorkom i matricom. Nabijeni analit putuje u TOF analizatoru gdje ga elektrode djelovanjem visoke voltaže (prikazano žuto) odbijaju prema reflektronskom detektoru.

Budući da je MS metoda visoke osjetljivosti, analit se prije nanošenja na ploču mora pročistiti te koncentrirati. Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC) je metoda koja nudi zadovoljavajuće rezultate pročišćavanja hidrofilnih glikana od peptida bez stvaranja pozadinskog šuma u MS analizi[42].

U ionizaciji glikana su pogodne kako elektrosprej ionizacija (ESI, engl. *electrospray ionization*) tako i MALDI ionizacija. Obje su metode neinvazivne, međutim, MALDI zbog svoji karakteristika nudi određene prednosti. Moguća višestruka mjerenja jednog uzorka, brz rad pogodan visokoprotočnim analizama te relativno jednostavna interpretacija dobivenog masenog spektra prednosti su zbog čega se MALDI ionizacija češće koristi[30]. Pažnju je potrebno obratiti i na odabir matrica. Kao što je već spomenuto, glikani su nestabilne strukture i neophodno ih je stabilizirati prije analize. Analiza glikana se može vršiti u pozitivnom reflektronskom načinu rada i zbog toga se odabire matrica koja će dati pozitivan naboj, primjerice 2,5-dihidrobenzoična kiselina (DHB) pripremljena s natrijevim hidroksidom[43]. Neutralni glikani dobivaju pozitivan naboj kroz $[M+Na^+]$ adukt[31]. Zbog prisutnosti sijalinske kiseline, dodatan korak u pripremi uzoraka za masenu spektrometriju je derivatizacija 2,6-NeuAc i 2,3-NeuAc[17]. Prema radu skupine Reiding i sur.

može se primijeniti metoda esterifikacije veza reagensom koji se temelji na karbodiimidu i etanolu. Rezultat je esterificirana 2,6-NeuAc s molekulskom masom od 319,13 Da i laktonizirana 2,3-NeuAc s molekulskom masom od 273,08 Da. Nederivatizirana sijalinska kiselina ima molekulsku masu od 291,1 Da neovisno o tipu veze i to otežava identifikaciju glikana u masenom spektru[44].

2 Cilj rada

U osnovi ovog diplomskog rada su dosadašnje spoznaje o posttranslacijskim modifikacijama proteina za koje je utvrđeno kako značajno utječu na komunikaciju proteina s drugim biološki relevantnim molekulama u organizmu, odnosno na njihovu biološku ulogu. Česta posttranslacijska modifikacija proteina je glikozilacija, tj. dodatak šećera na proteinsku osnovu[1]. Glikozilacija IgG, molekule koja je analizirana u ovom radu, utječe na njegovu strukturu, komunikaciju s pripadajućim receptorima i ukazuje na trenutno fiziološko stanje organizma[45]. Analiza N-glikoma uvelike ovisi o korištenim metodama izolacije i pripreme za identifikaciju[31].

Hipoteze rada:

1. Analiza N-glikoma IgG štakora doprinijet će boljem razumijevanju fiziološkog N-glikanskog profila štakora što je relevantno za buduće usporedbe N-glikanskog profila IgG štakora s promijenjenim stanjima odnosno analizu mehanizama djelovanja lijekova koji se odnose na N-glikanski profil IgG štakora [46].
2. Metoda tekućinske kromatografije na monolitnim kolonama omogućit će izolaciju IgG.
3. Osjetljiva metoda masene spektrometrije (MS) potpomognuta laserskom desorpcijom/ionizacijom i analizatorom masa preleta leta TOF omogućiti će preciznu analizu N-glikanskog profila IgG štakora.

Ciljevi ovog diplomskog rada su stoga bili:

1. Razvoj i optimizacija metode tekućinske kromatografije na monolitnim kolonama za izolaciju IgG iz seruma štakora.
2. Usporedba protokola za triptičku digestiju proteina prije analize masenom spektrometrijom razvijen na Odjelu za biotehnologiju (Laboratorij za visokopropusne analize) s protokolom koji je razvila skupina Shevchenko i sur.[47].

3. Određivanje N-glikanskog profila zdravih štakora korištenjem MALDI-TOF masene spektrometrije.

3 Materijali i metode

3.1 Eksperimentalne životinje

Pri izradi diplomskog rada koristio se serum Wistar štakora (ženskih i muških) divljeg fenotipa. Serum je dobavljen s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada iz Zagreba.

3.2 Afinitetna monolitna kromatografija

Afinitetna monolitna kromatografija je rađena na uređaju za visokoprotočnu tekućinsku kromatografiju (HPLC Knauer, Berlin, Njemačka) koji se sastoji od pumpe, otplinjivača, petlje za uzorak zapremnine 2 ml, uređaj za praćenje konduktiviteta i UV-Vis detektora koji radi u rasponu valnih duljina od 190 do 750 nm. Praćenje parametara protoka, konduktiviteta i absorbancije provedeno je uz pomoć računalnog programa *ClarityChrom Preparative software* verzije 3.05.505. (Knauer). Korištena je afinitetna monolitna kolona konvektivnog interakcijskog medija CIMac r-protein L (engl. *convective interaction media recombinant protein L*) zapremnine 100 µL (BIA Separations, Ajdovščina, Slovenija) te tri pufera: ekvilibracijski pufer (50 mM TRIS, pH 7,4), pufer za ispiranje (0,2 M TRIS, pH 7,4) i elucijski pufer (0,5 M octena kiselina, pH 2,5). Puferi su pripremljeni s filtriranom destiliranom vodom te dodatno filtrirani kroz filter papir 0,22 µm. Poredak ispiranja kolone je bio sljedeći: ekvilibracijski pufer, elucijski pufer i pufer za ispiranje. Dobiveni uzorci seruma su bili deset puta razrjeđeni u ekvilibracijskom puferu (200 µL uzorka seruma u 1800 µL pufera) te je 2 mL uzorka naneseno na kolonu. Kromatografija se provela na sobnoj temperaturi uz izokratski režim elucije. Detekcija proteina je vršena pri apsorbanciji 280 nm. Na toj se valnoj duljini detektira apsorbancija aromatskih aminokiselina triptofana i tirozina. Prikupljene frakcije nakon elucije su neutralizirane s 1 M TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) do fiziološkog pH kako se proteini ne bi denaturirali. Odsoljavanje i ukoncentriravanje uzoraka seruma je provedno uz pomoću tzv. 'centrikona' (Pall Nanosep centrifugal device

with Omega membrane, Sigma-Aldrich). Membrane centrikona zadržavaju proteine do 10 kDa molekularne mase, a propuštaju molekule otapala i ione soli koji ometaju gel elektroforezu. Uzorci su nakapani na membranu u tubici i centrifugirani tri puta pri 10000 rpm (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u trajanju od 10 minuta. Zatim je provedeno ispiranje s destiliranom vodom, tri puta u istim uvjetima.

3.3 Kvatifikacija proteina

Kako bismo odredili koncentraciju proteina u eluatu koristili smo kvantifikacijski test s bicinkoničnom kiselinom (komercijalni paket BCA, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD). Test radi na principu redukcije bakar(II)sulfata peptidnim vezama u bakar(I)sulfat u alkalnim uvjetima i pri temperaturi od 37°C. Koncentracija nastalog Cu^{+} iona je proporcionalna koncentraciji prisutnog proteina. Zatim dvije molekule bicinkoninične kiseline keliraju Cu^{+} ione stvarajući ljubičasto obojeni kompleks koji absorbira svjetlost pri valnoj duljini od 562 nm.

Koncentracije eluata su određene tako da su napravljeni duplikati razrjeđenja standarda albumina goveđeg seruma volumena 10 µL u mikrotitarskoj pločici na koju se nakapa 200 µl reagensa A i B iz BCA komercijalnog paketa u omjeru 50:1. Reagensi se također nakapaju u uzorke eluata volumena 10 µL te se mikrotitarska pločica inkubira 30 minuta na 37°C. Mikrotitarska pločica se stavi u spektrofotometar (Hidex, Turku, Finska) kako bi se izmjerila absorbancija. Izradom baždarne krivulje prema koncentraciji radnih otopina standarda se odredi koncentracija proteina u mg/mL.

3.4 Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl suplhate-polyacrilamide gel electrophoresis*)

Proteini su iz smjese razdvojeni uz pomoć SDS-PAGE uređaja (Mini-Protean Tetracell sustav, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Gel se sastojao od dva dijela, sabijajućeg gela (4%) i gela za razdvajanje proteina (10%). Kao standard proteinskih masa je korišten marker Roti-Mark TRICOLOR

(Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) te se na gelu mogu vidjeti molekularne mase od 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35 25, 20, 17 i 11 kDa. Uzorci su pripremljeni na način da im je dodan pufer za nanošenje, sastava: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 (Sigma-Aldrich), 2,5% SDS (Sigma-Aldrich), 0,002% Bromophenol Blue, 5% β-merkaptoetanol, 10% glicin (Sigma-Aldrich), sa svježim 1,4-ditiotreitolom (DTT, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka). Uzorci su potom grijani pet minuta na 95°C. Gel elektroforeza je provedena pri 200 V u puferu sastava: 250 mM Tris, 1,92 M glicin i 1% SDS. Potom je gel obojan s bojom Coommassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i odbojan s otopinom 40% etanola i 10% octene kiseline u vodi.

3.5 Digestija u gelu

Za potrebe analize imunoglobulina G masenom spektrometrijom uzorci su pripremani enzimskom digestijom u gelu. Testirana su dva protokola: protokol razvijen na Odjelu za biotehnologiju (tzv. *in-house* protokol[48]) i protokol iz literature (Shevchenko *et al*[47]).

U '*in-house*' protokolu proteinske vrpce od interesa su izrezane iz gela te usitnjene skalpelom. Odbojavanje komadića gela je provedeno s acetonitrilom (Sigma-Aldrich) i 100 mM amonij bikarbonatom (Sigma-Aldrich), pH 7,8, pri sobnoj temperaturi uz trešnju u trajanju od 12 minuta. Proteini su reducirani s 50 mM DTT na 57°C i alkilirani s 50 mM jodoacetamidom, IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), u mraku tijekom 30 minuta. Nakon toga su ponovljeni koraci odbojavanja gela. Gel je nakratko posušen u koncentratoru pod vakuumom (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). U uzorke je potom dodan tripsin (Promega, Madison, WI, SAD) koncentracije 0,4 μg/μL u 50 mM amonij bikarbonatu te su uzorci inkubirani 40 minuta na 4°C. Zatim je dodan 50 mM amonij bikarbonat u uzorke da se prekrije gel što je ostavljeno u inkubaciji preko noći na 37°C.

Slijedeći je dan supernatant odvojen, a u uzorke je nakapana otopina za ekstrakciju peptida, sastava 65% acetonitril i 5% metanske kiseline (Sigma-Aldrich) u deioniziranoj vodi, te su uzorci 30 minuta inkubirani na sobnoj temperaturi uz trešnju. Supernatant je ponovno prikupljen, a u uzorke je nakapana deionizirana voda. Koraci su ponovljeni tri puta, a prikupljeni supernatant je posušen u vakuum koncentratoru preko noći.

Prema protokolu iz rada Shevchenko i sur.[47] izrezani gelovi su odbojani 30 minuta u otopini 100 mM amonij bikarbonat/acetonitril (1:1, vol/vol) te u 100% acetonitrilu 30 minuta. Dodana je otopina tripsina koncentracije 0,4 µg/µL u 50 mM amonij bikarbonata te su uzorci inkubirani dva sata na 4°C kako bi enzim prodrio u gel. Digestija je provedena 30 minuta na 55°C. U svaki uzorak je dodano 100 µl ekstrakcijske otopine koja se sastoji od 5% metanske kiseline/acetonitrila (1:2, vol/vol) uz inkubaciju od 15 minuta na 37°C. Nakon inkubacije su uzorci posušeni te pročišćeni i koncentrirani prema ZipTip protokolu.

3.6 ZipTip pročišćavanje i ukoncentriranje uzorka

ZipTip (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka) pročišćavanje i ukoncentriranje uzorka je provedeno prema uputama proizvođača. Uzorci su otopljeni u 0,1% trifluoroctenoj kiselini (TFA, Sigma-Aldrich). ZipTip nastavci su isprani u acetonitrilu i ekvilibrirani u 0,1 % TFA. Uzorci su sakupljeni i eluirani u otopini 0,1 % TFA/acetonitril (1:1).

3.7 PNGase F digestija u gelu

Za analizu glikana imunoglobulina G masenom spektrometrijom uzorci su pripremani enzimskom digestijom u gelu uz pomoć enzima PNGaza F (Promega). Proteini su izrezani iz gela i odbojani s 100 mM amonij bikarbonatom, pH 7,8, i acetonitrilom uz trešnju. Redukcija je provedena s 10 mM DTT, a alkilacija s 50 mM IAA. Ponovljeni su koraci odbojavanja gela 2x. Uzorci su posušeni u vakuum koncentratoru te je na njih potom nakapano 20 U PNGaze F u 20 mM natrij hidrogenkarbonatu (Sigma-Aldrich) po uzorku. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37°C, dodano je još

pufera kako bi se prekrio gel. Uzorci su tako ostavljeni preko noći u istim uvjetima.

Slijedeći dan su uzorci sonicirani u ultrazvučnoj kupelji 30 minuta i ispirani dva puta s deioniziranom vodom te 50% i 100% acetonitrilom. U koracima ispiranja su supernatanti sačuvani i na kraju posušeni u vakuum koncentratoru preko noći.

Za derivatizaciju NeuAc sijalinske kiseline je korišten etilacijski reagens koji se sastoji od 0.25 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC, Sigma-Aldrich), i 0,25 M hidroksibenzotriazola (HOBt, Sigma-Aldrich) u etanolu. Uzorci s dodanim etilacijskim reagensom su inkubirani jedan sat na 37°C nakon čega je dodan ohlađeni acetonitril i uzorci su inkubirani 15 minuta na -20°C.

3.8 Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama

Za pročišćavanje i obogaćivanje glikana u uzorcima, provedena je tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama. Nastavak za mikropipetu s vatom kao matriksom se smoči vodom te potom 85% acetonitrilom. Potom se nanosi uzorak koji se više puta aspirira kako bi što više glikana ostalo vezano u vati. Ispiranje vezanog uzorka se provodi uz pomoć 85% acetonitrila/1% TFA. Uzorci su eluirani s 4µL deionizirane vode.

3.9 MALDI TOF masena spektrometrija

Za analizu uzoraka peptida i glikana masenom spektrometrijom odabrana je metoda masene spektrometrije matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija s analizatorom vremena preleta (MALDI-TOF, engl. *matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight*) u pozitivnom reflektronskom načinu rada na uređaju UltraflexExtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker). Raspon masa bio je između 700 i 3500 Da. Vanjska kalibracija je napravljena s *Peptide Calibration Standard II* (Bruker, Bremen, Njemačka). Kalibracijski peptidi su sljedeći: bradikinin 1-7, angiotenzin II,

angiotenzin I, supstanca P, bombezin, ACTH klip 1-17, ACTH klip 18-39, somatostatin 28.

3.9.1 Analiza imunoglobulina G

Pri analizi peptida za matricu je odabrana α-cijano-4-hidroksicinamična kiselina (Sigma-Aldrich), CHCA, gdje je 1,4 mg otopljeno u 85% acetonitrila i 0,1% TFA u vodi. U 1 µl uzorka imunoglobulina G dodalo se 1 µl matrice. Ukupno se 1 µl tako pripremljene otopine nakapa na MALDI *anchor chip* ploču i ostavi sušiti. *Anchor chip* ploče u sredini svake jažice imaju hidrofilni dio koji služi tome da se uzorak pozicionira u jednoj točki, da se smanji njegovo razlijevanje te u konačnici osigura željeni ishod analize. Rezultati se analiziraju uz pomoć MASCOT baze podataka za peptide (verzija 2.6.00., Matrix Science, London, Ujedinjeno Kraljevstvo).

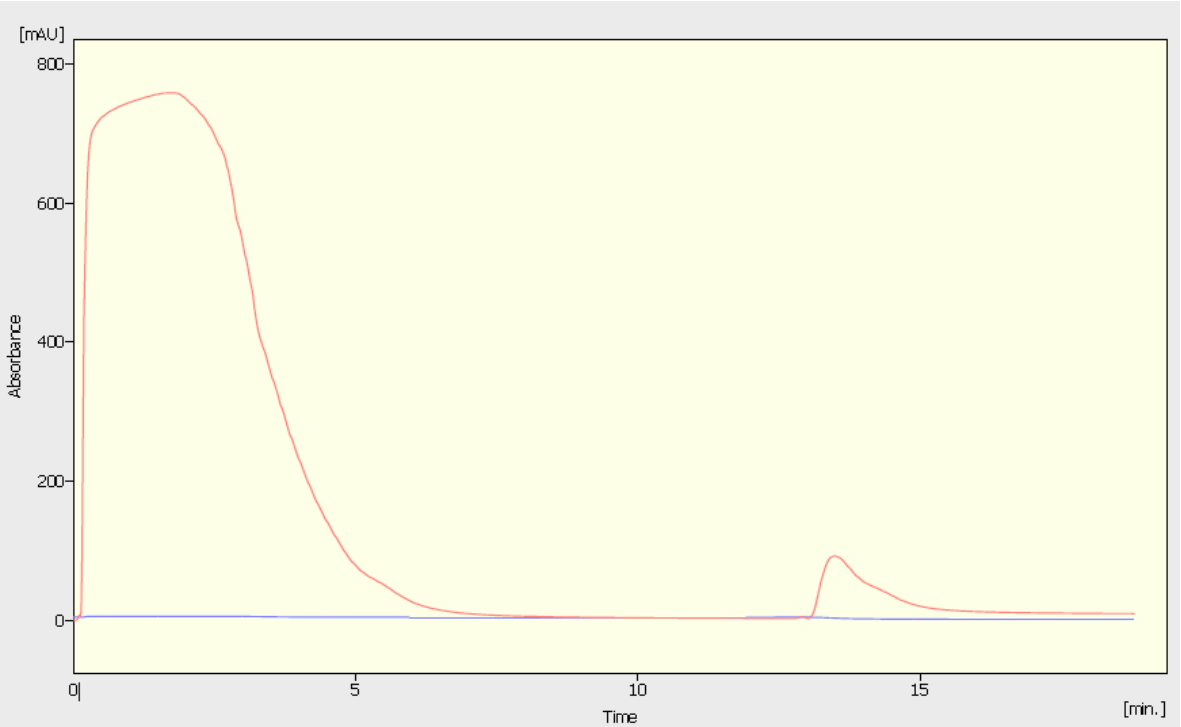
3.9.2 Analiza glikana

Za analizu glikana korištena je matrica 2,5-dihidrobenzoična kiselina (2,5-DHB, Sigma-Aldrich). Ukupno je 5 mg/ml 2,5-DHB pripremljeno u 1 mM natrijevom hidroksidu (Sigma-Aldrich) u 75% acetonitrilu. Ukupno se 1 µl otopine matrice nakapalo na MALDI *anchor chip* ploču i posušilo. Nakapano je i po 1 µl uzorka što se posušilo na zraku. Uzorak je rekristaliziran uz pomoć dodatka 0,2 µl etanola. Dobiveni rezultati su analizirani uz pomoć baze podataka *GlycoMod*[49] (Swiss Institute of Bioinformatics, dostupno *online* - https://web.expasy.org/glycomod/).

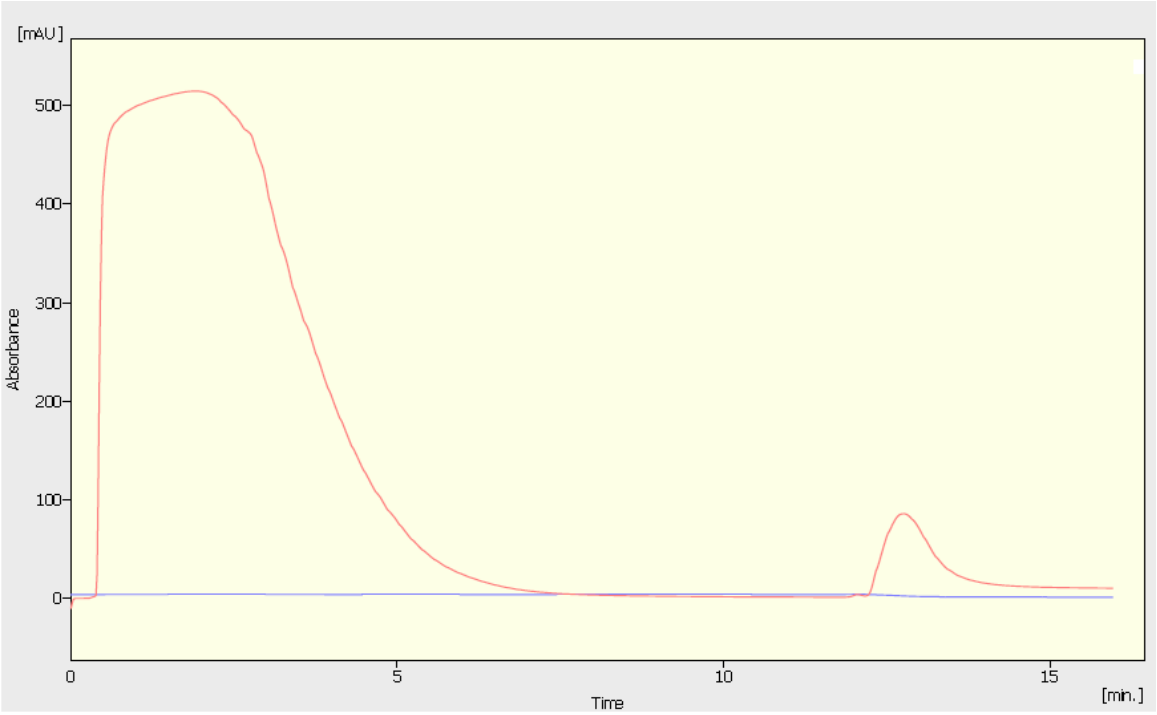
4 Rezultati

4.1 Izolacija imunoglobulina G iz seruma štakora

Izolacija IgG je provedena iz seruma zdravih štakora kako bi se istražio sastav N-glikana teških lanaca IgG. Pri tome su uspoređeni tzv '*in-house'* protokol za digestiju proteina prije analize MS koji je razvijen na Odjelu za biotehnologiju (Laboratorij za visokopropusne analize[48]) te protokol koji je razvila skupina Shevchenko i sur.[47]. Ukratko su serumi zdravih štakora razrijeđeni deset puta u ekvilibracijskom puferu i naneseni na afinitetnu monolitnu kolonu CIMac r-protein L, a kolona s uzorkom ispirala se prema protokolu opisanom u materijalima i metodama. Kapa laki lanac IgG štakora se s visokim afinitetom veže za protein L imobiliziran na koloni. Na slici 9 se može vidjeti kromatogram elucije IgG iz seruma zdravog štakora. Na njemu je vidljiv prvi pik koji predstavlja proteine iz seruma koji se nisu vezali za kolonu budući da nemaju afinitet za L protein. Sljedeći pik na kromatogramu je puno manji te on predstavlja IgG koji se vezao za imobilizirani protein L koji je kasnije ispran s kolone elucijskim puferom. Slika 10 predstavlja kromatogram elucije IgG iz četiri objedinjena uzorka seruma različitih štakora . Na slici se može vidjeti prvi pik koji predstavlja proteine koji se nisu vezali za kolonu te drugi pik koji predstavlja IgG eluiran s kolone. Kromatogrami su izrađeni pomoću računalnog programa *ClarityChrom Preparative software* verzije 3.05.505 u kojem se prikazuje ovisnost jedinice absorbancije o vremenu.



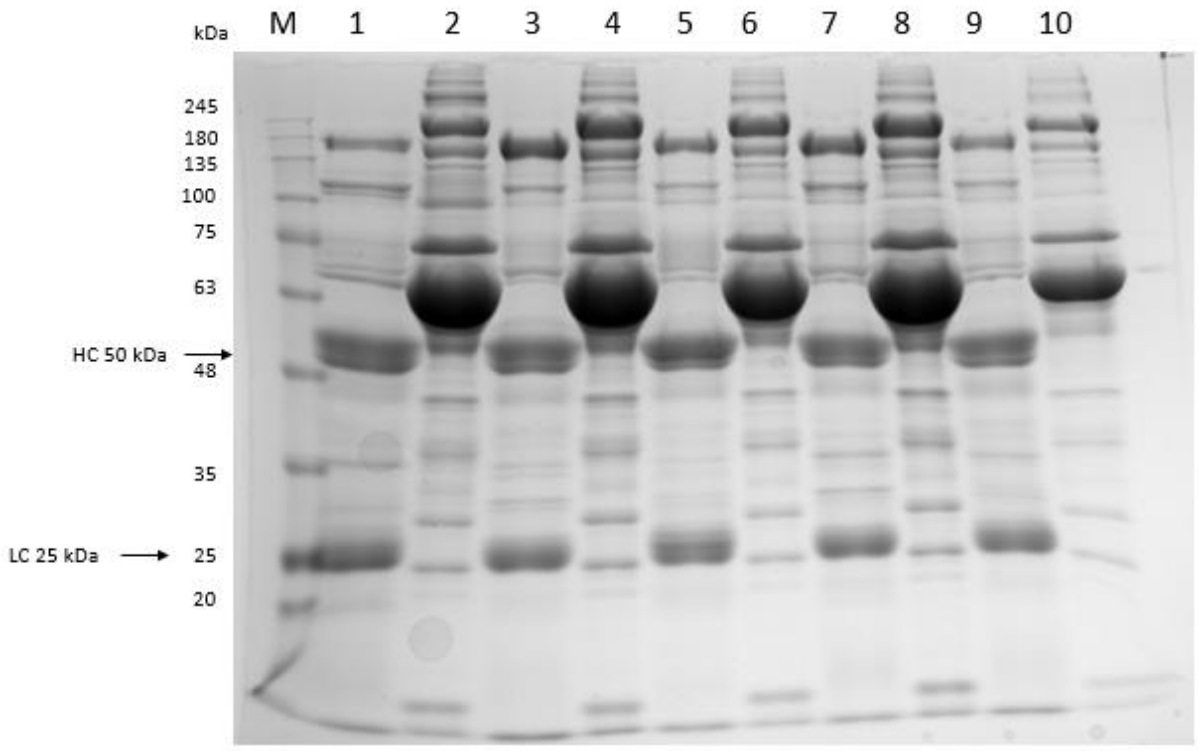
Slika 9. Kromatogram elucije IgG iz seruma zdravog štakora (jedan uzorak). Prvi pik predstavlja proteine koji se nisu vezali za kolonu, a drugi pik predstavlja IgG koji se vezao i eluirao s kolone.



Slika 10. Kromatogram elucije IgG iz seruma zdravog štakora (četiri objedinjena štakorska seruma). Prvi pik predstavlja proteine koji se nisu vezali za kolonu, a drugi pik predstavlja IgG koji se vezao i eluirao s kolone.

4.2 Validacija izolacije imunoglobulina G štakora

Kako bi se pouzdano utvrdilo da je drugi pik na kromatogramu eluat IgG štakora provedena je gel elektroforeza prikupljenih frakcija. Na slici 11 se može vidjeti prikaz oglednog gela. Stupci 1, 3, 5, 7 i 9 su frakcije proteina iz uzorka seruma prikupljenih tijekom drugog pika te se u njima nalazi izolirani IgG. U stazama 9 i 10 se nalazi objedinjeni uzorak kojeg čine mješavina uzoraka seruma 1-4. U tim su elucijama vidljive dvije vrpce pri 50 kDa koje predstavljaju teške lance (na slici HC, engl. *heavy chain*) IgG. Niže na gelu se može vidjeti jedna vrpca veličine 25 kDa te ona predstavlja lake lance (na slici LC, engl. *light chain*) IgG. Kod frakcija nevezanih proteina u stupcima 2, 4, 6, 8 i 10 se može vidjeti albumin kao protein kojeg ima najviše u serumu. Taj protein kao i mnogi drugi proteini, uklonjeni su iz frakcija eluata.

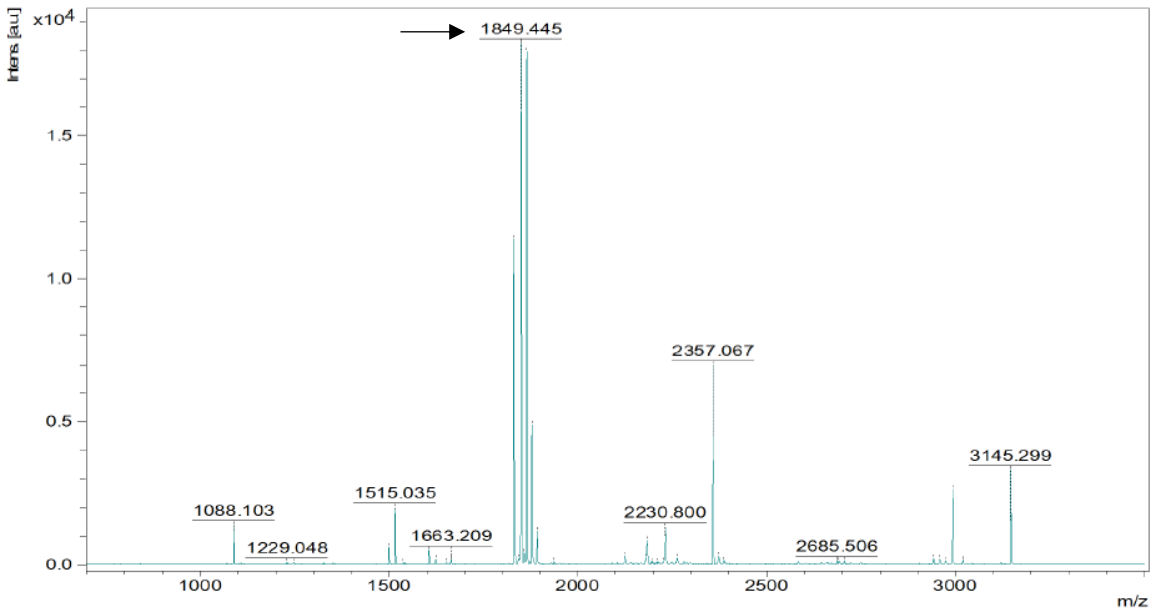


Slika 11. Prikaz oglednog SDS PAGE gela na kojem su razdvojeni izolati afinitetne monolitske kromatografije. Kao marker je korišten standard molekulskih masa (M) Roti-Mark TRICOLOR. Stupci 1 i 2 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (1) i nevezanog materijala (2) uzorka 1. Stupci 3 i 4 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (3) i nevezanog materijala (4) uzorka 2. Stupci 5 i 6 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (5) i nevezanog materijala (6) uzorka 3. Stupci 7 i 8 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (7) i nevezanog materijala (8) uzorka 4. Stupci 9 i 10 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (9) i nevezanog materijala (10) objedinjenog uzorka seruma 1 do 4. HC – teški lanac od engl. heavy chain; LC – laki lanac od engl light chain.

4.3 Validacija izolacije imunoglobulina G MALDI TOF MS

Nakon provedene gel elektroforeze u reducirajućim uvjetima, izrezane su proteinske vrpce molekulskih masa ~ 50 kDa i ~ 25 kDa koje predstavljaju teške i lake lance izoliranog IgG. Provedena je triptička digestija u gelu prema protokolu iz literature te prema *in-house* protokolu kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Dobiveni uzorci peptida su naneseni na MALDI pločicu, posušeni i analizirani na MALDI-TOF MS uređaju.

Na slici 12 se može vidjeti maseni spektar teškog lanca štakorskog IgG2a. Programom MASCOT koji je korišten za identifikaciju proteina nakon analize MALDI-TOF MS u stvari se utvrđuje preklapanje eksperimentalno dobivenih spektara s onima u bazama podataka. Rezultat za identifikaciju teškog lanca IgG2a bio je 51 (vrijednost MASCOT score), a preklapanje proteinske sekvence iznosilo je 55% (preklopljena sekvenca prikazana je crvenim slovima niže).



(A)

1 AETTAPSVYP LAPGTALKSN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGALSSGV

51 HTFPAVLQSG LYTLTSSVTV PSSTWSSQAV TCNVAHPASS TKVDKKIVPR

101 **ECNPCGCTGS EVSSVFIFPP** **K**TKDVLTITL TPK**VTCVVVD ISQNDPEVRF**

151 **SWFIDDVEVH TAQTHAPEK**Q SNSTLR**SVSE LPIVHRDWLN GKTFK**CK**VNS**

201 **GAFPAPIEK**S ISKPEGTPR**G PQVYTMAPPK EEMTQSQVSI TCMVKGFYPP**

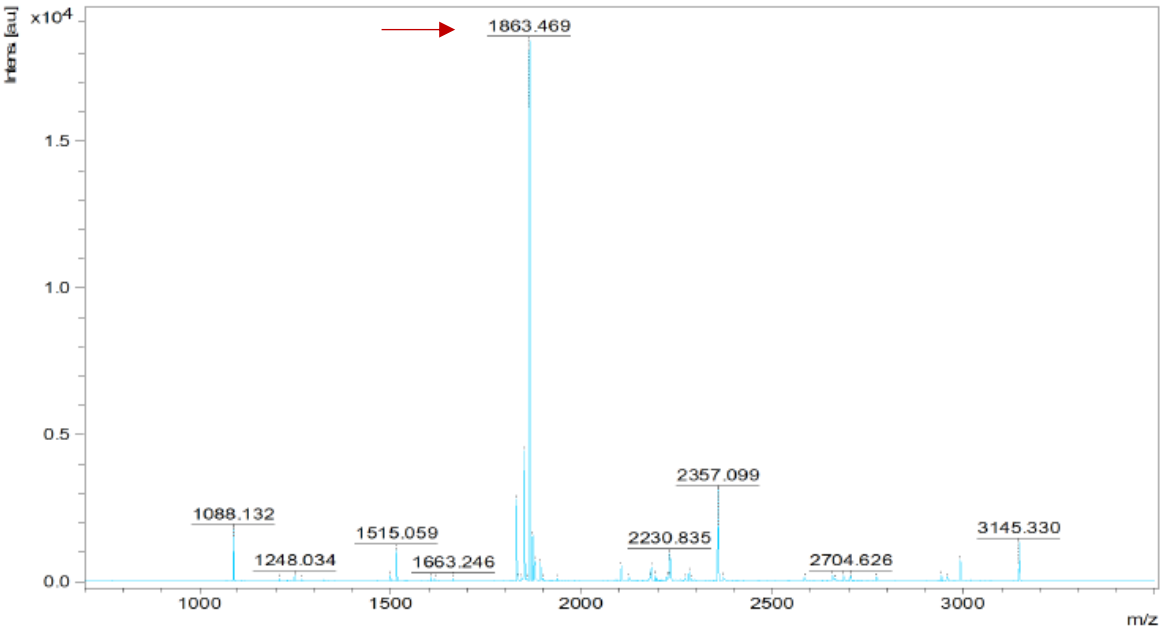
251 **DIYTEWKMNG QPQENYKNTP PTMDTDGSYF LYSK**LNVKK**E TWQQGNTFTC**

301 **SVLHEGLHNH HTEK**SLSHSP GK

(B)

Slika 12. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B).

Na slici 13 se može vidjeti maseni spektar teškog lanca štakorskog IgG2a. Rezultat za identifikaciju teškog lanca IgG2a bio je 48 (vrijednost MASCOT score), a preklapanje proteinske sekvence iznosilo je 50% (preklopljena sekvenca prikazana je crvenim slovima niže).



(A)

1 AETTAPSVYP LAPGTALKSN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGALSSGV

51 HTFPAVLQSG LYTLTSSVTV PSSTWSSQAV TCNVAHPASS TKVDKKIVPR

101 ECNPCGCTGS EVSSVFIFPP KTKDVLTITL TPKVTCVVVD ISQNDPEVRF

151 SWFIDDVEVH TAQTHAPEKQ SNSTLRSVSE LPIVHRDWLN GKTFKCKVNS

201 GAFPAPIEKS ISKPEGTPRG PQVYTMAPPK EEMTQSQVSI TCMVKGFYPP

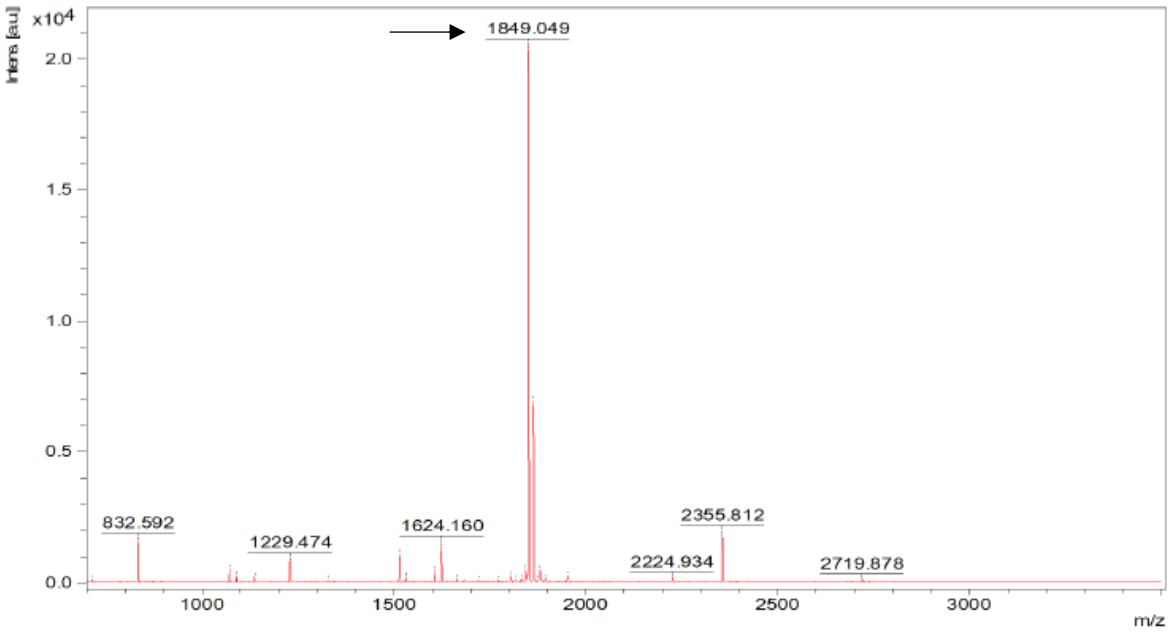
251 DIYTEWKMNG QPQENYKNTP PTMDTDGSYF LYSKLNVKKE TWQQGNTFTC

301 SVLHEGLHNH HTEKSLSHSP GK

(B)

Slika 13. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B).

Na slici 14 se može vidjeti maseni spektar teškog lanca štakorskog IgG2a. Rezultat za identifikaciju teškog lanca IgG2a bio je 42 (vrijednost MASCOT score), a preklapanje proteinske sekvence iznosilo je 40% (preklopljena sekvenca prikazana je crvenim slovima niže).



(A)

1 AETTAPSVYP LAPGTALKSN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGALSSGV

51 HTFPAVLQSG LYTLTSSVTV PSSTWSSQAV TCNVAHPASS TKVDKKIVPR

101 **ECNPCGCTGS EVSSVFIFPP** KTKDVLTITL TPK**VTCVVVD ISQNDPEVRF**

151 **SWFIDDVEVH TAQTHAPEK**Q SNSTLR**SVSE LPIVHRDWLN GKTFK**CK**VNS**

201 **GAFPAPIEK**S ISKPEGTPR**G PQVYTMAPPK EEMTQSQVSI TCMVKGFYPP**

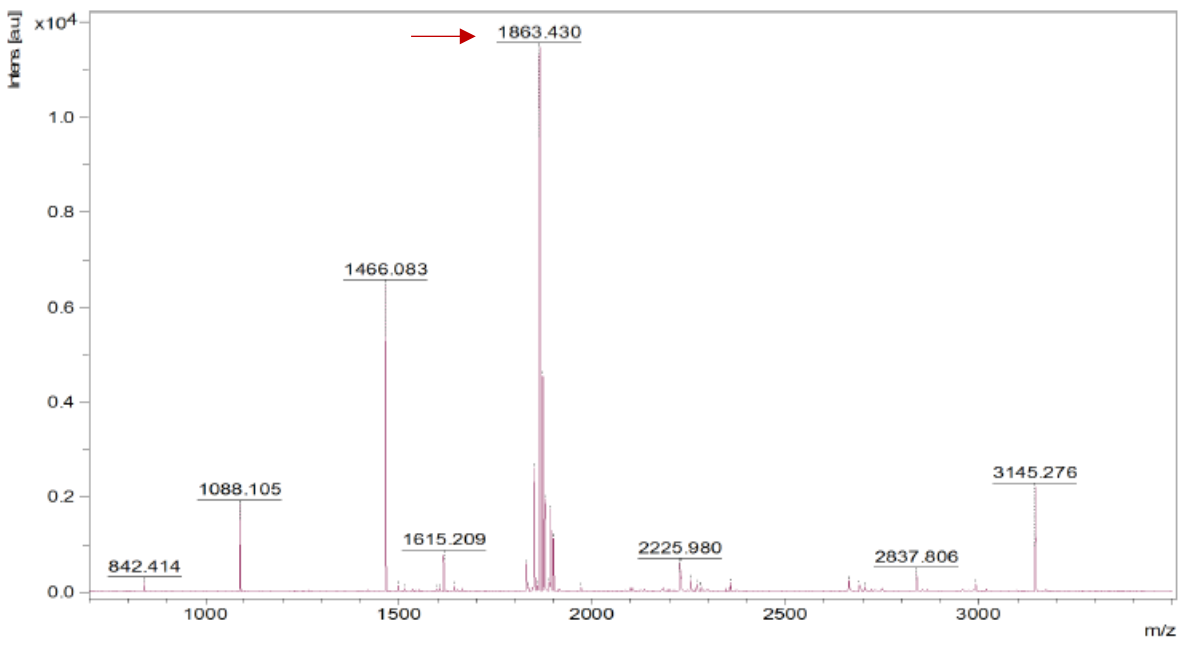
251 **DIYTEWKMNG QPQENYKNTP PTMDTDGSYF LYSK**LNVKK**E TWQQGNTFTC**

301 **SVLHEGLHNH HTEK**SLSHSP GK

(B)

Slika 14. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B).

Na slici 15 se može vidjeti maseni spektar teškog lanca štakorskog IgG2a. Rezultat za identifikaciju teškog lanca IgG2a bio je 39 (vrijednost MASCOT score), a preklapanje proteinske sekvence iznosilo je 38% (preklopljena sekvenca prikazana je crvenim slovima niže).



(A)

1 AETTAPSVYP LAPGTALKSN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGALSSGV

51 HTFPAVLQSG LYTLTSSVTV PSSTWSSQAV TCNVAHPASS TKVDKKIVPR

101 **ECNPCGCTGS EVSSVFIFPP** KTKDVLTITL TPK**VTCVVVD ISQNDPEVRF**

151 **SWFIDDVEVH TAQTHAPEK**Q SNSTLR**SVSE LPIVHRDWLN GK**TFKCK**VNS**

201 **GAFPAPIEK**S ISKPEGTPR**G PQVYTMAPPK EEMTQSQVSI TCMVKGFYPP**

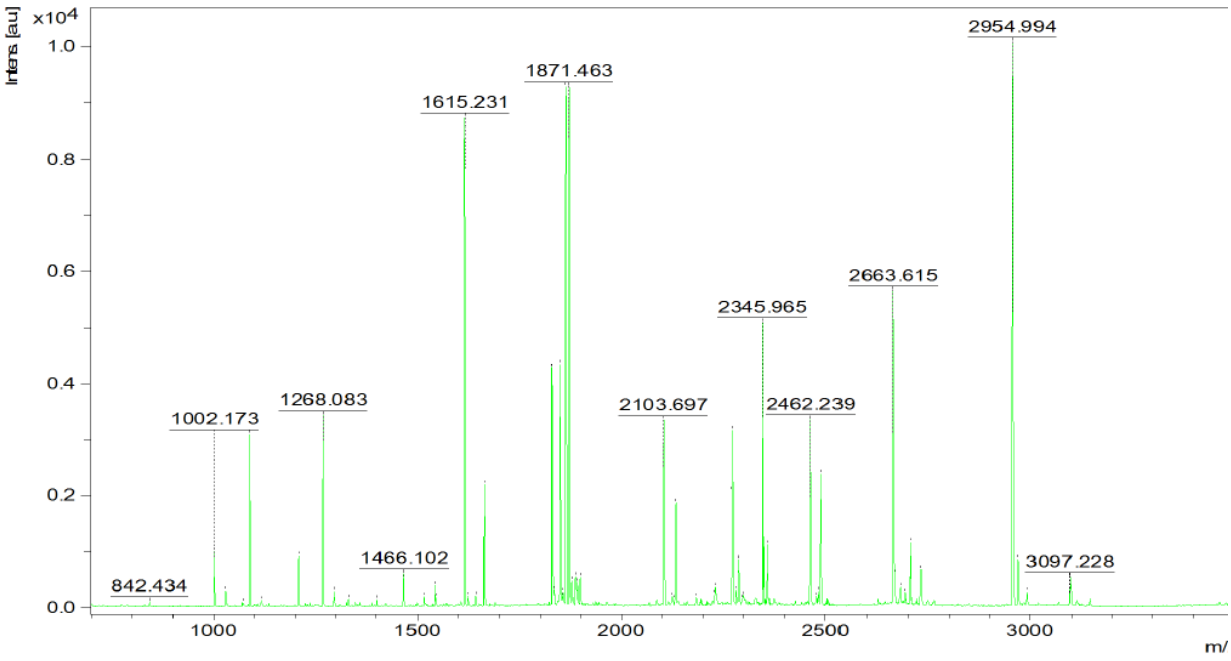
251 **DIYTEWKMNG QPQENYK**NTP **PTMDTDGSYF LYSK**LNVKKE **TWQQGNTFTC**

301 **SVLHEGLHNH HTEK**SLSHSP GK

(B)

Slika 15. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B).

Na slici 16 se može vidjeti maseni spektar teškog lanca štakorskog IgG2c. Rezultat za identifikaciju teškog lanca IgG2c bio je 41 (vrijednost MASCOT score), a preklapanje proteinske sekvence iznosilo je 39% (preklopljena sekvenca prikazana je crvenim slovima niže).



(A)

1 ARTTAPSVYP LVPGCSGTSG SLVTLGCLVK GYFPEPVTVK WNSGALSSGV

51 HTFPAVLQSG LYTLSSSVTV PSSTWSSQTV TCSVAHPATK SNLIKRIEPR

101 RPKPRPPTDI CSCDDNLGRP SVFIFPPKPK DILMITLTPK **VTCVVVDVSE**

151 **EEPDVQFSWF VDNVRVFTAQ TQPHEEQLNG TFRVVSTLHI QHQDWMSGKE**

201 **FK**CKVNNKDL PSPIEKTISK PRGKAR**TPQV YTIPPPREQM SKNKVSLTCM**

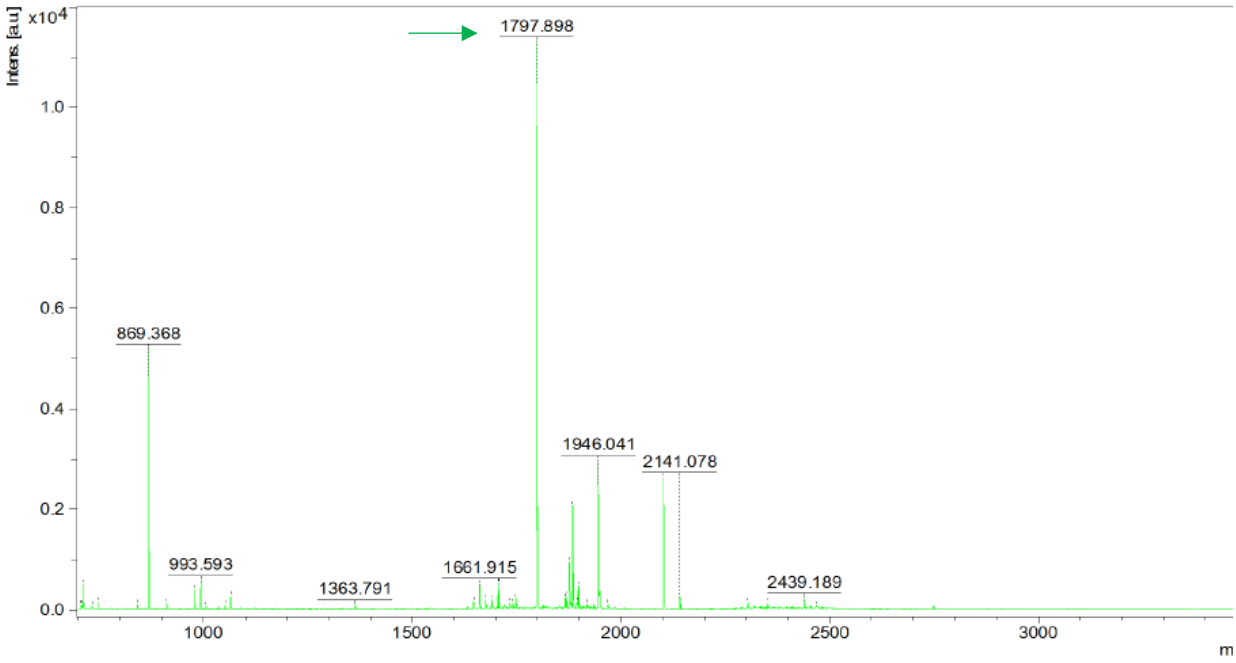
251 **VTSFYPASIS VEWER**NGELE QDYKNTLPVL DSDESYFLYS K**LSVDTDSWM**

301 **RGDIYTCSVV HEALHNHHTQ K**NLSRSPGK

(B)

Slika 16. MALDI TOF maseni spektar teškog lanca IgG2c štakora. (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B).

Nadalje je provedena analiza MALDI-TOF MS uzoraka koji su podvrgnuti triptičkoj digestiji u gelu prema *in-house* protokolu razvijenom na Odjelu za biotehnologiju (Laboratorij za visokopropusne analize[48]). Na slici 17 se tako može vidjeti MALDI-TOF maseni spektar kapa lakog lanca IgG. Preklapanje proteinske sekvence iznosilo je 57% (preklopljena sekvenca prikazana je crvenim slovima niže).



(A)

1 **RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPR**EAKVQ WKVDNALQSG

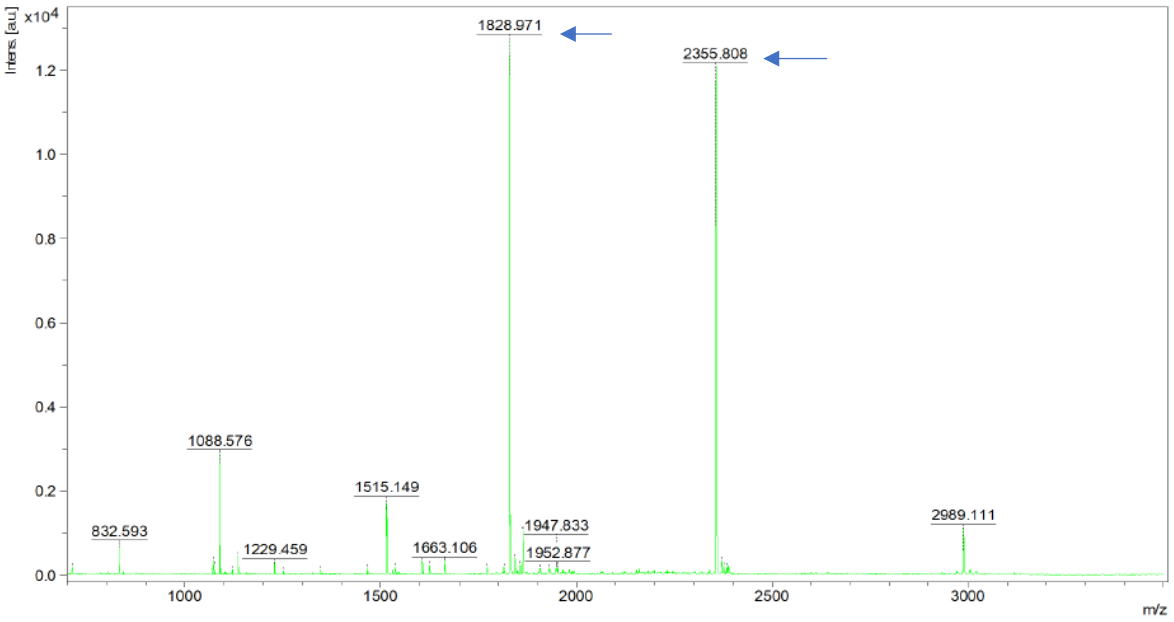
51 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE K**HKVYACEVT HQGLSSPVTK**

101 **SFNRGEC**

(B)

Slika 17. MALDI TOF maseni spektar *kappa* lakog lanca IgG, strelicom je označen najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence *kappa* lakog lanca IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B).

Na slici 18 se može vidjeti maseni spektar teškog lanca štakorskog IgG2a dobiven MALDI-TOF uređajem. Rezultat za identifikaciju teškog lanca IgG2a bio je 37 (vrijednost MASCOT score), a preklapanje proteinske sekvence iznosilo je 31% (preklopljena sekvenca prikazana je crvenim slovima niže).



(A)

1 AETTAPSVYP LAPGTALKSN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGALSSGV

51 HTFPAVLQSG LYTLTSSVTV PSSTWSSQAV TCNVAHPASS TKVDKKIVPR

101 ECNPCGCTGS EVSSVFIFPP KTKDVLTITL TPK**VTCVVVD ISQNDPEVR**F

151 SWFIDDVEVH TAQTHAPEKQ SNSTLR**SVSE LPIVHR**DWLN GKTFKCK**VNS**

201 **GAFPAPIEKS ISKPEGTPRG PQVYTMAPPK EEMTQSQVSI TCMVKGFYPP**

251 **DIYTEWK**MNG QPQENYK**NTP PTMDTDGSYF LYSK**LNVKKE TWQQGNTFTC

301 SVLHEGLHNH HTEKSLSHSP GK

(B)

Slika 18. MALDI TOF maseni spektar teškog lanca IgG2a štakora. (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B).

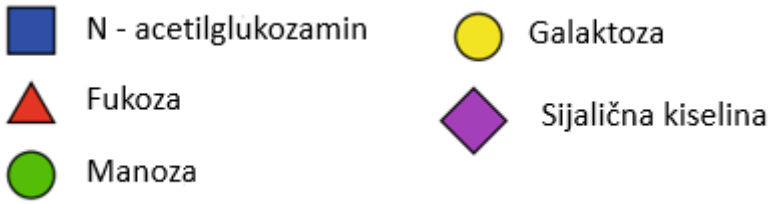
Protokolom za triptičku digestiju skupine Shevchenko i sur.[47] su uspješno identificirani IgG2a i IgG2c. Najintenzivniji pikovi u masenim spektrima IgG2a su 1849 Da (označeno crnom strelicom) i 1863 Da (označeno crvenom strelicom). *In-house* protokolom je identificiran IgG2a i laki lanac IgG. Najintenzivniji pikovi IgG2a su bili u ovom slučaju 1828 Da i 2355 Da (označeno plavim strelicama) s time da je potonji pik vidljiv i u masenim spektrima izrađenim prema protokolu iz literature, ali s manjim intenzitetom. Identifikacija proteina protokolom iz literature je imala veću pouzdanost u odnosu na pouzdanost identifikacije *in-house* protokolom koji je dao međutim neke dodatne glikanske identifikacije. Osnovne razlike u protokolima zbog kojih dolazi do različite razine pouzdanosti identifikacije su u:

1.) trajanju inkubacije uzoraka s enzimom koja je kraća u protokolu iz literature i iznosi 30 min u usporedbi s inkubacijom preko noći protokola *in house;*

2.) temperaturi triptičke digestije koja je viša i iznosi 55°C u protokolu iz literature u usporedbi s 37°C. u protokolu *in house*.

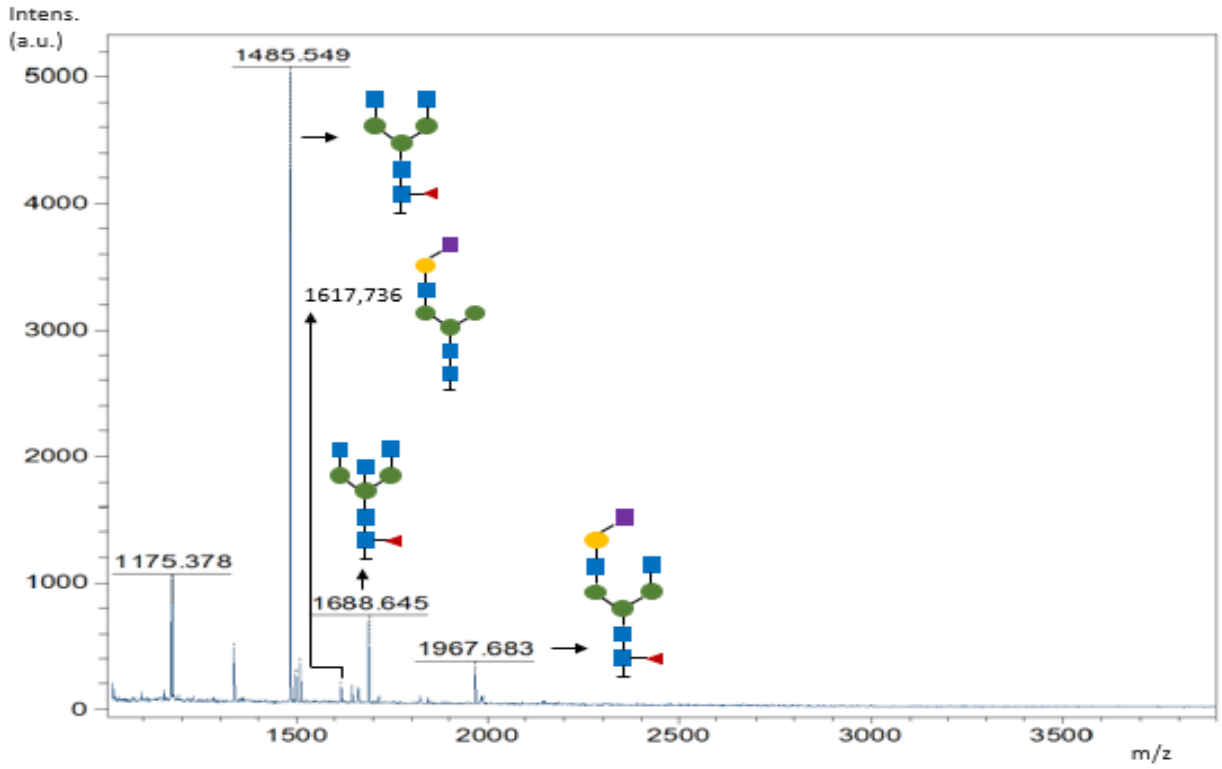
4.4 Glikozilacija imunoglobulina G štakora

Glikozilacija IgG se može proučavati kao glikozilacija cjelokupnog glikoproteina, enzimski obrađenih glikopeptida ili kao enzimski oslobođenih glikana. U ovom radu analizirani su N-vezani glikani IgG koji su odvojeni od proteina uz pomoć enzima PNGaza F. Sijalinska kiselina na distalnim krajevima glikana se u procesu pripreme uzorka za MS može hidrolizirati te je proveden i korak derivatizacije etilacijom. Etilacija sijalinske kiseline omogućuje njezinu stabilizaciju prilikom MS i razlikovanje signala na temelju tipa veze u dobivenom masenom spektru. α2,6-NeuAc će biti esterificirana na karboksilnoj skupini i njezina molekulska masa će iznositi 319,13 Da. α2,3-NeuAc će nakon etilacije imati lakton i molekulsku masu od 273,08 Da. Nederivatizirana NeuAc ima molekulsku masu 291,1 Da. Nažalost, etilacija glikana nije pogodna metoda derivatizacije NeuGc te ona neće biti vidljiva na masenom spektru. Eksperimentalno dobivene mase u nastavku ovog rada u svojoj vrijednosti imaju uračunatu masu slobodnog reducirajućeg kraja u vrijednosti od 18,011 Da i Na^+ adukt u vrijednosti od 22,989 Da.



Slika 19. Legenda glikana.

Slika 20 prikazuje maseni spektar N vezanih glikana IgG iz seruma zdravog štakora. Pomoću baze podataka Glycomod uspješno su identificirana četiri glikana, od čega dva imaju vezanu 2,6-NeuAc. U tablici 3 se može vidjeti popis eksperimentalnih masa dobivenih MALDI-TOF MS te mase glikoformi, njihova razlika u odnosu na eksperimentalno dobivene mase i strukture glikana koje predlaže baza podataka Glycomod.



Slika 20. Ogledni MALDI-TOF maseni spektar N vezanih glikana IgG izoliranih iz seruma zdravog štakora.

Tablica 3. Popis eksperimentalnih masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; Man – manoza; GlcNAc – N-acetilglukozamin; NeuAc – sijalinska kiselina.

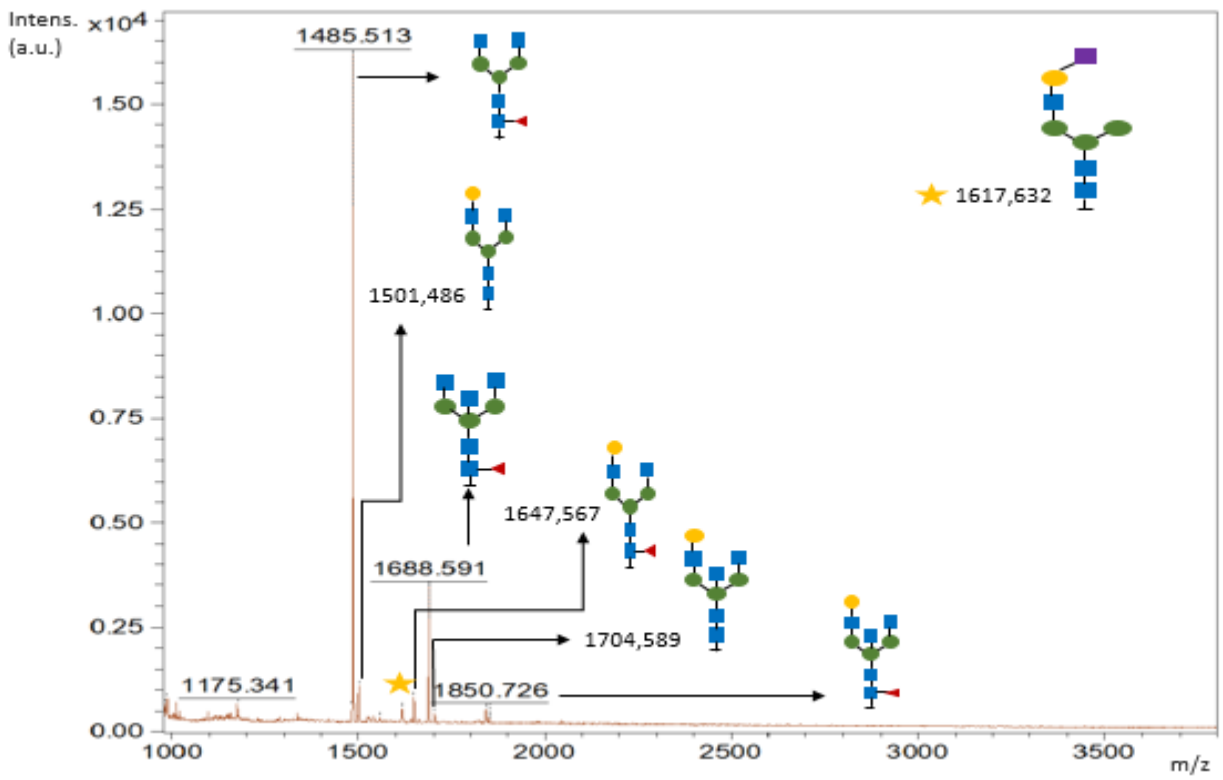
Eksperimentalna masa (m/z)	**Masa glikoforme (m/z)**	**Razlika između masa (Da)**	**Struktura glikana**
1485,549	1444,534	0,015	(HexNAc)2 (Deoksiheksoza)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
1617,736	1257,449	-0,157	(NeuAcα2-6) (Hex)1 (HexNAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
1688,645	1647,613	0,032	(HexNAc)3 (Deoksiheksoza)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
1967,683	1606,587	0,966	(NeuAc α2-6) (Hex)1 (HexNAc)2 (Deoksiheksoza)1 + (Man)3 (GlcNAc)2

U tablici 4 se nalazi popis struktura glikana koji su pogrešno identificirani bazom podataka Glycomod i nije vjerojatno da se one uistinu nalaze na IgG. To ukazuje da da je još uvijek potrebno ručno provjeravati dobivene eksperimentalne mase.

Tablica 4. Popis eksperimentalnih masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Predložene strukture nisu moguće glikoforme IgG. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; NeuAc – sijalinska kiselina

Eksperimentalna masa (m/z)	**Masa glikoforme (m/z)**	**Razlika između masa (Da)**	**Struktura glikana**
902.298	860,327	0,971	(NeuAc α2-3) (Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2
1064.365	1022,38	0,985	(NeuAc α2-3) (Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2
1225.424	1184,433	-0,008	(NeuAc α2-3) (Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2

Slika 21 prikazuje maseni spektar N vezanih glikana IgG iz seruma zdravog štakora. Pomoću baze podataka Glycomod uspješno su identificirana sedam glikana, od čega jedan ima vezanu skupinu 2,6-NeuAc.



Slika 21. Ogledni MALDI-TOF maseni spektar N vezanih glikana IgG izoliranih iz seruma zdravog štakora.

U tablici 5 se može vidjeti popis eksperimentalnih masa dobivenih MALDI-TOF MS te mase glikoformi, njihova razlika u odnosu na eksperimentalno dobivene mase i strukture glikana koje predlaže baza podataka Glycomod.

Tablica 5. Popis eksperimentalnih masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; Man – manoza; GlcNAc – N-acetilglukozamin; NeuAc – sijalinska kiselina.

Eksperimentalna masa (m/z)	**Masa glikoforme (m/z)**	**Razlika između masa (Da)**	**Struktura glikana**
1485,513	1444,534	-0,02	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
1501,486	1460,529	-0,042	(Hex)1 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2
1617,632	1257,449	0,053	(NeuAc α2-6) (Hex)1 (HexNAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
1647,567	1606,587	-0,019	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
1688,591	1647,613	-0,021	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
1704,589	1663,608	-0,018	(Hex)1 (HexNAc)3 + (Man)3 (GlcNAc)2
1850,726	1809,666	0,06	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2

U tablici 6 se nalazi glikoforma čija je struktura pogrešno identificirana bazom podataka Glycomod što jasno ukazuje na potrebu zasebnog provjeravanja dobivene eksperimentalne mase.

Tablica 6. Eksperimentalna masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Predložene strukture nisu moguće glikoforme IgG. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; NeuAc – sijalinska kiselina.

Eksperimentalna masa (m/z)	**Masa glikoforme (m/z)**	**Razlika između masa (Da)**	**Struktura glikana**
902,261	860,327	0,934	(NeuAc α2-3) (Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2

5 Diskusija

Analiza N-glikoma IgG je tehnički vrlo zahtjevna te se koraci izolacije, pročišćavanja, derivatizacije i analize uzorka moraju posebno uhodati i provesti čim preciznije i na tehnički reproducibilan način. Kao prvi korak u ovom radu za izolaciju IgG odabrana je stoga metoda afinitetne monolitne kromatografije na HPLC uređaju. U izolaciji je presudno koji se imobilizirani ligand koristi za vezanje željenog analita/proteina. Rodrigo i sur. primjerice navode uspješnu izolaciju imunoglobulina (Ig) raznih klasa korištenjem kolona s imobiliziranim proteinom A ili proteinom G koje vežu Ig putem interakcije s Fc regijom [50]. Međutim, Pexelizumab je primjerice terapijski jednolančani varijabilni fragment (scFv, engl. *single chain variable fragment*) protutijela koji ne sadrži Fc regiju te se uobičajenom afinitetnom kromatografijom s proteinom A ili G ne bi mogao izolirati[51]. Kolone s imobiliziranim proteinom L kao ligandom omogućuju da se takva prepreka prevlada vezanjem Fab regije Ig. U radu Martinović i sur. je primjerice, provedena uspješna izolacija više klasa Ig korištenjem afinitetne monolitne kromatografije s imobiliziranim proteinima A, G i L gdje je upotreba proteina L omogućila izolaciju Ig putem interakcije s κ lakim lancem[29]. U ovom je radu stoga korištena afinitetna monolitna kolona konvektivnog interakcijskog medija s imobiliziranim proteinom L na koji se s visokim afinitetom veže κ laki lanac IgG. IgG štakora ima omjer κ i λ lakih lanaca 99:1 pa se očekivalo kako će izolacija iz seruma biti uspješna. Za izolaciju su korišteni pojedinačni uzorci (slika 9.) te objedinjeni uzorci četiri zasebna uzorka (slika 10.). Uspješnost izolacije je provjerena metodom SDS-PAGE (slika 11.). Naime, na gelovima se odmah mogla uočiti proteinska vrpca molekulske mase ~ 50 kDa u stazama gdje je nanesena frakcija IgG eluirana s kolone. U ostalim stazama se proteinska vrpca ~ 50 kDa vidi slabije u odnosu na frakciju eluiranu s kolone. Ta slabije vidljiva proteinska vrpca označava imunoglobuline koji imaju λ laki lanac i nisu se vezali za protein L.

Sljedeći korak u radu je bila je identifikacija izoliranog IgG, koji je bio vidljiv na gelu, ali takav rezultat sam po sebi nije dovoljan za nedvojbenu identifikaciju i potvrdu izoliranog IgG te je to provedeno uz pomoć masene spektrometrije MALDI-TOF MS. Uzorke je stoga bilo potrebno pripremiti enzimskom digestijom u gelu za što su testirana dva protokola: protokol iz literature (Shevchenko i sur.[47]) te protokol razvijen na Odjelu za biotehnologiju (*in-house,* Martinović[48]). Protokoli se razlikuju u postupku i trajanju odbojavanja izrezanih proteinskih vrpca iz gela, duljini inkubacije gela s enzimom, temperaturi na kojoj se provodi digestija te postupkom i trajanjem ekstrakcije peptida iz gela. Triptička digestija u gelu prema protokolu iz literature traje manje od četiri sata i ne uključuje korake redukcije i alkilacije proteina. Triptička digestija u gelu prema *in-house* protokolu traje malo više od 24 sata. Važna je razlika u temperaturi na kojoj se provodi digestija. Naime, u protokolu iz literature digestija se provodi pri 55°C, dok se u *in-house* protokolu provodi na 37°C. Optimalna radna temperatura tripsina je 37°C pa se očekivalo kako će više fragmenata biti prisutno u spektrima uzoraka podvrgnutoj digestiji *in-house* protokolom[52]. *In-house* protokolom je uspješno identificiran κ laki lanac IgG (slika 17.) te IgG2a (slika 18.). Maseni spektar κ lakog lanca identificiran je na temelju 15 fragmenata te je pomoću MASCOT baze podataka prepoznato 57% proteinske sekvence. Raspon m/z se bio je od 850 do 2500 Da. Maseni spektar IgG2a je identificiran na temelju 34 fragmenta, a prepoznato je 31% proteinske sekvence. Na spektru se ne vidi pik tripsina mase 842,5 Da. Najjači intenzitet imaju pikovi 1828 Da i 2355 Da. S druge strane, protokolom iz literature su uspješno identificirane dvije podklase IgG, IgG2a (slike 12.-15.) i IgG2c (slika 16.). U svim masenim spektrima je vidljivo kako su pikovi jednoliko zastupljeni u rasponu od 1000 Da do 3500. U masenim spektrima za IgG2a ponavljaju se tri pika, 1088 Da, ~2356 Da i 3145 Da, međutim, najintenzivniji su pikovi 1849 Da i 1863 Da. Razlike u spektrima dolaze zbog nedovoljnog broja analiziranih fragmenata.

Na temelju ovih rezultata može se zaključiti kako je izolacija IgG vezanjem κ lakog lanca za imobilizirani protein L na koloni bila uspješna. Protokolom razvijenim *in-house* bilo je moguće identificirati i laki lanac, dok to nije bilo moguće uz pomoć protokola iz literature. Svakako je moguće koristiti protokol iz literature, koji je imao viši postotak pokrivenosti eksperimentalnih spektara sa spektrima u bazi podataka, za bržu potvrdu izolacije IgG s obzirom da se radilo o identifikaciji pojedinačnog proteina.

Iako se štakor često koristi kao modelni organizam za istraživanje patoloških stanja, do sada na štakorima nije detaljno provela analiza glikozilacije imunoglobulina. Izolacija i analiza glikozilacije IgG štakora je u ovom radu provedena na 10 uzoraka iz različitih životinja, no analiza glikana bila je tehnički u potpunosti uspješna samo za dva uzorka. Iz dobivenih spektara (slike 20. i 21.) uz pomoć baze podataka Glycomod, iz tih je uzoraka identificirano 11 glikoformi, četiri iz jednog spektra i sedam iz drugog, od čega je osam jedinstvenih glikoformi. Kod oba spektra se ponavljaju tri pika, 1485 Da, 1617 Da i 1688 Da, međutim, najjači intenzitet ima 1485 Da. Sukladno literaturnim saznanjima, većina glikoformi je fukozilirana na početnom GlcNAc ostatku što ometa interakciju Fc regije IgG s FcγRIIIa i posljedično ometa ADCC[53]. Galaktozni ostaci su također identificirani na većini glikoformi. Primjerice su Jong i sur. ukazali na negativnu korelaciju galaktozilacije IgG i markera upalnih procesa C reaktivnog proteina (CRP, engl. *C-reactive protein*) kao i na smanjenu razinu galaktozilacije IgG kod pacijenata s astmom[23]. S obzirom da su analizirani serumi zdravih štakora, prisutnost galaktoznih ostataka na IgG bila je očekivana te može ukazivati na činjenicu kako u organizmu nisu u tijeku upalni procesi. Galaktoza čini osnovu na koju se pomoću sijaliltransferaza može dodati sijalinska kiselina[6]. Kao što je već spomenuto, korišteni protokol pripreme uzorka nije bio kompatibilan za detekciju obje forme sijalinske kiseline. NeuGc je sijalinska kiselina koja je prisutna kod štakora ali ne i kod ljudi. Nastaje konverzijom NeuAc

enzimom CMP-NeuAc hidroksilazom[54]. Tijekom pripreme uzorka ona se hidrolizira i moguće je identificirati samo NeuAc. Od dvije izoforme, α2,3-NeuAc i α2,6-NeuAc, detektirali smo samo α2,6-NeuAc u glikoformama (NeuAc α2,6) (Hex)1 (HexNAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2 i (NeuAc α2,6) (Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2. Prema Jones i sur. sijalinska kiselina na IgG stupa u interakciju s lektinima tipa C pri čemu dolazi do pojačane ekspresije inhibitornog FcγRIIb[55]. Protuupalno djelovanje FcγRIIb nastaje djelovanjem na stanični receptor B-limfocita BCR, čime se limitira proizvodnja protutijela odnosno ukazuje na činjenicu da u organizmu nema upalnih procesa[11]. Prilikom identificiranja glikana koji sadrže α2,3-NeuAc primijećeno je kako baza podataka Glycomod može rezultirati pogrešnim identifikacijama. Predloženim strukturama iz tablica 2. i 4. nedostaje uobičajena (Man)3 (GlcNAc)2 oligosaharidna jezgra i stoga bi to bili fragmenti N-glikana koji nisu PNGazom F odvojeni od IgG. Ovo također ukazuje na potrebu da se, unatoč postojećim bazama podataka, rezultati moraju još uvijek ručno provjeravati.

S obzirom da glikani nisu uspješno identificirani kod svih uzoraka, ovo ispitivanje bi trebalo dalje razvijati kako bi se dobili statistički prihvatljivi zaključci. Moguće je kako je protokol za analizu glikana tehnički problematičan što je poznato i iz literature. Prrimjerice je problem tehničke reproducibilnsoti i analize glikana obrađeno u radu Han i Simpson[56]. Tehničke poteškoće u analizi glikana započinju u fazi enzimskog odvajanja od proteina. Enzim PNGaza F različitom brzinom cijepa N-glikane čemu su razlog steričke smetnje tijekom enzimske reakcije. Daljnji koraci u pripremi uzorka za MALDI-TOF MS kao što su redukcija i alkilacija također utječu na digestiju proteina i mogu uzrokovati probleme u enzimskoj reakciji te se događa da enzim propusti mjesto cijepanja. Jedno bi moguće rješenje za unaprjeđenje ispitanog pristupa analiziranih N-glikana moglo biti povezivanje triptičke digestije proteina u gelu i odvajanje N-glikana uz pomoć PNGaze F u jedan jedinstveni protokol. Time bi se mogao dobiti veći prinos glikana za analizu na MALDI-

TOF uređaju u odnosu na zasebnu primjenu PNGaze F kao što je testirano u ovom radu. Primjer povezivanja triptičke digestije s odvajanjem glikana navode Han i Simpson u radu gdje prikazuju metodu analize glikozilacija korištenjem termalno stabilnog tripsina vezanog za čvrstu podlogu za digestiju glikoproteina te PNGazu F za odvajanje glikana od peptida. Takav pristup omogućio je provođenje digestije na višoj temperaturi (70°C), smanjio je interakcije tripsin-tripsin i omogućio je identifikaciju glikopeptida bez detektiranih propuštenih mjesta cijepanja[56]. Derivatizacija glikana je također tehnički problematična u analizi N-glikoma. Postupak derivatizacije korišten u ovom radu čini α2,3-NeuAc nestabilnom u vodenim otopinama koje se koriste pri pročišćavanju uz pomoć HILIC kolona te njihova detekcija MALDI-TOF MS nije bila moguća. U budućnosti bi se mogao koristiti drugačiji protokol derivatizacije glikana pomoću kojega bi se identificirale sve glikoforme. Skupina Jiang i sur. navodi kako je dimetilamidacija i permetilacija glikana dobra metoda kojom se u MALDI-TOF MS analizi mogu razlikovati NeuGc i NeuAc kao i izoforme NeuAc. Tretiranjem α2,6-NeuAc i α2,3-NeuAc s dimetilaminom se postiže derivatizacija kojom se razlikuju veze, a permetilacijom se nestabilna α2,3-NeuAc stabilizira metilnim skupinama i ne dolazi do njezine hidrolize prilikom pročišćavanja HILIC kolonama. Detekciju MALDI-TOF uređajem omogućuje razlika od 13 Da između α2,6-NeuAc i α2,3-NeuAc izoformi[57].

6 Zaključak

Zaključno, fiziološko stanje, dob, spol ili stres su faktori koji utječu na izgled N-glikoma IgG. Biofarmaceutska industrija pokazuje značajan interes za istraživanjem N-glikoma imunoglobulina budući da se ta saznanja iskorištavaju u sintetiziranju terapeutskih protutijela s poboljšanim djelovanjem[58]. Izrada semikvantitativne ili kvantitativne analize N-glikoma IgG zdravih štakora važna je za bolje razumijevanje glikoformi IgG i promjena N-glikanskog profila koje nastaju djelovanjem lijekova ili uslijed nekih patoloških stanja. Prema trenutnim saznanjima N-glikozilacije IgG zdravih štakora nisu u potpunosti poznate te je ovaj rad važan korak ka razumijevanju N glikanskog profila IgG zdravih štakora. Za izradu N-glikanskih profila potrebne su napredne analitičke metode koje su osjetljive i efikasne. Povezivanjem afinitetne monolitne visokoprotočne kromatografije s MALDI-TOF MS bilo je moguće precizno identificirati više podklasa IgG. Usporedba dvaju protokola za analizu na MALDI-TOF uređaju je pokazala kako su oba jednako uspješna, ali protokol skupine Shevchenko i sur. dao je viši postotak pokrivenosti eksperimentalnih spektara sa spektrima iz baza podataka MASCOT te je trajao kraće. Boljom optimizacijom protokola za analizu N-glikana, poput korištenja permetilacije kao oblika derivatizacije glikana ili promjene uvjeta djelovanja enzima tripsina i PNGaze F, mogla bi se provesti detaljnija identifikacija N-glikoformi IgG.

Glavni zaključci rada se mogu sažeti kako slijedi:

1. IgG se uspješno može izolirati iz seruma zdravih štakora uz pomoć osjetljive afinitetne metode visokoprotočne kromatografije (HPLC) na monolitnim kolonama s imobiliziranim proteinom L.
2. IgG se može uspješno razdvojiti od preostalih proteina u elucijskoj frakciji uz pomoć poliakrilamidne gel elektroforeze pri čemu se na gelu razlikuju vrpce teških i lakih lanaca IgG.

3. Protokol za digestiju IgG *in-house* omogućio je identifikaciju lakog i teškog lanca IgG dok je protokol skupine Shevchenko i sur. omogućio identifikaciju više klasa IgG s većom pouzdanošću u odnosu na *in-house* protokol uz pomoć metodeMALDI-TOF MS.
4. Masena spektrometrija MALDI-TOF MS dobra je metoda za potvrdu izoliranog IgG.
5. Protokol za pripremu N-glikana IgG koji uključuje tripsinsku digestiju te potom enzimsko odvajanje N-glikana PNGazom F omogućio je identifikaciju glikanskih formi, ali nije bio tehnički reproducibilian za analizu N-glikana svih uzoraka.
6. Protokolom za derivatizaciju sijaliliranih glikana je bilo moguće identificirati glikane koji sadrže samo α2,6-NeuAc. Protokol nije kompatibilan za detekciju α2,3-NeuAc i NeuGc.

7 Literatura

1 Aizpurua-Olaizola O, Sastre Toraño J, Falcon-Perez JM, Williams C, Reichardt N, Boons G-J. Mass spectrometry for glycan biomarker discovery. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2018; **100**: 7–14.

2 55-28_00-6081-69A1.pdf. https://www.bdj.co.jp/pdf/55-28_00-6081-69A1.pdf (accessed 26 Dec2018).

3 Janeway's immunobiology - NLM Catalog - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101674267 (accessed 17 Oct2018).

4 Matsuda H, Tanaka A, Itakura A. Chapter 22 - Immunology and Hematology. In: Krinke GJ (ed). *The Laboratory Rat*. Academic Press: London, 2000, pp 437–446.

5 Antibody Basics. Sigma-Aldrich. https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibody-basics.html (accessed 23 Oct2018).

6 Biermann MHC, Griffante G, Podolska MJ, Boeltz S, Stürmer J, Muñoz LE *et al.* Sweet but dangerous - the role of immunoglobulin G glycosylation in autoimmunity and inflammation. *Lupus* 2016; **25**: 934–942.

7 Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 21–50.

8 Xu L, Li G, Wang J, Fan Y, Wan Z, Zhang S *et al.* Through an ITIM-Independent Mechanism the FcγRIIB Blocks B Cell Activation by Disrupting the Colocalized Microclustering of the B Cell Receptor and CD19. *The Journal of Immunology* 2014; **192**: 5179–5191.

9 Kepley CL, Cambier JC, Morel PA, Lujan D, Ortega E, Wilson BS *et al.* Negative regulation of FcepsilonRI signaling by FcgammaRII costimulation in human blood basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **106**: 337–348.

10 Harrison PT, Davis W, Norman JC, Hockaday AR, Allen JM. Binding of monomeric immunoglobulin G triggers Fc gamma RI-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 1994; **269**: 24396–24402.

11 Quast I, Peschke B, Lünemann JD. Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. *Cell Mol Life Sci* 2017; **74**: 837–847.

12 Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989; **170**: 481–497.

13 Gómez Román VR, Murray JC, Weiner LM. Chapter 1 - Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). In: Ackerman ME, Nimmerjahn F (eds). *Antibody Fc*. Academic Press: Boston, 2014, pp 1–27.

14 Zauner G, Selman MHJ, Bondt A, Rombouts Y, Blank D, Deelder AM *et al.* Glycoproteomic Analysis of Antibodies. *Mol Cell Proteomics* 2013; **12**: 856–865.

15 Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 2011; **21**: 576–582.

16 Burda P, Aebi M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1426**: 239–257.

17 Zhang Y, Peng Y, Yang L, Lu H. Advances in sample preparation strategies for MS-based qualitative and quantitative N-glycomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2018; **99**: 34–46.

18 Le NPL, Bowden TA, Struwe WB, Crispin M. Immune recruitment or suppression by glycan engineering of endogenous and therapeutic antibodies. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1860**: 1655–1668.

19 Sakae Y, Satoh T, Yagi H, Yanaka S, Yamaguchi T, Isoda Y *et al.* Conformational effects of N -glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fcγ receptor IIIa. *Scientific Reports* 2017; **7**: 13780.

20 Thomann M, Reckermann K, Reusch D, Prasser J, Tejada ML. Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Molecular Immunology* 2016; **73**: 69–75.

21 Reusch D, Tejada ML. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* 2015; **25**: 1325–1334.

22 Reiding KR, Vreeker GCM, Bondt A, Bladergroen MR, Hazes JMW, van der Burgt YEM *et al.* Serum Protein N-Glycosylation Changes with Rheumatoid Arthritis Disease Activity during and after Pregnancy. *Front Med (Lausanne)* 2018; **4**. doi:10.3389/fmed.2017.00241.

23 de Jong SE, Selman MHJ, Adegnika AA, Amoah AS, van Riet E, Kruize YCM *et al.* IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Scientific Reports* 2016; **6**: 28207.

24 Harre U, Lang SC, Pfeifle R, Rombouts Y, Frühbeißer S, Amara K *et al.* Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. *Nat Commun* 2015; **6**: 6651.

25 Lood C, Allhorn M, Lood R, Gullstrand B, Olin AI, Rönnblom L *et al.* IgG glycan hydrolysis by endoglycosidase S diminishes the proinflammatory properties of immune complexes from patients with systemic lupus erythematosus: a possible new treatment? *Arthritis Rheum* 2012; **64**: 2698–2706.

26 Hayes JM, Wormald MR, Rudd PM, Davey GP. Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *J Inflamm Res* 2016; **9**: 209–219.

27 Reusch D, Haberger M, Falck D, Peter B, Maier B, Gassner J *et al.* Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles—Part 2: Mass spectrometric methods. *mAbs* 2015; **7**: 732–742.

28 Zaytseva OO, Jansen BC, Hanić M, Mrčela M, Razdorov G, Stojković R *et al.* MIgGGly (mouse IgG glycosylation analysis) - a high-throughput method for studying Fc-linked IgG N-glycosylation in mice with nanoUPLC-ESI-MS. *Scientific Reports* 2018; **8**: 13688.

29 Martinović T, Andjelković U, Klobučar M, Černigoj U, Vidič J, Lučić M *et al.* Affinity chromatography on monolithic supports for simultaneous and high-throughput isolation of immunoglobulins from human serum. *Electrophoresis* 2017; **38**: 2909–2913.

30 Nishikaze T. Sensitive and Structure-Informative N-Glycosylation Analysis by MALDI-MS; Ionization, Fragmentation, and Derivatization. *Mass Spectrom (Tokyo)* 2017; **6**: A0060.

31 Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol* 2010; **6**: 713–723.

32 Li Z, Rodriguez E, Azaria S, Pekarek A, Hage DS. Affinity monolith chromatography: A review of general principles and applications. *Electrophoresis* 2017; **38**: 2837–2850.

33 Hage DS, Cazes J. *Handbook of Affinity Chromatography*. CRC Press, 2005.

34 Hage DS, Anguizola JA, Bi C, Li R, Matsuda R, Papastavros E *et al.* Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *J Pharm Biomed Anal* 2012; **69**: 93–105.

35 Monolithic Materials, Volume 67 - 1st Edition. https://www.elsevier.com/books/monolithic-materials/svec/978-0-444-50879-9 (accessed 16 Dec2018).

36 Svec F, Frechet JMJ. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry* 1992; **64**: 820–822.

37 Pfaunmiller EL, Paulemond ML, Dupper CM, Hage DS. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 2013; **405**: 2133–2145.

38 Mallik R, Hage DS. Affinity monolith chromatography. *Journal of Separation Science* 2006; **29**: 1686–1704.

39 Björck L. Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J Immunol* 1988; **140**: 1194–1197.

40 Berruex LG, Freitag R, Tennikova TB. Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2000; **24**: 95–104.

41 Proteomics C. MALDI-TOF Mass Spectrometry. Creative Proteomics. https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm (accessed 28 Dec2018).

42 Selman MHJ, Hemayatkar M, Deelder AM, Wuhrer M. Cotton HILIC SPE microtips for microscale purification and enrichment of glycans and glycopeptides. *Anal Chem* 2011; **83**: 2492–2499.

43 Abdelhamid HN. Ionic Liquid-Assisted Laser Desorption/Ionization–Mass Spectrometry: Matrices, Microextraction, and Separation. *Methods and Protocols* 2018; **1**: 23.

44 Reiding KR, Blank D, Kuijper DM, Deelder AM, Wuhrer M. High-Throughput Profiling of Protein N-Glycosylation by MALDI-TOF-MS Employing Linkage-Specific Sialic Acid Esterification. *Anal Chem* 2014; **86**: 5784–5793.

45 Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology* 2018; **333**: 65–79.

46 Dalziel M, Crispin M, Scanlan CN, Zitzmann N, Dwek RA. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* 2014; **343**: 1235681.

47 Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 2007; **1**: 2856.

48 Martinović T. Proteomic and glycomic analyses of the potential protective role of zeolite on an osteoporotic rat model. ; : 87.

49 Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod--a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* 2001; **1**: 340–349.

50 Rodrigo G, Gruvegård M, Van Alstine JM. Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography. *Antibodies* 2015; **4**: 259–277.

51 Mathew JP, Shernan SK, White WD, Fitch JCK, Chen JC, Bell L *et al.* Preliminary report of the effects of complement suppression with pexelizumab on neurocognitive decline after coronary artery bypass graft surgery. *Stroke* 2004; **35**: 2335–2339.

52 Chelulei Cheison S, Brand J, Leeb E, Kulozik U. Analysis of the effect of temperature changes combined with different alkaline pH on the β-lactoglobulin trypsin hydrolysis pattern using MALDI-TOF-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2011; **59**: 1572–1581.

53 Sakae Y, Satoh T, Yagi H, Yanaka S, Yamaguchi T, Isoda Y *et al.* Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fcγ receptor IIIa. *Scientific Reports* 2017; **7**: 13780.

54 Varki A, Schauer R. *Sialic Acids*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1920/ (accessed 1 Nov2018).

55 Jones MB, Oswald DM, Joshi S, Whiteheart SW, Orlando R, Cobb BA. B-cell–independent sialylation of IgG. *PNAS* 2016; **113**: 7207–7212.

56 Han MS, Simpson JT. A Method for Mapping Glycosylation Sites in Proteins. *J Biomol Tech* 2017; **28**: 142–149.

57 Jiang K, Zhu H, Li L, Guo Y, Gashash E, Ma C *et al.* Sialic acid linkage-specific permethylation for improved profiling of protein glycosylation by MALDI-TOF MS. *Anal Chim Acta* 2017; **981**: 53–61.

58 Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**: 226–234.

8 Popis slika

Slika 1. Prikaz strukture imunoglobulina, izrađeno prema izvoru www.microbiologyinfo.com, 21.12.2018. 4
Slika 2 Prikaz stanične citotoksičnosti posredovane protutijelima. Gómez Román VR, Murray JC, Weiner LM. Chapter 1 - Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). In: Ackerman ME, Nimmerjahn F (eds). Antibody Fc. Academic Press: Boston, 2014, pp 1–27. 6
Slika 3. A) prikaz vezanja IgG za antigene na površini patogena (npr. mikroorganizama). B) vezanje C1 komponente komplementa za kompleks IgG:antigen. 7
Slika 4 Prikaz glikozilacije proteina uz pomoć glikoziltransferaza (GT) u citosolu, ER i Golgijevom aparatu. Preuzeto iz Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. Curr Opin Struct Biol 2011; 21: 576–582. 8
Slika 5 Prikaz strukture N-glikana. Quast I, Peschke B, Lünemann JD. Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. Cell Mol Life Sci 2017; **74**: 837–847. 9
Slika 6. Prikaz sijalinskih kiselina NeuAc (gore) i NeuGc (dolje). Plavom bojom je označen kisik koji razlikuje te sijalinske kiseline. Varki, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. Nature 446, 1023-1029 (2007). 10
Slika 7. Grafički prikaz afinitetne kromatografije izrađen prema https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/affinity-chromatography/troubleshooting.html 13
Slika 8. Shematski prikaz MALDI-TOF MS. Na slici je vidljiv laser koji djeluje na ploču s kristaliziranim uzorkom i matricom. Nabijeni analit putuje u TOF analizatoru gdje ga elektrode djelovanjem visoke voltaže (prikazano žuto) odbijaju prema reflektronskom detektoru. 16
Slika 9. Kromatogram elucije IgG iz seruma zdravog štakora (jedan uzorak). Prvi pik predstavlja proteine koji se nisu vezali za kolonu, a drugi pik predstavlja IgG koji se vezao i eluirao s kolone. 27

Slika 10. Kromatogram elucije IgG iz seruma zdravog štakora (četiri objedinjena štakorska seruma). Prvi pik predstavlja proteine koji se nisu vezali za kolonu, a drugi pik predstavlja IgG koji se vezao i eluirao s kolone. 27
Slika 11. Prikaz oglednog SDS PAGE gela na kojem su razdvojeni izolati afinitetne monolitske kromatografije. Kao marker je korišten standard molekulskih masa (M) Roti-Mark TRICOLOR. Stupci 1 i 2 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (1) i nevezanog materijala (2) uzorka 1. Stupci 3 i 4 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (3) i nevezanog materijala (4) uzorka 2. Stupci 5 i 6 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (5) i nevezanog materijala (6) uzorka 3. Stupci 7 i 8 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (7) i nevezanog materijala (8) uzorka 4. Stupci 9 i 10 predstavljaju frakciju izoliranog IgG (9) i nevezanog materijala (10) objedinjenog uzorka seruma 1 do 4. HC – teški lanac od engl. heavy chain; LC – laki lanac od engl light chain. 29
Slika 12. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B). 31
Slika 13. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B). 33
Slika 14. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B). 35
Slika 15. MALDI TOF maseni spektar peptida teškog lanca IgG2a štakora, strelica označava najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B). 37
Slika 16. MALDI TOF maseni spektar teškog lanca IgG2c štakora. (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B). 39
Slika 17. MALDI TOF maseni spektar *kappa* lakog lanca IgG, strelicom je označen najintenzivniji pik (A). Pokrivenost sekvence *kappa* lakog lanca

IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B). 40
Slika 18. MALDI TOF maseni spektar teškog lanca IgG2a štakora. (A). Pokrivenost sekvence IgG iz baze podataka eksperimentalnim podacima označena je crvenom bojom (B). 42
Slika 19. Legenda glikana. 44
Slika 20. Ogledni MALDI-TOF maseni spektar N vezanih glikana IgG izoliranih iz seruma zdravog štakora. 45
Slika 21. Ogledni MALDI-TOF maseni spektar N vezanih glikana IgG izoliranih iz seruma zdravog štakora. 48

9 Popis tablica

Tablica 1. Koncentracija (mg/ml) izotipova imunoglobulina u serumu štakora u normalnim uvjetima. Preuzeto s www.labome.com/method/Rat_Antibody 3
Tablica 2. Usporedba svojstava monolitnih kolona i kolona s čestičnom stacionarnom fazom. 14
Tablica 3. Popis eksperimentalnih masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; Man – manoza; GlcNAc – N-acetilglukozamin; NeuAc – sijalinska kiselina..... 46
Tablica 4. Popis eksperimentalnih masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Predložene strukture nisu moguće glikoforme IgG. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; NeuAc – sijalinska kiselina 47
Tablica 5. Popis eksperimentalnih masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; Man – manoza; GlcNAc – N-acetilglukozamin; NeuAc – sijalinska kiselina..... 49
Tablica 6. Eksperimentalna masa (m/z) glikana dobivenih pomoću MALDI TOF uređaja, mase glikoformi (m/z), razlika između eksperimentalnih masa i masa glikoformi (Da) i predložene strukture glikana dobivene bazom podataka Glycomod. Predložene strukture nisu moguće glikoforme IgG. Hex - heksoza; HexNAc – N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin; Deoksiheksoza – fukoza; NeuAc – sijalinska kiselina. 50

Diplomski rad izrađen je na opremi kupljenoj u sklopu projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci" sufinanciran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.

OSOBNE INFORMACIJE

Car Iris

Vinodolska 25, 51260 Crikvenica (Hrvatska)

+385992420506

irisxcar@gmail.com

Datum rođenja 22/04/1994 | Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

2012–2018

Aquarium Crikvenica, Crikvenica (Hrvatska)

2015–2017 Demonstator na kolegiju "Analitička kemija"

Voditelj kolegija: prof.dr.sc. Jasminka Giacometti

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

10/2016–danas Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska) razina 7 EKO-a

Diplomski studij: Biotehnologija u medicine
Ljetna škola "*Pathophysiology and current Public health issues";*
St. Cloud State University/ Sveučilište u Rijeci (lipanj 2017.)

07/2013–09/2016 Prvostupnik biotehnologije i istraživanja lijekova razina 6 EKO-a

Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

Pohvala: Magna cum laude

Završni rad: Molekularni mehanizmi nastanka trombocita
Mentor: doc.dr.sc. Antonija Jurak Begonja

09/2009–07/2013

Srednja škola dr. Antuna Barca, Crikvenica (Hrvatska)

Smjer: Opća gimnazija

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
njemački	C1	C1	C1	C1	C1

	Das Deutsche Sprachdiplom				
engleski	C1	C1	C1	C1	B2
talijanski	A2	A2	A2	A2	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

Govornička škola 2016. - Debatni klub Ekonomskog fakulteta u Zagrebu

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

Europske Sveučilišne Igre Zagreb Rijeka 2016. - rukovođenje Attache tima (45 osoba)

Ribroo kamp za brucoše, 2016.-2017. - pomoć pri organizaciji sportskog dijela Ribroo

Adria Hydrofoil Team, 2016.-2017. - studentski projekt Tehničkog fakulteta u Rijeci, Hydrocontest natjecanje, St. Tropez, Francuska, 2017.

Homo Si Teć, 2017.-2018. - pomoć pri organizaciji sportske manifestacije Homo Si Teć, koordinacija volontera

Student Day Festival, 2017.-2018. - pomoć pri organizaciji događaja, koordinacija volontera

Svjetsko sveučilišno prvenstvo u rukometu, 2018. - pomoć pri organizaciji i provođenju prvenstva, koordinacija volontera (30 osoba)

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

Vozačka dozvola

AM, B

DODATNE INFORMACIJE

Članstva

Studentski zbor Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci (SZ BIOTECH) - član 2014.-2018.

Studentski zbor Sveučilišta u Rijeci (SZSUR) - 2016.-2018.

Povjerenstvo za akreditaciju i vrednovanje studijskih programa Sveučilišta u Rijeci - 2016.-2018.

UnisportRI - predstavnik Odjela za biotehnologiju 2017.-2018.

Odjelsko vijeće (Odjel za biotehnologiju) - 2018.

Stipendije

Stipendija grada Crikvenice za nadarene studente - 2014.-2018