Vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme i imunoglobulina G

Hanić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:511517

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Maja Hanić

Vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme i imunoglobulina G

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom te je izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordanu Laucu na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za usvajanje novih znanja i vještina, tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se svojim roditeljima i prijateljima, koji su mi pružali moralnu podršku tijekom studija.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Glikoproteini i glikozilacija 1
1.2. N-glikom ljudske krvne plazme 3
1.3. N-glikom imunoglobulina G 7
1.4. Analiza N-glikana 12
2. OBRAZLOŽENJE TEME 16
3. MATERIJALI I METODE 17
3.1. Materijali 17
3.1.1. Kemikalije i enzimi 17
3.1.2. Uređaji i pribor 18
3.1.3. Priprema pufera i otopina 19
3.1.4. Ispitanici i uzorkovanje 22
3.2. Metode 22
3.2.1. Izolacija IgG iz krvne plazme pomoću monolita s proteinom G 22
3.2.1.1. Priprema uzoraka plazme i pločice monolita s proteinom G 22
3.2.1.2. Vezanje IgG i ispiranje 23
3.2.1.3. Eluacija IgG 23
3.2.1.4. Obnavljanje i čuvanje pločice monolita s proteinom G 23
3.2.1.5. Čišćenje monolita 23
3.2.2. *In solution* deglikozilacija uzoraka plazme i IgG 24
3.2.2.1. Priprema uzoraka plazme i IgG 24
3.2.2.2. Denaturacija 24
3.2.2.3. Deglikozilacija 25
3.2.3. *In solution* fluorescentno obilježavanje N-glikana 25
3.2.3.1. Obilježavanje uzoraka 25
3.2.3.2. Priprema AcroPrep GHP 0,2 µL filter pločice 25
3.2.3.3. Aplikacija i čišćenje obilježenih N-glikana 25
3.2.3.4. Eluacija 2-AB obilježenih glikana 26
3.2.4. UPLC-HILIC analiza N-glikana proteina plazme 26
3.2.5. UPLC - HILIC analiza N-glikana IgG 28
3.2.6. Analiza podataka 29
4. REZULTATI I RASPRAVA 31
4.1. Vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme 31
4.2. Vremenska stabilnost N-glikoma IgG 39
5. ZAKLJUČCI 47

6. LITERATURA 48
7. SAŽETAK/SUMMARY 53
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Popis kratica

2-AB	2 - aminobenzamid
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (ADCC, engl. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)
B	glikani s račvajućim N-acetilglukozaminom
DMSO	dimetilsulfoksid
F	fukozilirani glikani
Fab	fragment koji veže antigen (engl. *Antigen binding fragment*)
Fc	kristalizirajući fragment (engl. *Fragment crystallizable*)
G0	agalaktozilirani glikani
G1	monogalaktozilirani glikani
G2	digalaktozilirani glikani
G3	trigalaktozilirani glikani
G4	tetragalaktozilirani glikani
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GP	kromatografski vršak, pik (engl. *Glycan peak*)
GU	glukozne jedinice (engl. *Glucose units*)
HAc	octena kiselina, ledena
HILIC	kromatografija hidrofilnih interakcija
HPAEC-PAD	anion-izmjenjivačka kromatografija visoke djelotvornosti s pulsirajućom amperometrijskom detekcijom (engl. *High performance anion-exchange with pulsed amperometric detection*)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*)
IgG	imunoglobulin G
IQR	interkvartilni raspon
M	medijan
Max	maksimalna vrijednost
Min	minimalna vrijednost
MS	masena spektrometrija
Neu5Ac	N-acetilneuraminska kiselina, sijalinska kiselina
PB	2 - pikolin boran
PBS	fosfatni pufer s dodatkom soli (engl. *Phosphate buffered saline*)

S	sijalinizirani glikani
SDS	natrijev dodecil sulfat
sLe^x	sijalil-Lewis x epitop
TRIS	trihidroksimetil aminometan
UPLC	tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. *Ultra performance liquid chromatography*)

1. UVOD

1.1. Glikoproteini i glikozilacija

Mnogi proteini, naročito u eukariotskim stanicama, modificirani su dodatkom ugljikohidrata u procesu zvanom glikozilacija, a tako modificirani proteini nazivaju se glikoproteini (Cooper i sur., 2010). Sve stanice i širok spektar proteina u prirodi nosi kovalentno vezane ugljikohidrate (monosaharide) ili ugljikohidratne lance (oligosaharide, polisaharide), koji se jednom riječju nazivaju glikani (Varki i sur., 2009). Glikoproteini se mogu izlučivati iz stanica ili biti smješteni na staničnoj membrani te mogu posredovati u interakcijama između stanica, stanica i matriksa, te stanica i drugih molekula, što je važno za razvoj i funkciju višestaničnog organizma. Nadalje, glikani su važni za pravilno smatanje proteina u endoplazmatskom retikulumu te usmjeravanju proteina u odgovarajuće stanične odjeljke (Cooper i sur., 2010; Varki i sur., 2009). Mnogi citosolni i jezgreni proteini također su glikozilirani, gdje mogu imati regulatornu ulogu (Varki i sur., 2009).

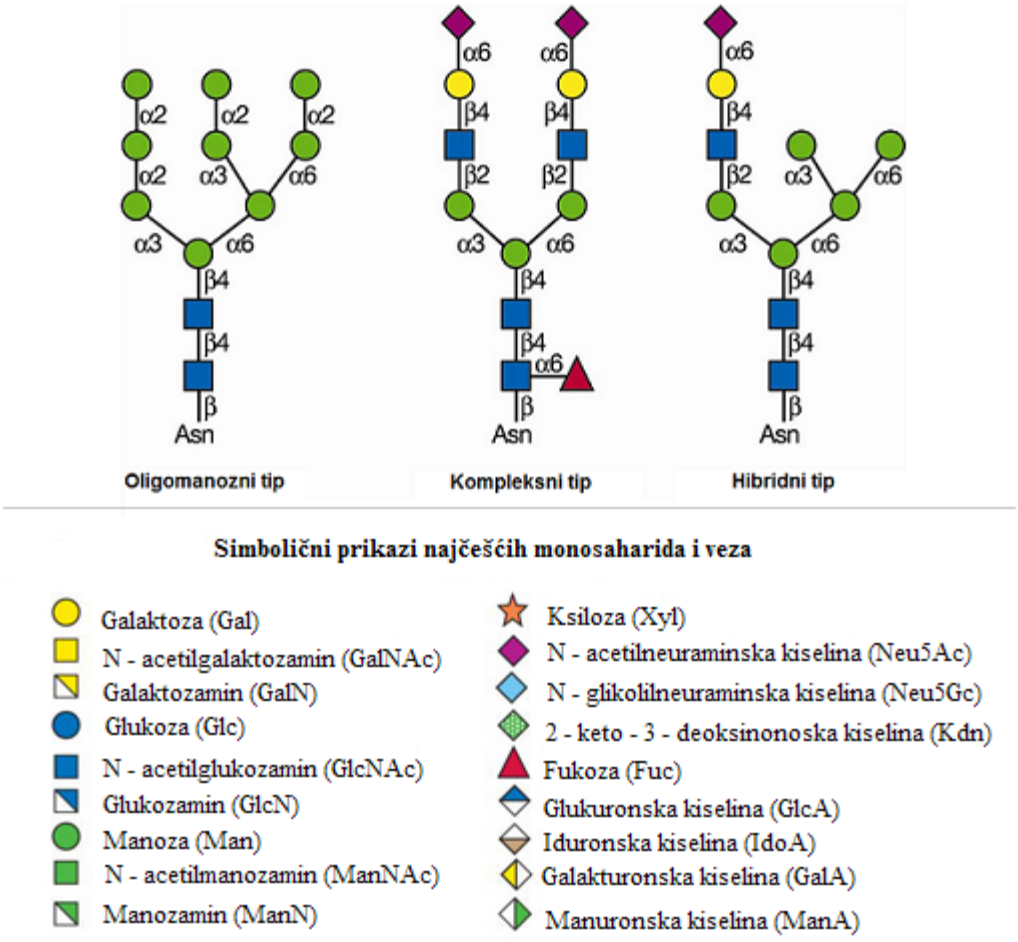
Glikoprotein je vrsta glikokonjugata u kojem protein (aglikon) nosi jedan ili više glikana, kovalentno vezanih za polipeptidnu okosnicu, najčešće N ili O glikozidnom vezom.

N-glikan (N-vezani oligosaharid) je ugljikohidratni lanac, koji je preko N-acetil glukozaminskog ostatka (GlcNAc) kovalentno vezan za asparaginski ostatak polipeptidne okosnice, unutar Asn-X-Ser/Thr slijeda (X je bilo koja aminokiselina osim prolina). Svi N-glikani dijele pentasaharidnu srž ($Man_3GlcNAc_2Asn$) te se mogu podijeliti u tri glavne grupe: oligomanozni (visokomanozni) tip, kompleksni tip i hibridni tip (**Slika 1.**).

O-glikan (O-vezani oligosaharid) je ugljikohidratni lanac, koji je najčešće preko N-acetilgalaktozamina (GalNAc) vezan za hidroksilnu skupinu serinskog ili treoninskog ostatka polipeptidne okosnice.

Za razliku od proteina, glikani nisu izravno kodirani u genomu te su stoga sekundarni genski produkti. Najmanje 10% ljudskog genoma (Lauc i sur., 2014) zaduženo je za produkciju enzima i transportera potrebnih u biosintezi glikanskih struktura, najčešće tijekom kotranslacijskih i posttranslacijskih modifikacija proteina. Stoga, glikani mogu postojati u velikom broju strukturnih kombinacija, koje su odraz aktivnosti enzima glikozil-transferaza i glikozidaza. Ovi enzimi međusobno se natječu za supstrate te je njihova unutarstanična lokalizacija vrlo organizirana, što doprinosi strukturnoj različitosti glikana (Varki i sur., 2009). Također, struktura ovisi i o dostupnosti prikladnih monosaharida, nukleotidnih šećera, ali i trodimenzionalne strukture proteina na glikozilacijskom mjestu (Royle i sur., 2006).

Bilo koji glikan vezan na određeni protein, koji je sintetiziran od strane jedne vrste stranica, može postojati u više strukturnih varijanti što se naziva fenomenom mikroheterogenosti. Stoga određeni protein, kodiran jednim genom, može imati različite glikoforme, koje čine poseban molekularni entitet. Smatra se da je svrha mikroheterogenosti generiranje biološke raznolikosti te obrana od patogena i parazita (Varki i sur., 2009).



Slika 1. Tri glavna tipa N-glikana vezanih za Asn polipetidnog lanca unutar Asn-X-Ser/Thr slijeda i simbolični prikaz najčešćih monosaharida.. Svaki glikan sadrži $Man_3GlcNAc_2Asn$ pentasaharidnu srž (preuzeto i izmijenjeno iz Varki i sur., 2009).

1.2. N-glikom ljudske krvne plazme

Glikom, u širem smislu, predstavlja sve glikanske strukture koje se mogu naći unutar jednog organizma. Stoga, N-glikom ljudske krvne plazme predstavlja sve glikane koji se mogu pronaći u krvnoj plazmi čovjeka. Gotovo su svi izvanstanični proteini viših eukariota glikozilirani (Apweiler i sur., 1999) te jedan protein može postojati u više glikoformi, čime se odražavaju biokemijski i fiziološki uvjeti u kojima se nalazi određeni tip stanice u trenutku sinteze određenog proteina. Promjene u glikozilaciji dokazane su kod različitih akutnih i kroničnih upalnih bolesti (Gornik i Lauc, 2008; Higai i sur., 2005), na glavnim plazmatskim proteinima poput α1-kiselog glikoproteina, IgG, IgA, transferina, haptoglobina, α2-makroglobulina, C-reaktivnog proteina i ostalima. Analiziranje ovih promjena može imati veliku vrijednost u potencijalnoj dijagnostičkoj i prognostičkoj uporabi. No određivanje strukture glikana još uvijek je prezahtjevno za većinu kliničkih laboratorija te treba uložiti trud za pronalazak jednostavnijih analitičkih metoda (Gornik i Lauc, 2008).

Promjena u N-glikozilaciji proteina plazme primijećena je i kod različitih malignih oboljenja, poput karcinoma dojke, gdje je uočen značajan rast u sijalinizaciji, grananju i fukozilaciji vanjske grane glikana [fukoza vezana za GlcNAc preko α(1→3/4) veze] te značajno smanjenje količine oligomanoznih struktura i biantenarnih glikana sa sržnom fukozom (Saldova i sur., 2014). Kod pacijenata s hepatocelularnim karcinom primijećena je povećana fukozilacija vanjske grane u triantenarnim i tetraantenarnim N-glikanima proteina plazme, a razina fukozilacije vanjske grane N-glikana i plazmatska koncentracija trombocita, koja reflektira oštećenje jetrene funkcije, omogućuju razlikovanje pacijenata s hepatocelularnim karcinomom i pacijenata s cirozom jetre (Tanabe i sur., 2008). Kod pacijentica s uznapredovalim karcinomom jajnika primijećene su značajne promjene u N-glikomu plazme, poput porasta agalaktoziliranih glikana biantenarne strukture (FA2) s povećanom fukozilacijom srži glikana. Opažen je i porast razine sijalil-Lewis x epitopa (sLe^x, Neu5Ac α2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc-R), povećano grananje glikana i sijalinizacija, što je najvjerojatnije posljedica kronične upale koja se često javlja kod karcinoma (Saldova i sur., 2007). Karcinom prostate i benignu hiperplaziju prostate važno je rano razlikovati i dijagnosticirati, a pokazano je da je kod pacijenata s karcinomom prostate značajno povećana razina biantenarnih glikana s sržnom fukozom i α(2→3) vezanih sijalinskih kiselina u odnosu na pacijente s benignom hiperplazijom prostate (Saldova i sur., 2011).

Razvojem novih metoda, napravljena je prva velika studija varijabilnosti N-glikoma plazme na razini populacije, na uzorku od 1008 ispitanika. Studija je pokazala veliku biološku

varijabilnost N-glikoma plazme (medijan = 6,17) na razini populacije, ali i značajne razlike u profilu glikana vezane uz spol ili dob osobe (Knežević i sur., 2009). Nasljednost glikana vrlo je varirala među pojedinim glikanskim strukturama, što ukazuje na to da utjecaj i značaj genetske kontrole i okolišnih čimbenika također varira između različitih glikana. Također su uočene značajne razlike ovisne o spolu i starosti osoba. Druga studija (Knežević i sur., 2010) ispitivala je učinak starenja, indeksa tjelesne mase, lipidnog profila i pušenja na N-glikom plazme. Sa starenjem raste razina agalatoziliranih glikana, a smanjuje razina digalaktoziliranih biantenarnih glikana, kojima pak raste sijalinizacija. Fukozilacija je imala suprotne učinke kod muškaraca i žena. Pokazano je da je razina nekih glikana ovisna i o spolu. Povećano grananje glikana i njihova galaktozilacija bilo je povezanoa s lipidnim statusom te gotovo neovisna o starosti osobe, dok je sijalinizacija biantenarnih struktura bila povezana i sa starošću i s indeksom tjelesne mase. Pušenje je bilo povezano s povećanim grananjem glikana i smanjenom fukozilacijom srži glikana.

Kako je uočena biološka varijacija N-glikoma plazme na razini populacije bila veća od promjena koje su uočene pri nekim bolestima, bilo je važno ispitati vremensku stabilnost N-glikoma plazme (Gornik i sur., 2009). Pokazano je da je vremenska stabilnost N-glikoma plazme kod svakog zdravog ispitanog pojedinca vrlo dobra te da je promjena u profila glikana pojedinca odraz okolišnih čimbenika i patoloških stanja. Time se moglo zaključiti da je profil glikana pod snažnom genskom kontrolom, iako glikani nisu primarni genski produkt (Gornik i sur., 2009).

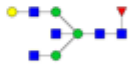
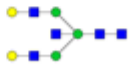
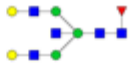
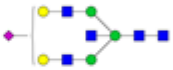
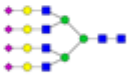
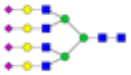
Napravljena je i studija koja je uključivala djecu i adolescente, a u kojoj je otkriveno da se N-glikom plazme i imunoglobulina G (IgG) značajno razlikuje od onog u odraslih te da se dinamičnije mijenja tijekom djetetova rasta (Pučić i sur., 2012).

Lijekovi poput oralnih kontraceptiva, nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIL) i oralnih steroida mogu utjecati na promjene u glikozilaciji N-glikoma plazme. Uporaba oralnih kontraceptiva (kombinacija estrogena i progesterona ili samo progesteron) povezana je s porastom biantenarnih glikana sa sržnom fukozom (Saldova i sur., 2012). Za estrogen je poznato da ima protuupalna svojstva (Vegeto i sur., 2002). Primjena protuupalnih lijekova (acetilsalicilna kiselina, ostali NSAIL i oralni steroidi) povezana je s značajnim smanjenjem biantenarnih i triantenarnih glikana sa sržnom fukozom i fukozom na vanjskoj grani (uključujući i sLe^x) te oligomanoznih struktura, što ukazuje na protuupalni učinak protuupalnih lijekova. Hormoni i protuupalni lijekovi povezani su s promjenama u glikozilaciji proteina plazme na način da moduliraju upalni odgovor, što rezultira promjenama u glikozilacijskim putevima. Biantenarni glikani sa sržnom fukozom dolaze prvenstveno od

IgG, pa smanjenje ili povećanje razine ovih glikana ukazuje na modulaciju imunosnog odgovora, uzrokovanu hormonima i protuupalnim lijekovima. Također, ovi podaci ukazuju na važnost korigiranja razine glikana koji se mogu koristiti kao biomarkeri, za faktor učinka kojeg ovi lijekovi uzrokuju.

U **Tablici 1.** prikazane su najzastupljenije glikanske strukture u N-glikomu ljudske plazme, a koje su određene masenom spektrometrijom (MS) i egzoglikozidaznim digestijama. Svakom kromatografskom vršku odnosno piku, pridružena je odgovarajuća glikanska struktura. Pripadajući reprezentativni kromatogram može se pronaći u poglavlju 4.1. (**Vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme)**.

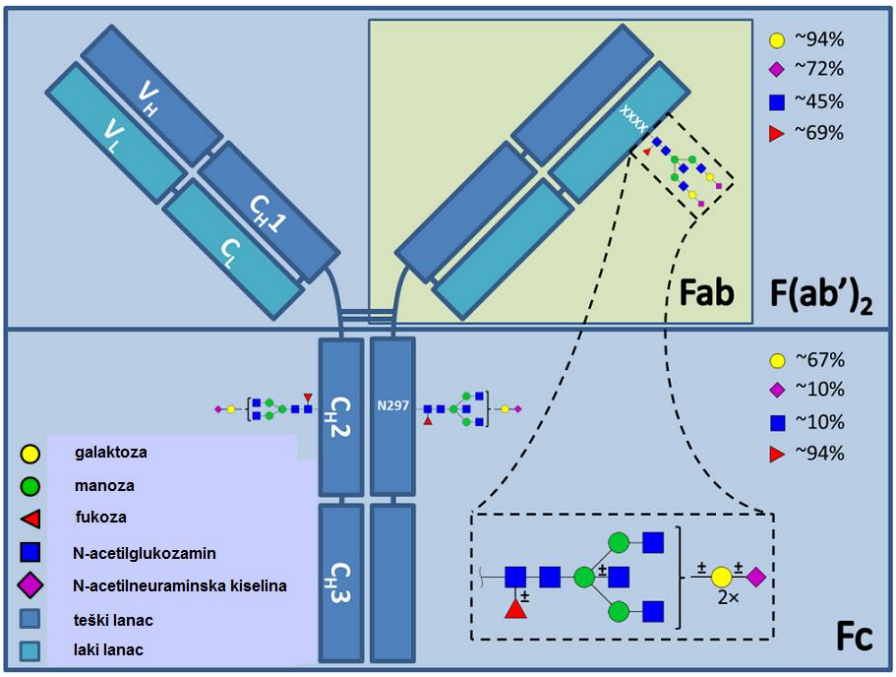
Tablica 1. Najzastupljenije glikanske strukture N-glikoma plazme. Svi glikani sastoje se od srži koju čine dva GlcNAc i tri manoze. F – fukoza α(1→3/4) vezana za granu (GlcNAc) ili sržna fukoza α(1→6) vezana na proksimalni GlcNAc, Mx – broj (x) manoza vezanih na GlcNAc srži glikana, Ax- broj (x) grana (GlcNAc) na trimanozil jezgri, Gx – broj (x) β(1→4) vezanih galaktoza na granama, Sx – broj (x) α(2→4/6) vezanih sijalinskih kiselina za galaktozu.

Pik	Struktura		Pik	Struktura	
GP1	FA2		GP21	A2BG2S2	
GP2	FA2B		GP22	FA2G2S2	
GP3	A2[6]BG1		GP23	FA2BG2S2	
GP4	FA2[6]G1		GP24	A3G3S2	
GP5	FA2[3]G1		GP25	A3BG3S2	
GP6	FA2[6]BG1		GP26	A3G3S2	
GP7	M6		GP27	A3G3S3	
GP8	A2G2		GP28	A3G3S3	
GP9	A2BG2		GP29	FA3G3S3	
GP10	FA2G2		GP30	A3G3S3	
GP11	FA2BG2		GP31	FA3G3S3	
GP12	A2[3]BG1S1		GP32	A3F1G3S3	
GP13	FA2[3]G1S1		GP33	A4G4S3	
GP14	A2G2S1		GP34	A4G4S3	
GP15	A2BG2S1		GP35	A4F1G3S3	
GP16	FA2G2S1		GP36	A4G4S4	
GP17	FA2BG2S1		GP37	A4G4S4	
GP18	A2G2S2		GP38	A4G4S4	
GP19	A3G3S1		GP39	A4F1G4S4	
GP20	A2G2S2				

1.3. N-glikom imunoglobulina G

Imunološki sustav viših kralježnjaka ima sposobnost prepoznavanja ogromnog broja stranih molekula odnosno antigena, čime pruža zaštitu organizma od infektivnih agensa. Imunološki odgovor može biti posredovan B ili T limfocitima. B limfociti izlučuju imunoglobuline koji prepoznaju topljive antigene dok T-limfociti izlučuju receptore T-stanica. Sisavci stvaraju pet tipova imunoglobulina odnosno IgM, IgG, IgE, IgD i IgA.

Najzastupljeniji među njima je imunoglobulin G (IgG) čija je serumska koncentracija otprilike 10 mg/mL (Arnold i sur., 2007). IgG je ujedno i najproučavaniji glikoprotein. Građen je od dva teška lanca (γ-lanci) koji se sastoje od tri konstante regije (C_H1, C_H2 i C_H3) i jedne varijabilne regije (V_H). Za svaki teški lanac, disulfidnim mostom, vezan je laki lanac (λ ili κ) građen od jedne konstantne C_L regije i varijabilne V_L regije. Postoje četiri potklase IgG čiji geni sadrže različita C-područja koja kodiraju za konstantnu regiju lanca (IgG1-4) te se razlikuju u položaju disulfidnih mostova. U molekuli IgG razlikuju se dva fragmenta, a to su dvije regije koje vežu antigen odnosno F(ab)'$_2$ (Fab, engl. *Antigen binding fragment*) i kristalizirajući fragment (Fc, engl. *Fragment crystallizable*) (**Slika 2.**). Fc fragment zadužen je za uništavanje stranih tijela interakcijom s različitim Fc receptorima.



Slika 2. Shematski prikaz IgG i N-glikana. Označeni su Fab i Fc fragmenti. Prikazani su postoci galaktoziliranih, sijaliniziranih, fukoziliranih glikana te glikana s račvajućim GlcNAc za svaki fragment. Izdvojeno je prikazana pentasaharidna srž N-glikana Fab fragmenta s mogućim dodacima (preuzeto i izmijenjeno iz Bondt i sur., 2014).

N-glikani prisutni su na visoko-konzerviranom asparaginskom ostatku 297 (Asn^{297}) svake C_H2 domene, a sastoje se od pentasaharidne srži ($Man_3GlcNAc_2Asn$) koja je modificirana drugim monosaharidima (galaktozom, sijalinskom kiselinom, račvajućim N-acetilglukozaminom, sržnom fukozom). Male promjene u strukturi ovih glikana mogu uzrokovati velike promjene u afinitetu efektornih liganada za Fc domenu. Ti efektorski ligandi uključuju tri tipa strukturno homolognih staničnih receptora (FcγRI, FcγRII, FcγRIII), C1q komponentu sustava komplementa i neonatalni Fc receptor, koji aktiviraju upalni odgovor koji uključuje staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (ADCC, engl. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ili citotoksičnost ovisnu o komplementu (CDC, engl. *complement-dependent cytotoxicity*) (Liu, 2015). Tako dodatak fukoze proksimalnom GlcNAc srži glikana (tzv. sržna fukoza) mijenja konformaciju Fc fragmenta na način da mu se izrazito smanji sposobnost vezanja za FcγRIIIa (CD16) receptor koji je primarno eksprimiran na NK-stanicama (engl. *Natural killer cells*). Vezanjem IgG preko Fc fragmenta za navedeni receptor, inicira se stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (ADCC), a koja rezultira destrukcijom ciljne stanice obložene protutijelima. Stoga nešto više od 95% poliklonalnog IgG sadrži sržnu fukozu, kako bi se prevenirala nepoželjna aktivnost ADCC (preuzeto iz Gornik i sur., 2012). Neodgovarajuća regulacija ovog procesa može dovesti do autoimunih oboljenja (previsoka aktivnost ADCC) ili karcinoma (preniska aktivnost ADCC). Otkriveno je da još neke strukturne modifikacije, poput sijalinizacije N-glikana Fc fragmenta, mogu odrediti hoće li IgG djelovati protuupalno ili proupalno. Uz prisutnost potencijalnog patogena, odnosno antigena, IgG protutijela mogu prijeći iz populacije povećane sijalinizacije (protuupalno stanje) u populaciju smanjene sijalinizacije odnosno proupalno stanje, čime se potiče zaštitni upalni odgovor, posredovan Fcγ receptorima na efektorskim stanicama (Kaneko i sur., 2006). Protuupalna svojstva mogu biti posredovana i galaktozilacijom glikana Fc fragmenta. Visoko galaktozilirani N-glikani IgG1 u imunokompleksima, blokiraju proupalnu funkciju sustava komplementa te kao takvi mogu služiti kao povratna sprega koja kontrolira sustav komplementa i upalu uzrokovanu kemokinima u autoimunim bolestima i infekcijama, prije nego IgG prijeđe u proupalnu agalaktoziliranu glikoformu (Karsten i sur., 2012). Fc fragment je dosad dobro istražen te su promjene u glikozilaciji ove domene povezane s bolestima poput reumatoidnog artritisa i primarnog osteoartritisa (Parekh i sur., 1985).

Za razliku od Fc fragmenta, manje se zna o N-glikanima Fab fragmenta, koje nosi otprilike 15-20% poliklonalnog IgG (Jefferis, 2005). N-glikani Fab fragmenta biantenarne su strukture i utječu na afinitet IgG za antigen (Coloma i sur., 1999), ali su više galaktozilirani

(Holand i sur., 2005), više sijalinizirani te je veći postotak glikana s račvajućim GlcNAc, za razliku N-glikana Fc domene (Anumula, 2012).

Ove spoznaje važne su za razvoj rekombinantnih protutijela koja predstavljaju novu, veliku skupinu lijekova za liječenje malignih ili autoimunih oboljenja. Njihova učinkovitost ovisi strukturnim karakteristikama, posebno glikozilaciji, koja utječe na stvaranje kompleksa s ciljnim molekulama i aktivaciju efektorskih mehanizama koji sudjeluju u eliminaciji ciljne molekule (Jefferis, 2005).

Kao što je rečeno, promijenjena glikozilacija IgG povezana je s različitim bolestima te može dobro korelirati s različitim fazama bolesti (aktivna faza ili remisija). Dokazano je da kod reumatoidnog artritisa raste koncentracija N-glikana kojima nedostaje galaktoza (agalaktozilirani glikani) te je zanimljivo da je kod trudnica uočeno poboljšanje ove autoimune bolesti, zbog porasta galaktoziliranih glikana (van de Geijn, 2009). Abnormalno visoka razina agalaktoziliranih N-glikana povezana je i s Chronovom bolešću, sistemskim eritemskim lupusom i tuberkulozom (Arnold i sur., 2007).

Pučić i sur. (2011) utvrdili su vrlo veliku varijabilnost između pojedinaca u N-glikomu IgG, u tri izolirane ljudske populacije, te je utvrđena varijabilnost bila tri puta veća od one uočene kod N-glikoma ljudske plazme (Knežević i sur., 2009). Utvrđene varijacije posljedica su kombinacije genetskih razlika i okolišnih čimbenika, a ukazuju na to da koncentracija različitih plazmatskih proteina maskira kompleksnu regulaciju glikozilacije pojedinog proteina (Lauc i sur., 2014). U istoj studiji pokazano je da je nasljednost IgG glikana otprilike između 30% i 50% odnosno da je nasljednost N-glikoma je vrlo visoka, unatoč nedostatku izravnog genetičkog kalupa, što ukazuje na epigenetičku regulaciju. Uočena je veza između promjene u glikozilaciji IgG i starosti pojedinca odnosno rast agalaktoziliranih struktura i struktura s račvajućim GlcNAc s povećanjem starosti osoba. Za razliku od opažanja kod ljudske plazme, kod IgG nije došlo do promjene u fukozilaciji srži N-glikana te je s povećanjem godina dolazilo do smanjenja sijalinizacije, što pak nije utvrđeno kod proteina plazme. Spol je bio značajni pokazatelj samo za neke glikanske strukture N-glikoma IgG, dok je kod plazme igrao važnu ulogu za veći broj glikana.

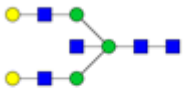
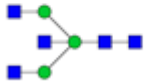
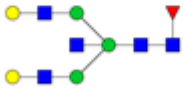
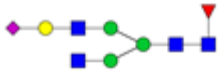
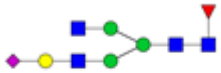
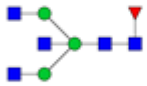
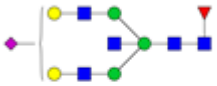
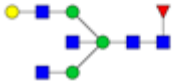
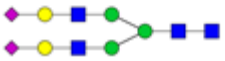
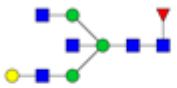
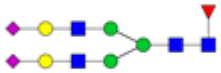
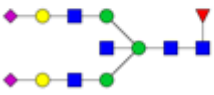
Krištić i sur. (2014) proveli su opsežno istraživanje na 5117 pojedinaca, analizirajući njihovu IgG glikozilaciju te su utvrdili vrlo kompleksne obrasce promjene u glikozilaciji IgG povezane s godinama. Predložili su indeks (GlycanAge indeks) koji na temelju tri glikanske strukture (FA2B, FA2G2 i FA2BG2) predviđa kronološku i biološku dob pojedinca te je bolje povezan s biološkom dobi od, primjerice, duljine telomera. Dakle, najizraženija povezanost opažena je u dobi pojedinca i razini galaktozilacije. Agalaktozilirani glikani postojano rastu s

povećanjem dobi pojedinca, dok se razina digalaktoziliranih glikana smanjuje. Promjena razine monogalaktoziliranih glikana bila je nešto kompleksnija te su neke od ovih glikanskih struktura rasle ili se smanjivale, ovisno o položaju galaktoze i račvajućeg GlcNAc, te je promjena bila izraženija kod žena. Iako je nekoliko studija potvrdilo da se galaktozilacija IgG smanjuje s povećanjem dobi osobe, kod djece i adolescenata je pokazano suprotno tj ona raste čak i do kasnih dvadesetih godina života (Pučić i sur., 2011). S obzirom da agalaktozilirana glikoforma IgG promovira upalu (Karsten i sur., 2012), čini se da promjene u glikozilaciji IgG predstavljaju faktor koji doprinosi starenju. Mogućnost mjerenja biološke dobi ljudi, uporabom molekulskog profiliranja, ima praktičnu uporabu u prevenciji bolesti i liječenju ili pak forenzici.

U **Tablica 2.** prikazane su najzastupljenije glikanske strukture u N-glikomu poliklonalnog IgG, a koje su određene masenom spektrometrijom i egzoglikozidaznim digestijama. Svakom kromatografskom vršku odnosno piku, pridružena je odgovarajuća glikanska struktura. Pripadajući reprezentativni kromatogram može se pronaći u poglavlju 4.2. (**Vremenska stabilnost N-glikoma IgG).**

Tablica 2. Najzastupljenije glikanske strukture N-glikoma poliklonalnog IgG.

Svi glikani sastoje se od srži koju čine dva GlcNAc i tri manoze. F – sržna fukoza vezana α(1→6) vezom na proksimalni GlcNAc, Mx – broj (x) manoza vezanih na GlcNAc srži glikana, Ax- broj (x) grana (GlcNAc) na trimanozil jezgri, Gx – broj (x) β(1→4) vezanih galaktoza na granama, Sx – broj (x) α(2→4/6) vezanih sijalinskih kiselina na galaktozi.

Pik	Struktura		Pik	Struktura	
GP1	FA1		GP13	A2BG2	
GP2	A2		GP14	FA2G2	
GP3	A2B		GP15	FA2BG2	
GP4	FA2		GP16a	FA2[6]G1S1	
GP5	M5		GP16b	FA2[3]G1S1	
GP6	FA2B		GP17	A2G2S1	
GP7	A2[3]G1		GP18a	A2BG2S1	
GP8a	A2BG1		GP18b	FA2G2S1	
GP8b	FA2[6]G1		GP19	FA2BG2S1	
GP9	FA2[3]G1		GP20	Nije definiran	/
GP10	FA2[6]BG1		GP21	A2G2S2	
GP11	FA2[3]BG1		GP22	A2BG2S2	
GP12	A2G2		GP23	FA2G2S2	
			GP24	FA2BG2S2	

1.4. Analiza N-glikana

U analizi profila i strukture glikana, koriste se različite kemijske i enzimske reakcije te analitičke tehnike, a odabir metode najčešće ovisi o količini i čistoći materijala te njegovom izvoru. Metode za početnu detekciju glikana u glikokonjugatima su direktne kemijske reakcije s monosaharidima glikana, radioaktivno obilježavanje ili obilježavanje s kemijski reaktivnim monosaharidima, te detekciju s različitim lektinima ili protutijelima. Potom se može pristupiti profiliranju odnosno određivanju količine strukturno različitih glikana prisutnih u glikokonjugatu. Profiliranje se provodi uglavnom kromatografskim tehnikama (HPAEC-PAD, HPLC, UPLC), a individualne frakcije mogu se dodatno analizirati masenom spektrometrijom (MS) ili nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR). No prije tih metoda glikane treba osloboditi iz glikokonjugata (hidrazinolizom kemijskim putem ili enzimskim putem) te fluorescentno obilježiti (Varki i sur., 2009).

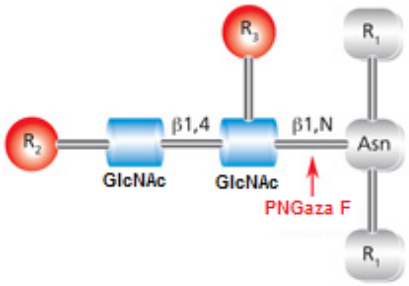
U ovom radu, iz krvne plazme bilo je potrebno izolirati IgG kako bi se mogli analizirati pripadajući N-glikani. To je učinjeno uz pomoć monolita s proteinom G.

Kombinacija afinitetne kromatografije (temeljena na specifičnoj interakciji bioloških molekula i liganada) i monolitnog kromatografskog materijala pokazala se pogodnom u pročišćavanju bioloških molekula odnosno proteina. Monolit je tip stacionarne faze, čija je struktura zapravo mreža vrlo dobro povezanih velikih pora i kanala te se stoga razlikuje od ranijih stacionarnih faza koje su činile čestice, a koje su se pokazale neadekvatnima u odjeljivanju velikih biomolekula (poput IgG). Ovi kanali i pore osiguravaju veliku površinu za adsorpciju velikih biomolekula, koje ranije nisu mogle prodrijeti u sitne pore konvencionalnog kromatografskog materijala, što je tada rezultiralo smanjenim kapacitetom vezanja te visokom razinom nespecifičnog vezanja biomolekula. Polimetakrilatni monoliti predstavljaju novu generaciju stacionarnih faza te imaju dodatna svojstva poput pH rezistencije, mehaničke rezistencije, jednostavnosti sinteze i kreiranja pora (Roberts i sur., 2009). Sadrže reaktivne epoksi grupe na koje se jednostavno mogu vezati bioafinitetni ligandi (Tetala i van Beek, 2010). Jedan od najčešće korištenih bioafinitetnih liganda je rekombinantni streptokokni protein G, kojem su ciljanom mutagenezom uklonjene domene koje vežu albumin i Fab fragment IgG, odnosno koji sadrži regiju za vezanje isključivo Fc fragmenta IgG (Goward i sur., 1990). Time je omogućena izolacija IgG, metodom koju su razvili Pučić i sur. (2011).

Deglikozilacija tj oslobađanje glikana iz glikoproteina provedena je pomoću enzima PNGaze F [peptid-*N*-(*N*-acetil-β-glukozaminil) asparagin amidaza F]. Ovaj endoglikozidazni

enzim hidrolizira sve klase N-glikana (osim onih čija srž sadrži α(1→3) fukozu, uglavnom kod biljaka) vezanih za asparagin polipeptidne okosnice (**Slika 3.**), odnosno kida amidnu vezu između proksimalnog GlcNAc i asparaginskog ostatka (Tarentino i sur., 1985).

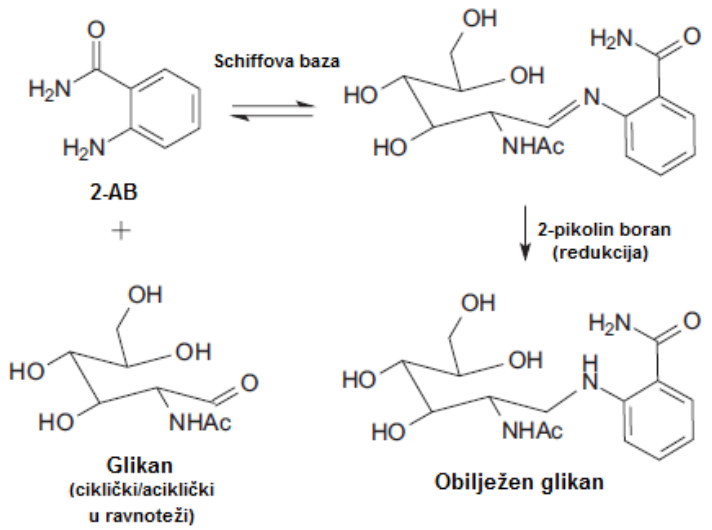
S obzirom da proteini imaju tercijarnu, a mnogi i kvarternu strukturu, postoji mogućnost da svi glikani vezani za protein nisu izloženi na površini proteina. Stoga se proteini denaturiraju, odnosno razmataju, kako bi se povećala dostupnost glikana enzimu za deglikozilaciju. U tu svrhu koristimo anionski detergent natrijev dodecil sulfat (SDS), koji još i dodatno smanjuje količinu enzima PNGaze F potrebnog za potpunu deglikozilaciju (Tarentino i sur., 1985).



Slika 3. Mjesto cijepanja i strukturni zahtjevi za PNGazu F.
R_1 – supstitucija grupama (osim -H) na N- i C- kraju asparagina, R_2 – ostatak oligosaharida ili –H, R_3 – α(1→6) vezana fukoza ili -H
(Preuzeto i izmijenjeno s http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/n-linked-glycan-strategies.html).

Za razliku od proteina, glikani ne posjeduju kromofore i ne apsorbiraju UV svjetlost, što njihovu detekciju čini otežanom. Nakon što se glikani procesom deglikozilacije odvoje od glikoproteina, moguće ih je konjugirati s fluorescentnim bojama, primjerice jednim od dva derivata anilina, 2-aminobenzamidom (2-AB) ili 2-antranilom kiselinom (2-AA). Tako obilježene glikane moguće je potom detektirati nakon separacije (HPLC, UPLC itd.) fluorescentinim detektorom. Reducirajući kraj glikana u vodenoj otopini postoji u cikličkoj i acikličkoj formi. Konjugacija glikana i 2-AB odvija se preko formiranja Schiffove baze (**Slika 4.**), reakcijom karbonilne skupine acikličkog reducirajućeg kraja N-glikana i amino skupine 2-AB. S obzirom da Schiffove baze, odnosno imini, nisu stabilni u vodenoj otopini, odmah se stabiliziraju redukcijom s 2-pikolin boranom u procesu nazvanim reduktivna aminacija.

Uz optimizirane reakcijske uvijete, obilježavanje s 2-AB je visoko učinkovito i u suštini neovisno o količini i strukturi glikana, a desijalinizacija tijekom procesa je zanemariva (www.sigmaldrich.com; Bigge i sur., 1995).



Slika 4. Obilježavanje glikana s 2-aminobenzamidom (2-AB)
(Preuzeto i izmijenjeno s www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/2/biofiles_issue6.pdf)

Metoda koja pruža poboljšano odjeljivanje i kvantifikaciju fluorescentno obilježenih glikana je kromatografija hidrofilnih interakcija (HILIC). Glavna prednost ove metode nad drugima je mogućnost razdvajanja strukturnih izomera. HILIC razdvaja neutralne i kisele glikane. Vrijeme zadržavanja glikana ovisi o njegovom hidrofilnom potencijalu, na koji utječu veličina, naboj i struktura glikana, te veze i grananja unutar glikana. Analiza glikana kromatografijom hidrofilnih interakcija stalno napreduje te se sve više za analizu glikana umjesto HPLC-HILIC koristi UPLC-HILIC metoda koja je još učinkovitija od prethodne. (Marino i sur., 2010). UPLC u odnosu na HPLC pruža povećanu rezoluciju i osjetljivost zbog stacionarne faze čiji je promjer čestica 1,7 μm, a koja može funkcionirati pod većim tlakom i povećanom brzinom protoka, bez pada rezolucije i učinkovitosti kolone. Time se smanjuje vrijeme analize i potrošnja otapala koja čine mobilnu fazu. Razvijena je BEH stacionarna faza (engl. *Bridged ethylene hybrid*) u kojoj su metilne skupile silikagela premošćene, što osigurava mehaničku stabilnost (www.chromatographyonline.com). Kao vanjski standard, koji služi za kalibraciju sustava, koristi se hidrolizat dekstrana, odnosno oligomeri glukoze obilježeni s 2-AB. Vrijeme zadržavanja svakog oligomera prevodi se u glukozne jedinice

(GU, engl. *Glucose units*) koje se koriste kao referentne standardne vrijednosti, a dobiveni podaci postaju usporedivi (Guile i sur., 1996).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikozilacija proteina složen je proces kojim nastaje širok spektar različitih glikoproteina, a koji imaju važne uloge u funkcioniranju samog organizma te su, uz čvrst utjecaj genetičkog kalupa, odraz različitih utjecaja iz okoliša te patozifioloških procesa u organizmu. Mnoge studije uočile su značajnu promjenu u glikozilaciji proteina kod različitih bolesti te predložile moguću primjenu u ranoj dijagnostici. Stoga je važno znati da li se N-glikom krvne plazme i N-glikom imunoglobulina G (IgG) zdrave osobe mijenjaju kroz vrijeme te pronaći objašnjenja za moguće promjene. Cilj ovog istraživanja je proučiti vremensku stabilnost N-glikoma krvne plazme i IgG tijekom deset dana, kod deset ispitanika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

Kemikalije	Proizvođač
2-aminobenzamid	Sigma-Aldrich, SAD
2-pikolin boran	Sigma-Aldrich, SAD
Acetonitril	Fluka, Švicarska
Amonijev bikarbonat	Fluka, Švicarska
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, SAD
Dinatrijev fosfat	Fluka, Švicarska
Igepal® CA 360	Sigma-Aldrich, SAD
Kalijev fosfat	Kemika, Hrvatska
Kalijev klorid	Kemika, Hrvatska
Klorovodična kiselina, 37%	Kemika, Hrvatska
Ledena octena kiselina	Merck, Njemačka
Mravlja kiselina	Merck, Njemačka
Natrijev hidroksid	Kemika, Hrvatska
Natrijev klorid	CARLO ERBA Reagents, Italija
Propan-2-ol	Fluka, Švicarska
SDS (natrijev dodecil sulfat)	Invitrogen Life Technologies, Japan
TRIS	Sigma-Aldrich, SAD

Enzimi	Proizvođač
PNGaza F (10 U/µL)	Promega, SAD

3.1.2. Uređaji i pribor

Uređaji i pribor	Proizvođač
AB gene PCR pločice	Thermo Scientific, SAD
ACQUITY UPLC uređaj	Waters, SAD
AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločice	Pall Corporation, SAD
AcroPrep GHP 0,45 µm filter pločice	Pall Corporation, SAD
Analitička vaga (Explorer®)	OHAUS, SAD
Centrifuga (model 5804)	Eppendorf, SAD
Filteri za pufere (Nalgene™ Rapid-Flow™, 0,2 µm)	Thermo Scientific, SAD
Inkubator (DNI-50, 37° C)	MRC, Izrael
Pećnica (DNO-50, 65° C)	MRC, Izrael
Pipete (jedno- i multikanalne)	Rainin (Mettler Toledo), SAD
Pločica monolita s proteinom G	BIA Separations, Slovenija
Pločice za sakupljanje, zapremina 1 i 2 mL (engl. 96-*well collection plates)*	Waters, SAD
Rotacijski vakuum koncentrator (model Savant™ SC210A SpeedVac™), zamka za otapalo (model Savant™ Refrigerated Vapor Traps RVT400) i vakuumska pumpa (model OFP400)	Thermo Scientific, SAD
Tresilica (model 3023)	GFL, Njemačka
Uređaj za filtriranje uz pomoć vakuuma (engl. *Vacuum Manifold*) i vakuumska pumpa	Pall Corporation, SAD

3.1.3. Priprema pufera i otopina

<table>
<tr><th>Puferi i otopine</th><th colspan="3">Priprema</th></tr>
<tr><td rowspan="6">10x PBS, pH 6,6</td><td>Soli</td><td>c [mmol/L]</td><td>γ[g/L]</td></tr>
<tr><td>NaCl</td><td>137,94</td><td>80,028</td></tr>
<tr><td>Na_2HPO_4</td><td>9,74</td><td>13,832</td></tr>
<tr><td>KH_2PO_4</td><td>2,18</td><td>2,964</td></tr>
<tr><td>KCl</td><td>2,65</td><td>1,976</td></tr>
<tr><td colspan="3">Priprema 1L pufera: Otopiti sve soli u približno 800 mL ultra-čiste vode, podesiti pH s 1M NaOH, nadopuniti ultra-čistom vodom do 1L. Filtrirati otopinu.
Čuvati na sobnoj temperaturi.</td></tr>
<tr><td>5x PBS</td><td colspan="3">Razrijediti 10x PBS u omjeru 1:2 (v/v).
Za 100 mL pufera: 50 mL 10x PBS nadopuniti s ultra-čistom vodom do 100 mL.
Čuvati na 4° C.</td></tr>
<tr><td>1x PBS, pH 7,4</td><td colspan="3">Razrijediti 10x PBS u omjeru 1:10 (v/v).
Priprema 1 L pufera: 100 mL 10x PBS nadopuniti do 900 mL ultra-čistom vodom, podesiti pH s 1M NaOH, nadopuniti ultra-čistom vodom do 1 L.
Čuvati na 4° C.</td></tr>
<tr><td>0,1M mravlja kiselina, pH 2,5</td><td colspan="3">Priprema 1 L pufera: 3, 77 mL mravlje kiseline dodati u 1 L ultra-čiste vode.
Čuvati na 4° C.</td></tr>
<tr><td>1M amonijev bikarbonat</td><td colspan="3">Priprema 100 mL otopine: 79,06 g amonijevog bikarbonata otopiti u 100 mL ultra-čiste vode.
Čuvati na 4° C.</td></tr>
<tr><td rowspan="4">20% etanol u 20mM TRIS + 0,1M NaCl, pH 7,4</td><td>Soli i baze</td><td>c [mol/L]</td><td>γ[g/L]</td></tr>
<tr><td>TRIS (Mr = 121,14 g/mol)</td><td>0,02</td><td>2,42</td></tr>
<tr><td>NaCl</td><td>0,1</td><td>5,844</td></tr>
<tr><td colspan="3">Priprema 1 L pufera: otopiti sve u 200 mL bezvodnog etanola, nadopuniti ultra-čistom vodom do 700 mL, podesiti pH s 1M HCl, nadopuniti ultra-čistom vodom do 1 L. Filtrirati. Čuvati na 4° C.</td></tr>
</table>

Puferi i otopine	Priprema
0,1M NaOH	Priprema 500 mL otopine: Otopiti 2 g NaOH u 500 mL ultra-čiste vode. Filtrirati otopinu. Čuvati na sobnoj temperaturi.
30% propan-2-ol	Priprema 500 mL otopine: U 150 mL propan-2-ola dodati 350 mL ultra-čiste vode. Filtrirati otopinu. Čuvati na 4° C.
1,33% SDS	Priprema 100 mL otopine: Otopiti 1,33 g SDS u 100 mL ultra-čiste vode. Čuvati na 4° C.
2% SDS	Priprema 100 mL otopine: Otopiti 2 g SDS u 100 mL ultra-čiste vode. Čuvati na 4° C.
4% Igepal	Priprema 50 ml otopine: Dodati 2 mL Igepal (viskozan) u 48 mL ultra-čiste vode, dobro promiješati. Čuvati na 4° C.
70% etanol	Priprema 50 mL otopine: U 35 mL bezvodnog etanola dodati 15 mL ultra-čiste vode. Uvijek svježe pripremiti.
96% acetonitril	Priprema 150 mL otopine: U 144 mL acetonitrila dodati 6 mL ultra-čiste vode. Uvijek svježe pripremiti.

<table>
<tr><th>Puferi i otopine</th><th colspan="3">Priprema</th></tr>
<tr><td rowspan="8">2 – AB otopina za obilježavanje</td><td rowspan="3"><u>Za 1 uzorak:</u></td><td>30% octena kiselina (HAc) u DMSO (v/v)</td><td>25µL
(7,5 µL HAc + 17,5 µL DMSO)</td></tr>
<tr><td>2-aminobenzamid (2-AB)
(konačna koncentracija u otopini 19,2 mg/mL)</td><td>0,48 mg</td></tr>
<tr><td>2-pikolin boran (PB)
(konačna koncentracija u otopini 44,8 mg/mL)</td><td>1,12 mg</td></tr>
<tr><td colspan="3">U DMSO dodati HAc, smjesu potom dodati u 2-AB, dobro promiješati dok se sav 2 –AB ne otopi. Otopinu dodati u PB, ponovno promiješati dok se PB ne otopi.
Otopina je nakon pripreme stabilna 1 sat.
Zaštititi od svjetla.</td></tr>
<tr><td rowspan="3"><u>Za 100 uzoraka:</u></td><td>30% HAc u DMSO (v/v)</td><td>2,5 mL
(0,75 mL HAc + 1,75 mL DMSO)</td></tr>
<tr><td>2-AB
(konačna koncentracija u otopini 19,2 mg/mL)</td><td>48 mg</td></tr>
<tr><td>PB
(konačna koncentracija u otopini 44,8 mg/mL)</td><td>112 mg</td></tr>
</table>

3.1.4. Ispitanici i uzorkovanje

U ovom ispitivanju sudjelovalo je pet zdravih muškaraca, između 30 i 45 godina starosti (medijan = 32, raspon=15) i pet zdravih žena, između 29 i 46 godina starosti (medijan 31, raspon=17). Od žena su dodatno prikupljeni podaci o menstruacijskom ciklusu. U periodu od deset dana, odnosno nulti, prvi i deveti dan, svakom od njih izvađena je krv. Krv je uzeta antikoagulans (EDTA) i centrifugirana, čime je odvojena krvna plazma i kao takva spremljena na -20° C do daljnje analize. U koracima koji su opisani u poglavlju 3.2.1. (**Izolacija IgG iz krvne plazme pomoću monolita s proteinom G**), iz dijela plazme izoliran je IgG. Time su dobivena dva seta uzoraka, krvne plazme i IgG, kojima je analiziran profil N-glikana.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija IgG iz krvne plazme pomoću monolita s proteinom G

Svi koraci u izolaciji IgG iz krvne plazme pomoću pločice monolita s proteinom G, provode se u digestoru.

3.2.1.1. Priprema uzoraka plazme i pločice monolita s proteinom G

Uzorke plazme potrebno je prvo promiješati i centrifugirati 3 minute na 13 400 okretaja/min ili 10 min na 3000 okretaja/min. Zatim se, u nasumično odabrane jažice na pločici, nanosi 50 μL standardnog uzorka plazme. Uzorci plazme volumena 100 μL razrijeđeni su 1x PBS puferom (pufer za vezanje) u omjeru 1:7 (v/v) te su naneseni na AcroPrep GHP 0,45 μm filter pločicu zapremine 1 mL i filtrirani. Filtrat se skuplja u pločicu za sakupljanje zapremine 2 mL i takav se ostavi na tresilici, dok pločica monolita s proteinom G ne bude spremna za korištenje.

Pločica monolita s proteinom G može se koristiti više puta, a dok se ne koristi, čuva se u hladnjaku na 4° C u puferu za pohranu (20% (v/v) etanol u 20mM TRIS + 1M NaCl, pH 7,4). Prije uporabe, potrebno je ukloniti pufer za pohranu te isprati jažice s 2 mL ultra-čiste vode i 2 mL 1x PBS pufera, radi rješavanja mogućih mehaničkih nečistoća. Nakon toga jažice se isperu s 1 mL 0.1M mravlje kiseline (pH 2,5), kako bi se eluirali proteini koji su eventualno zaostali prilikom posljednje izolacije. Neutraliziraju se s 2 mL 10x PBS pufera te ekvilibriraju s 4 mL 1x PBS pufera nakon čega je pločica monolita s proteinom G spremna za korištenje.

Između ovih i narednih koraka, pločica se prazni uređajem za filtriranje uz pomoć vakuuma i vakuumske pumpe. Pritom vakuum ne smije prelaziti 17 inHg ukoliko se radi o ispiranju, odnosno 10 inHg ako se radi prvom odsisavanju nakon nanošenja filtrirane plazme na pločicu monolita ili eluiranju IgG.

3.2.1.2. Vezanje IgG i ispiranje

Filtrirana plazma prenese se na pločicu monolita s proteinom G, kako bi se IgG vezao za protein G, te odsiše. Ovako odsisana plazma, može se prikupiti za daljnju analizu ili baciti u infektivni otpad.

Potom se jažice pločice isperu s po 2 mL 1x PBS pufera, tri puta.

3.2.1.3. Eluacija IgG

Pločica monolita s proteinom G stavi se iznad pločice za sakupljanje zapremine 2 mL te se u svaku jažicu doda 1 mL 0.1M mravlje kiseline, kako bi se IgG eluirao s kolone.

U kolekcijsku pločicu potrebno je brzo dodati 170 µL 1M amonijevog bikarbonata (pufer za neutralizaciju) i resuspendirati, kako bi se spriječila desijalinizacija glikana IgG u kiselom mediju. Neutralizaciju pratimo pojavom mjehurića.

3.2.1.4. Obnavljanje i čuvanje pločice monolita s proteinom G

Pločica monolita s proteinom G obnavlja se dodatkom 2 mL 0.1M mravlje kiseline, 2 mL 10x PBS pufera i 4 mL 1x PBS pufera u svaku jažicu. Potom se jažice jednom isperu s 1 mL pufera za pohranu, a zatim se doda 1 mL istog pufera koji se ne odsisava te se pločica s tako dodanim puferom za pohranu čuva u hladnjaku na 4° C do sljedeće uporabe.

Eluat se može koristiti za daljnju analizu odmah ili se nakon sušenja u rotacijskom vakuum koncentratoru pohranjuje na -20° C.

3.2.1.5. Čišćenje monolita

Upravo zato što se pločica monolita s proteinom G može upotrebljavati više puta, jažice se lako mogu začepiti radi kontaminanata (ostalih proteina) iz uzoraka koji se nisu u potpunosti eluirali s kolone. U ovom slučaju, postoji poseban protokol za čišćenje koji uspješno uklanja sve zaostale kontaminante bez kasnijeg narušavanja kapaciteta vezanja IgG za protein G.

Precipitirani proteini uklanjaju se tako da se pločica ispere s 2 mL ultra-čiste vode te se doda 1 mL 0.1M NaOH. Primjenom vakuuma dopusti se da nekoliko kapi prođe kroz kolonu te se potom ostavi da tako odstoji 8 min (NaOH smanjuje kapacitet vezanja IgG, stoga ne smije stajati na pločici duže od 10 min). Pločica se potom ispere s 4 mL ultra-čiste vode te ekvilibrira s 4 mL 1x PBS pufera.

Čvrsto vezanih hidrofobni proteini ili lipidi uklanjaju se tako da se jažice isperu s 2 mL ultra-čiste vode, zatim s 2 mL 30% (v/v) izopropanola (propan-2-ol) i 2 mL ultra-čiste vode te ekvilibriraju s 4 mL 1x PBS pufera. Pločica se dalje čuva u puferu za pohranu, kako je ranije opisano (poglavlje 3.2.1.4.).

3.2.2. *In solution* deglikozilacija uzoraka plazme i IgG

3.2.2.1. Priprema uzoraka plazme i IgG

Uzorci plazme najprije se promiješaju i centrifugiraju 3 min na 13 400 okretaja/min ili 10 minuta na 3000 okretaja/min. Potom se 10 µL svakog uzorka plazme prenese u pločicu za sakupljanje zapremine 1 mL.

Osušeni eluati IgG (150 µg) iz prethodnog koraka ne zahtijevaju obradu te se odmah ide na sljedeći korak.

3.2.2.2. Denaturacija

Svakom uzorku plazme potrebno je dodati 20 µL 2% SDS i dobro promiješati pipetom.

Svakom uzorku IgG potrebno je dodati 30 µL 1,33% SDS i dobro promiješati pipetom.

Oba seta uzorka potrebno je dobro zatvoriti adhezivnom naljepnicom i staviti na 10 minuta u pećnicu na 65° C, nakon čega se ostave na tresilici 30 minuta, odnosno dok se ne ohlade na sobnu temperaturu.

Svakom uzorku plazme i IgG dodaje se 10 µL 4% Igepal (kako bi se neutralizirao inhibitorni efekt SDS na PNGazu F i spriječila denaturacija enzima), dobro se promiješaju i ostave na tresilici 15 min, odnosno dok sve ne bude spremno za dodavanje smjese enzima.

3.2.2.3. Deglikozilacija

Najprije se treba pripraviti smjesa enzima, na način da se pomiješa 10 µL 5x PBS pufera i 0,12 µL PNGase F, po uzorku. Svakom uzorku plazme i IgG dodaje se 9,8 µL (radi moguće greške pipete) smjese enzima i resuspendira.

Uzorci se dobro zatvore adhezivnom naljepnicom te se inkubiraju 18 sati, na 37° C, kako bi se oslobodili N-glikani.

3.2.3. *In solution* fluorescentno obilježavanje N-glikana

Postupak obilježavanja provodi se u digestoru. Priprema otopine za obilježavanje opisana je u poglavlju 3.1.3. (**Priprema pufera i otopina**).

3.2.3.1. Obilježavanje uzoraka

Svakom uzorku plazme i IgG doda se 25 µL otopine za obilježavanje i dobro promiješa pipetiranjem.

Uzorci se dobro zatvore adhezivnom naljepnicom, stave na tresilicu 10 minuta i potom se inkubiraju 2 sata na 65° C. Nakon isteka vremena, uzorci se ostave na tresilici 30 minuta da se ohlade na sobnu temperaturu odnosno dok ne budu spremni za nanošenje na AcroPrep GHP 0,2 µL filter pločicu, zapremine 1 mL.

3.2.3.2. Priprema AcroPrep GHP 0,2 µL filter pločice

U svaku jažicu doda se 200 µL svježe pripremljenog 70% etanola (v/v), 200 µL ultra-čiste vode te 200 µL hladnog, svježe pripremljenog 96% acetonitrila (ohlađen na 4°C). Između svakog koraka, filter pločica prazni se pomoću vakuumske pumpe, a vakuum ne smije prelaziti 2 inHg.

3.2.3.3. Aplikacija i čišćenje obilježenih N-glikana

Svakom uzorku s obilježenim N-glikanima doda se 700 µL hladnog 100% acetonitrila (ohlađen na 4° C), promiješa pipetom te se ukupan volumen prenese na GHP filter pločicu. Inkubira se 2 minute te se pločica isprazni vakuum pumpom.

U svaku jažicu GHP filter pločice doda se po 200 µL hladnog 96% acetonitrila, postupak se ponovi 4 puta te se pločica prazni između svakog koraka vakuum pumpom. GHP

filter pločica se potom postavi iznad pločice za sakupljanje zapremine 1 ili 2 mL te se zajedno centrifugiraju 5 minuta na 1000 okretaja/min. Treba provjeriti da nema zaostalih kapljica na filteru GHP pločice. U ovom koraku uklanjanju se reducirajući agens (PB) i nevezani 2-AB.

3.2.3.4. Eluacija 2-AB obilježenih glikana

GHP pločica postavi se iznad čiste ABgene PCR pločice. U svaku jažicu doda se 90 µL ultra-čiste vode i ostavi na tresilici 15 minuta, nakon čega se centrifugira 5 minuta na 1000 okretaja/min, kako bi se prikupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Postupak se ponovi još jednom kako bi se prikupila i druga frakcija eluata. Provjeri se je li se sve eluiralo, odnosno da nema kapljica s donje strane filtera te da se u svakoj jažici nalazi ukupan volumen od 180 µL.

Tako fluorescentno obilježeni N-glikani mogu se odmah koristiti za daljnju analizu na UPLC uređaju ili pohraniti na -20° C.

3.2.4. UPLC-HILIC analiza N-glikana proteina plazme

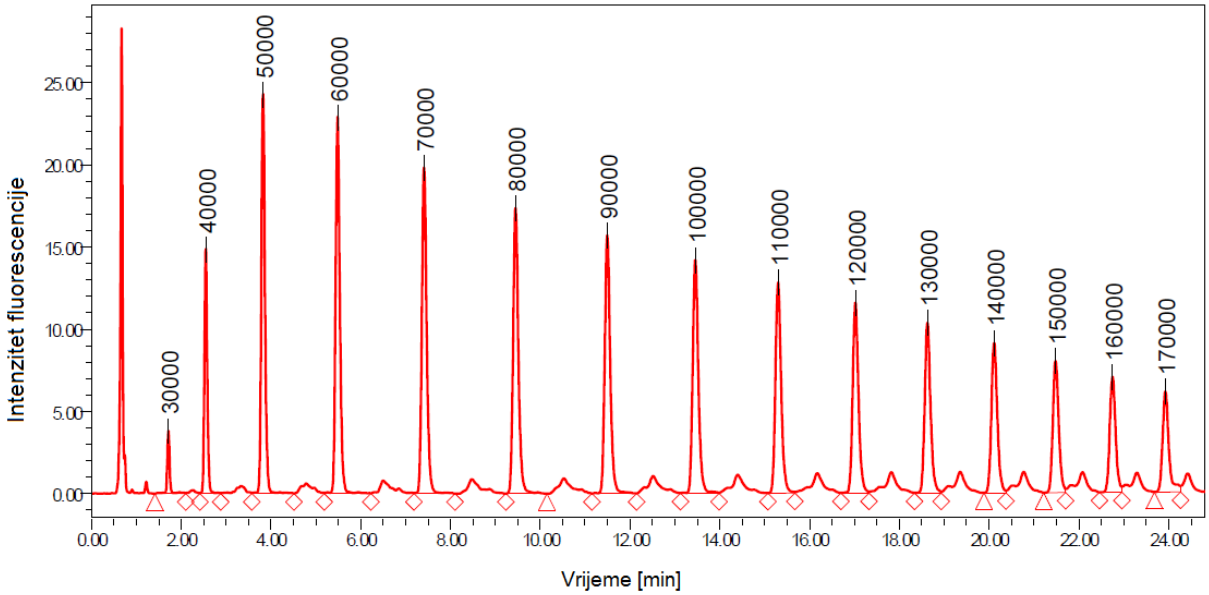
Fluorescentno obilježeni N-glikani proteina plazme razdvojeni su na Acquity UPLC BEH Glycan koloni (dimenzije 150 x 2,1 mm, promjer BEH čestica 1,7 µm) uz pomoć Acquity UPLC instrumenta. Odjeljivanje se temeljilo na kromatografiji hidrofilnih interakcija.

UPLC instrument se sastojao od kvartarne jedinice za pripravu mobilne faze (QSM, engl. *Quartenary solvent manager*), automatskog injektora uzoraka (FTN, engl. *Flow Trough needle*), grijača kolone i fluorescentnog (FLR) detektora ($\lambda_{ekscitacija}$ = 250 nm, $\lambda_{emisija}$ = 428 nm). Uređaj se kontrolirao računalnim programom Empower 3 (Waters, SAD).

Mobilna faza sastojala se od 100 mM mravlje kiseline, pH 4.4 (otapalo A) te acetonitrila (otapalo B). Korišten je linearni gradijent otapala A od 30-47%, brzine protoka 0,56 mL/min, tijekom 23 min. Uzorci su bili držani na 10° C prije injektiranja, a temperatura na kojoj se odvijalo odjeljivanje bila je 25° C.

Sustav je kalibriran upotrebom fluorescentno obilježenih (2-AB) oligomera glukoze dobivenih hidrolizom dekstrana (**Slika 5.**), a prema kojima su vremena zadržavanja pojedinih glikana prevedena u glukozne jedinice (GU) (Guile i sur., 1996).

Svi kromatogrami dobiveni analizom N-glikana proteina plazme podijeljeni su na 39 kromatografskih vršaka tj pikova, a količina glikana u svakom piku prikazana je kao postotak (%) od ukupne integrirane površine, prema Saldova i sur. (2014).



Slika 5. Kromatogram oligomera glukoze dobivenih hidrolizom dekstrana (engl. *Dextran ladder*), korištenih za kalibraciju sustava neposredno prije analize N-glikoma krvne plazme. Svakom piku odnosno oligomeru glukoze, pridružena je odgovarajuća GU. Broj monomera glukoze u pojedinom oligosaharidu dobije se dijeljenjem GU s brojem 10 000.

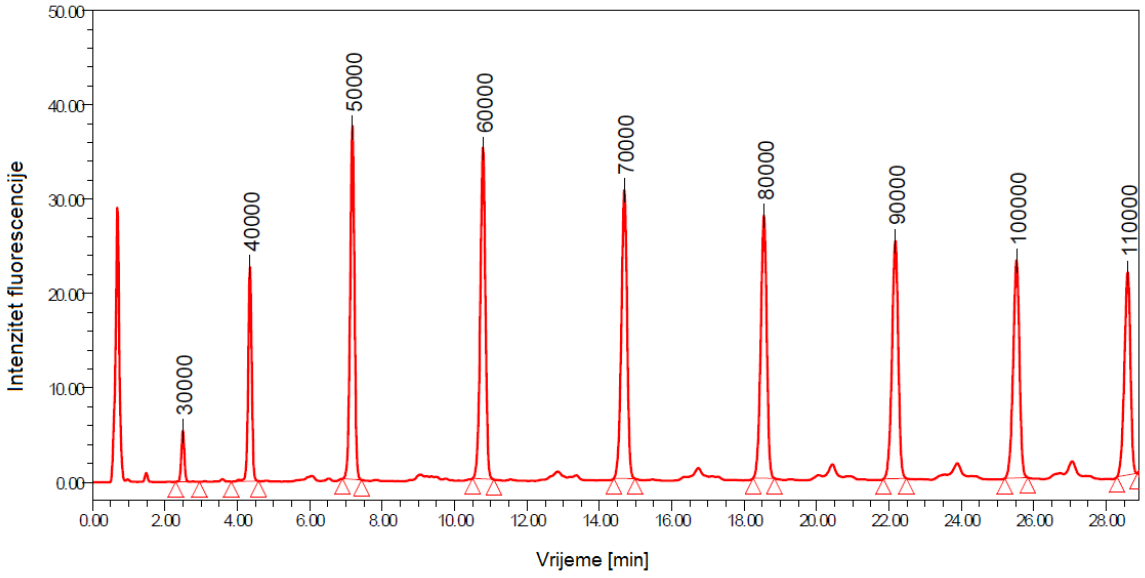
3.2.5. UPLC - HILIC analiza N-glikana IgG

Fluorescentno obilježeni N-glikani IgG odijeljeni su kromatografijom hidrofilnih interkacija na Acquity UPLC BEH Glycan koloni (dimenzije 100 x 2,1 mm, promjer BEH čestica 1,7 µm) uz pomoć Acquity UPLC instrumenta.

Mobilna faza sastojala se od 100 mM amonijevog formijata, pH 4,4 (otapalo A) i acetonitrila (otapalo B). Za odjeljivanje glikana, korišten je linearni gradijent otapala A od 25-38%, brzine protoka 0,4 mL/min, tijekom 25 min. Uzorci su prije odjeljivanja držani na 10° C, a odjeljivanje se odvijalo na temperaturi od 60° C.

Sustav je kalibriran upotrebom fluorescentno obilježenih (2-AB) oligomera glukoze dobivenih hidrolizom dekstrana, a prema kojima su vremena zadržavanja pojedinih glikana prevedena u glukozne jedinice (**Slika 6.**) (Guile i sur., 1996).

Svi kromatogrami dobiveni analizom N-glikana IgG integrirani su na isti način i podijeljeni na 24 zasebna pika, a količina glikana u svakom piku prikazana je kao postotak (%) od ukupne integrirane površine, prema Pučić i sur. (2011).



Slika 6. Kromatogram oligomera glukoze dobivenih hidrolizom dekstrana (engl. *Dextran ladder*), korištenih za kalibraciju sustava neposredno prije analize N-glikoma IgG. Svakom piku odnosno oligomeru glukoze, pridružena je odgovarajuća GU. Broj monomera glukoze u pojedinom oligosaharidu dobije se dijeljenjem GU s brojem 10 000.

3.2.6. Analiza podataka

U statističkoj obradi podataka korišteni su računalni programi Microsoft Excel® 2010 i R® (verzija 3.1.1.) s pripadajućim paketima (ggplot2, dplyr, tidyr), važnima u vizualizaciji podataka. Svaki od 39 integriranih kromatografskih vršaka tj pikova (GP, engl. *Glycan peak*) dobivenih UPLC-HILIC analizom N-glikoma plazme i svaki od 24 integrirana pika, dobivenih analizom N-glikoma IgG, predstavljaju glikanske strukture čija je količina unutar pika predstavljena postotkom (%) od ukupne integrirane površine. Svaki pik odnosno izmjereni N-glikani, uključujući sve ispitanike, opisani su medijanom, interkvartilnim rasponom, minimalnom i maksimalnom izmjerenom vrijednošću. Osim izmjerenih glikanskih struktura za plazmu i IgG, izračunati su i derivirani parametri.

Derivirani parametri objedinjuju glikane koji dijele neke od strukturnih svojstava: glikani bez galaktoze (agalatozilirani, G0), glikani s jednom, dvije, tri ili četiri galaktoze (mono-, di-, tri-, i tetragalaktozilirani, G1, G2, G3, G4), glikani koji sadrže fukozu (fukozilirani, F), glikani koji sadrže račvajući N-acetilglukozamin (B) te glikani koji sadrže sijalinsku kiselinu, odnosno N-acetilneuraminsku kiselinu (sijalinizirani, S).
Derivirani parametri bolje su povezani s individualnim enzimatskim aktivnostima i genetskim polimorfizima vezanima za te enzime (Lauc i sur., 2010).

Izračun svakog deriviranog parametra dan je u **Tablica 3.** za N-glikane proteina plazme i **Tablica 4.** za N-glikane IgG.

Tablica 3. Izračun deriviranih parametara za N-glikane proteina krvne plazme. Crtica (-) predstavlja raspon (od-do).

Derivirani parametar	Suma površina pikova
G0	GP1
G1	GP(3-6) + GP12 + GP13
G2	GP(8-10) + GP(14-18) + GP(20-23)
G3	GP19 + GP(24-32)
G4	GP33 + GP34 + GP(36-39)
F	GP1 + GP2 + GP(4-6) + GP(10-13) + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP29 + GP31 + GP32 + GP35 + GP39
B	GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP(11-13) + GP17 + GP23 + GP25
S	GP(12-39)

Tablica 4. Izračun deriviranih parametara za N-glikane IgG. Crtica (-) predstavlja raspon (od-do).

Derivirani parametar	Suma površina pikova
G0	GP(1–4) + GP6
G1	GP(7–11)
G2	GP(12–24)
F	GP1 + GP4 + GP6+ GP(8-11) + GP(14–16) + GP18 + GP19 + GP23 + GP24
B	GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24
S	GP(15-24)

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom ispitivanju sudjelovalo je pet zdravih muškaraca, između 30 i 45 godina starosti (medijan = 32, raspon=15) i pet zdravih žena, između 29 i 46 godina starosti (medijan 31, raspon=17). Tijekom deset dana, ispitanicima je tri puta izvađena krv (nulti, prvi i deveti dan) te je analiziran N-glikom krvne plazme i N-glikom IgG. Dob i spol ispitanika prikazani su u **Tablica 5**. Od svake ispitanice dodatno su prikupljeni podaci o menstruacijskom ciklusu.

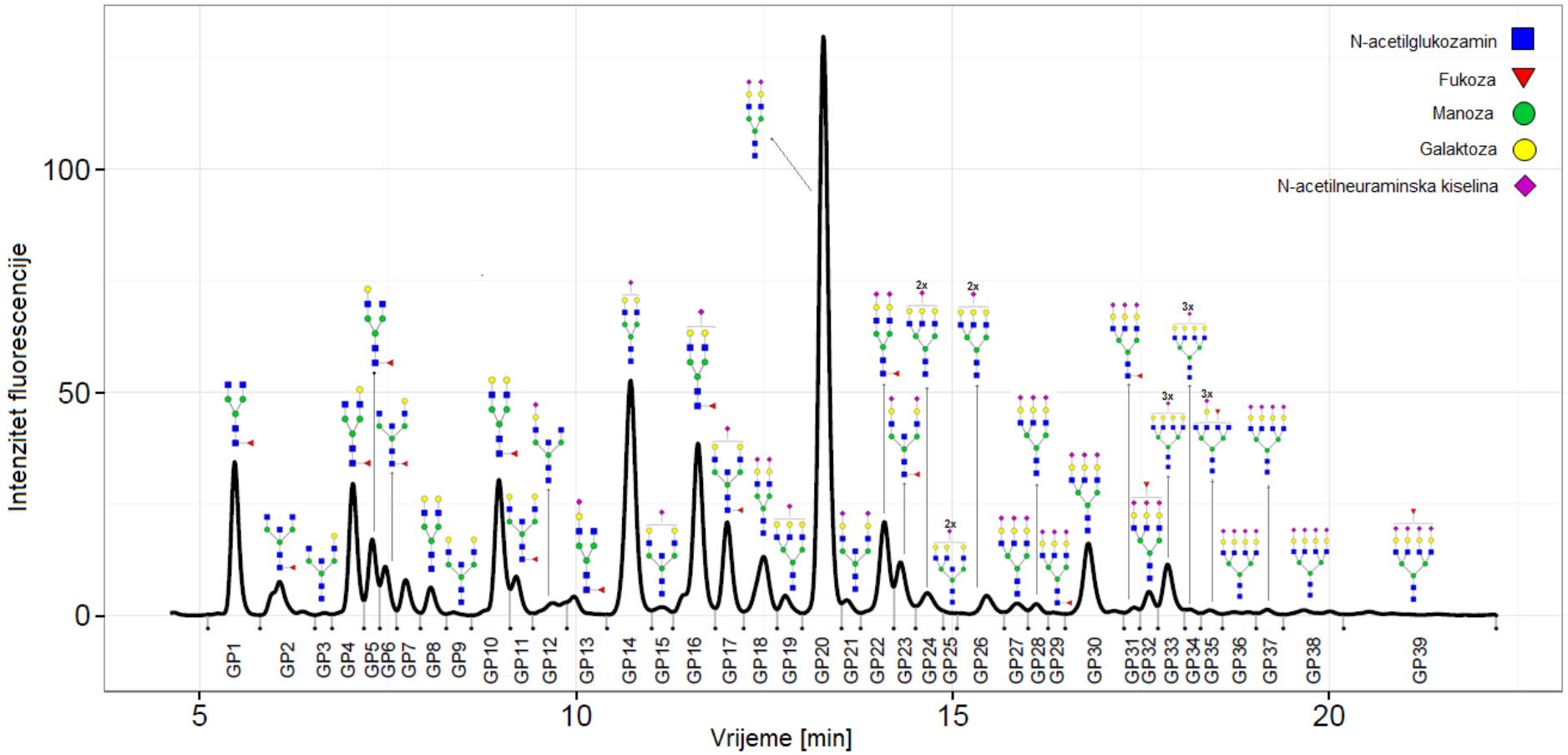
Tablica 5. Dob i spol ispitanika

	Muškarci					Žene				
Osoba	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Dob [godine]	44	41	32	31	30	46	40	31	30	29

Uz pomoć pločice monolita s proteinom G, izoliran je IgG iz dijela krvne plazme svakog ispitanika. N-glikani proteina plazme i N-glikani IgG oslobođeni su pomoću enzima PNGaze F te su fluorescentno obilježeni s 2-AB. Tako obilježeni N-glikani odijeljeni su kromatografijom hidrofilnih interakcija na različitim Acquity UPLC BEH Glycan kolonama, uz pomoć Acquity UPLC uređaja, čime su dobiveni kromatogrami koji predstavljaju profil N-glikana proteina plazme, odnosno N-glikana IgG.

4.1. Vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme

Kromatogrami koji predstavljaju profil N-glikana krvne plazme svakog ispitanika, podijeljeni su na 39 pikova (Saldova i sur., 2014) te su svakom piku pridružene glikanske strukture koje su određene MS i egzoglikozidaznim digestijama (**Slika 7.**). Količina glikana u svakom piku izračunata je kao postotak (%) od ukupne integrirane površine. Izračunato je i osam deriviranih parametara (G0, G1, G2, G3, G4, F, B, S).



Slika 7. Reprezentativan kromatogram N-glikoma krvne plazme, dobiven UPLC-HILIC metodom. Svakom od 39 pikova, pridružene su glavne (najzastupljenije) glikanske strukture.

Glikanske strukture koje su razdvojene na 39 pikova i derivirani parametri, za svih deset ispitanika, opisani su medijanom (M), interkvartilnim rasponom (IQR) te minimalnom (Min) i maksimalnom (Max) vrijednošću (**Tablica 6.**). Također, u istoj tablici prikazane su i minimalne i maksimalne vrijednosti standardnog uzorka plazme za svaki pik i derivirani parametar, čiji je profil N-glikana tri puta nasumično analiziran, između analiza ostalih ispitanika, kako bi se utvrdile moguće varijacije u metodi. Metoda se pokazala vrlo stabilnom.

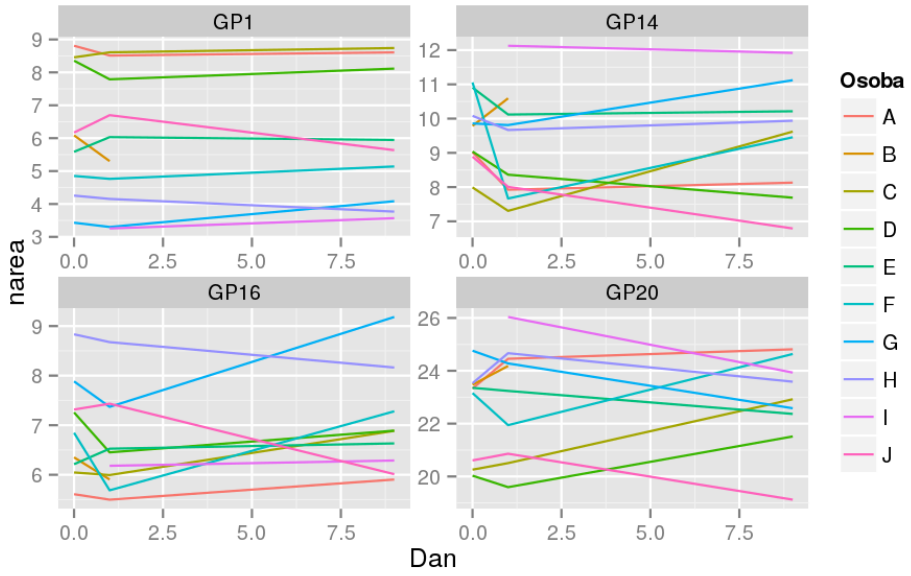
Slika 8a. prikazuje promjenu u glikozilaciji proteina plazme tijekom 10 dana za svaku osobu tj promjenu količine glavnih glikanskih struktura (GP1, GP14, GP16, GP20).
N-glikom plazme čini se stabilan kod većine muškaraca (osobe A-E), odnosno ne primjećuje se značajnija promjena. Kod osobe C primjećuje se veći rast GP20 (A2G2S2) koji raste s 20,26% nultog dana na 22,92% devetog dana. Kod žena (osobe F-J) je promjena u glikozilaciji nešto dinamičnijeg karaktera. Kod osobe F, uočena je izraženija promjena za GP14 (A2G2S1), čija se površina naglo smanjuje s 11,06% nultog dana na 7,67% prvog dana, a potom raste na 9,45% deveti dan. Kod osobe G primijećen je najveći rast razine glikana GP16 (FA2G2S1), s 7,37% prvog dana na 9,18% devetog dana, dok se isti kod osobe J smanjio s 7,43% prvog dana na 6,01% devetog dana. GP20 (A2G2S2) značajnije raste kod osobe F te pada kod osobe G. Sve istaknute promjene su veće od varijacija u metodi.

Slika 8b. prikazuje promjene deriviranih parametara tijekom 10 dana za svaku osobu.
Kod većine muškaraca ne primjećuje se značajnija promjena parametara G0, G1, G2, G3 i G4 tijekom deset dana. Kod osobe B primjećuje se rast parametra S, s 70,99% nultog dana na 73,91% prvog dana. Kod osobe C primjećuje se izraženije smanjenje parametra B, s 14,69% prvog dana na 12,49% devetog dana. Kod žena je promjena parametara F, B i S izraženija, pogotovo kod osobe G kojoj se parametar F između prvog i devetog dana povećava s 44,21% na 50,30%. Sve istaknute promjene su veće od varijacija u metodi.

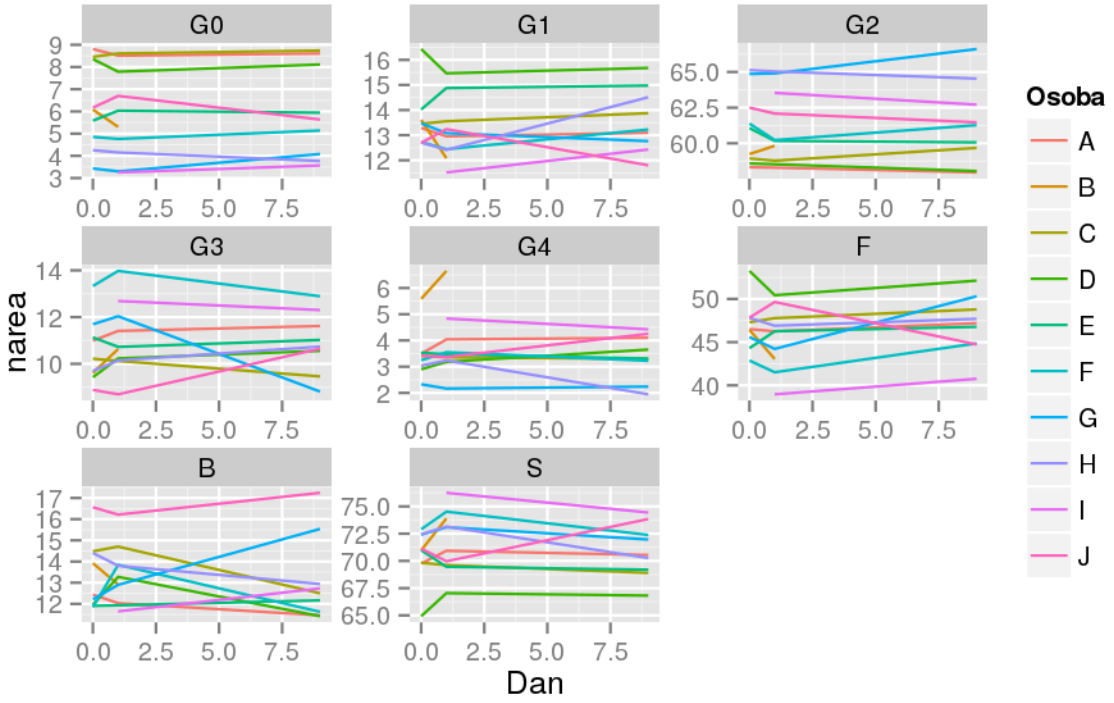
Tablica 6. Deskriptivna analiza N-glikana i deriviranih parametara, uključujući svih deset ispitanika.

M – medijan, IQR – interkvartilni raspon, Min – minimun, Max – maksimum.

	% površine												Plazma stand.	
	0. DAN				1. DAN				9. DAN					
Glikan	M	IQR	Min	Max	M	IQR	Min	Max	M	IQR	Min	Max	**Min**	**Max**
G1	**6,09**	**3,51**	**3,43**	**8,81**	**5,67**	**3,22**	**3,26**	**8,61**	**5,64**	**4,03**	**3,57**	**8,74**	**7,88**	**8,12**
G2	2,23	0,39	1,65	2,89	2,13	0,62	1,66	2,59	2,12	0,42	1,79	2,49	2,52	2,59
G3	0,09	0,02	0,07	0,11	0,09	0,02	0,07	0,10	0,09	0,01	0,07	0,11	0,11	0,12
G4	5,29	0,79	4,81	8,52	5,24	0,29	4,04	7,27	5,54	1,02	3,87	8,28	4,84	5,45
G5	3,71	0,47	3,37	4,21	3,80	0,61	2,33	4,24	3,88	0,51	2,68	4,21	2,96	3,13
G6	1,81	0,13	1,58	2,28	1,90	0,20	1,52	2,13	1,81	0,36	1,36	2,09	1,70	1,72
G7	1,14	0,2	0,88	1,53	1,11	0,16	0,93	1,40	1,10	0,16	0,81	1,42	1,04	1,11
G8	1,05	0,21	0,90	1,16	0,98	0,15	0,75	1,20	0,98	0,27	0,75	1,39	0,73	0,99
G9	0,14	0,03	0,11	0,25	0,14	0,08	0,12	0,23	0,14	0,07	0,08	0,30	0,11	0,17
G10	5,83	1,71	4,12	7,74	5,45	1,42	4,13	7,22	6,32	1,57	3,88	8,17	3,87	4,23
G11	1,39	0,37	1,09	2,17	1,56	0,44	0,94	2,28	1,26	0,36	0,87	2,48	1,21	1,35
G12	1,00	0,06	0,75	1,29	0,99	0,08	0,66	1,04	1,00	0,16	0,88	1,16	0,71	0,84
G13	1,22	0,22	0,99	1,61	1,22	0,32	0,98	1,49	1,23	0,22	0,94	1,40	1,13	1,26
G14	**9,79**	**1,06**	**7,99**	**11,06**	**9,02**	**2,10**	**7,31**	**12,13**	**9,62**	**2,08**	**6,79**	**11,92**	**7,27**	**8,99**
G15	0,79	0,37	0,47	2,13	0,87	0,84	0,47	2,00	0,65	0,51	0,33	2,69	0,52	1,08
G16	**6,85**	**1,11**	**5,61**	**8,83**	**6,32**	**1,24**	**5,50**	**8,68**	**6,89**	**0,99**	**5,90**	**9,18**	**6,24**	**6,92**
G17	2,52	0,79	1,90	4,39	2,57	0,64	1,84	4,18	2,39	0,58	1,80	4,53	2,97	3,12
G18	3,30	0,46	2,92	3,90	3,37	0,47	2,99	3,86	3,56	0,47	2,89	3,90	2,69	2,87
G19	1,03	0,31	0,91	1,43	1,17	0,29	0,89	1,45	1,03	0,20	0,86	1,39	1,13	1,22
G20	**23,33**	**2,86**	**20,03**	**24,76**	**23,71**	**3,28**	**19,60**	**26,04**	**22,92**	**1,56**	**19,12**	**24,81**	**20,42**	**21,54**
G21	1,48	1,29	0,82	4,97	1,96	2,28	0,65	5,50	1,24	0,84	0,61	7,03	0,93	2,43
G22	3,85	0,44	3,08	4,98	3,92	0,66	2,81	4,78	3,64	0,86	2,65	5,34	5,55	5,99
G23	2,36	0,34	1,76	2,56	2,38	0,42	1,95	2,64	2,33	0,42	1,99	2,78	3,73	4,16
G24	1,22	0,24	0,85	1,83	1,22	0,22	1,02	1,63	1,27	0,34	1,07	1,58	0,84	1,08
G25	0,31	0,02	0,21	0,36	0,30	0,08	0,25	0,46	0,30	0,15	0,20	1,26	0,30	0,35
G26	1,05	0,09	0,85	1,45	1,00	0,13	0,78	1,43	1,13	0,26	0,41	1,38	0,91	1,09
G27	0,47	0,14	0,12	0,92	0,49	0,09	0,15	1,14	0,43	0,21	0,11	0,76	0,84	1,08
G28	0,58	0,16	0,45	0,80	0,61	0,10	0,43	0,79	0,64	0,15	0,13	0,80	0,48	0,52
G29	0,16	0,04	0,12	0,22	0,18	0,06	0,14	0,28	0,18	0,06	0,13	3,06	0,15	0,18
G30	4,09	0,89	3,19	5,91	4,42	1,32	3,28	6,86	4,79	0,88	0,28	6,09	3,02	3,25
G31	0,31	0,06	0,25	0,39	0,31	0,05	0,25	0,42	0,32	0,07	0,24	0,47	0,33	0,36
G32	0,91	0,16	0,62	1,11	0,97	0,25	0,67	1,28	0,87	0,30	0,74	1,20	1,00	1,10
G33	1,61	0,4	0,34	3,69	1,69	0,39	0,35	4,09	1,70	0,53	0,29	2,33	3,48	3,76
G34	0,31	0,1	0,21	0,51	0,38	0,13	0,19	0,54	0,28	0,06	0,20	0,81	0,36	0,64
G35	0,19	0,04	0,08	0,43	0,20	0,04	0,08	0,47	0,19	0,07	0,07	0,24	0,48	0,53
G36	0,26	0,02	0,24	0,29	0,26	0,08	0,21	0,39	0,26	0,02	0,18	0,36	0,33	0,36
G37	0,30	0,13	0,17	0,57	0,33	0,10	0,14	0,53	0,34	0,17	0,21	0,49	0,18	0,20
G38	0,53	0,1	0,42	0,71	0,61	0,12	0,38	0,73	0,57	0,16	0,26	0,75	0,53	0,58
G39	0,33	0,05	0,26	0,60	0,33	0,13	0,18	0,90	0,34	0,10	0,20	0,45	0,63	0,70
G0	**6,09**	**3,51**	**3,43**	**8,81**	**5,67**	**3,22**	**3,26**	**8,61**	**5,64**	**4,03**	**3,57**	**8,74**	**7,88**	**8,12**
G1	**13,45**	**0,90**	**12,70**	**16,43**	**13,02**	**1,06**	**11,52**	**15,47**	**13,23**	**1,76**	**11,80**	**15,68**	**11,59**	**12,26**
G2	**61,07**	**3,56**	**58,33**	**65,12**	**60,21**	**4,14**	**58,28**	**65,04**	**61,27**	**3,03**	**57,95**	**66,60**	**58,84**	**59,54**
G3	**10,23**	**1,51**	**8,89**	**13,33**	**10,69**	**1,72**	**8,69**	**13,97**	**10,75**	**1,04**	**8,82**	**12,90**	**9,24**	**9,88**
G4	**3,40**	**0,46**	**2,34**	**5,59**	**3,43**	**0,65**	**2,15**	**6,66**	**3,31**	**0,89**	**1,94**	**4,44**	**5,72**	**6,21**
F	**46,50**	**2,25**	**42,86**	**53,26**	**46,27**	**4,21**	**38,98**	**50,43**	**47,19**	**3,92**	**40,77**	**52,11**	**48,77**	**50,59**
B	**12,43**	**2,44**	**11,84**	**16,57**	**13,10**	**1,57**	**11,65**	**16,21**	**12,49**	**1,32**	**11,41**	**17,25**	**14,68**	**15,43**
S	**70,99**	**2,56**	**64,95**	**72,92**	**72,00**	**4,01**	**67,03**	**76,27**	**70,51**	**3,15**	**66,81**	**74,46**	**71,44**	**72,56**



Slika 8a. Promjena površine (%) najvećih pikova za svaku osobu tijekom deset dana (nulti, prvi i deveti dan).



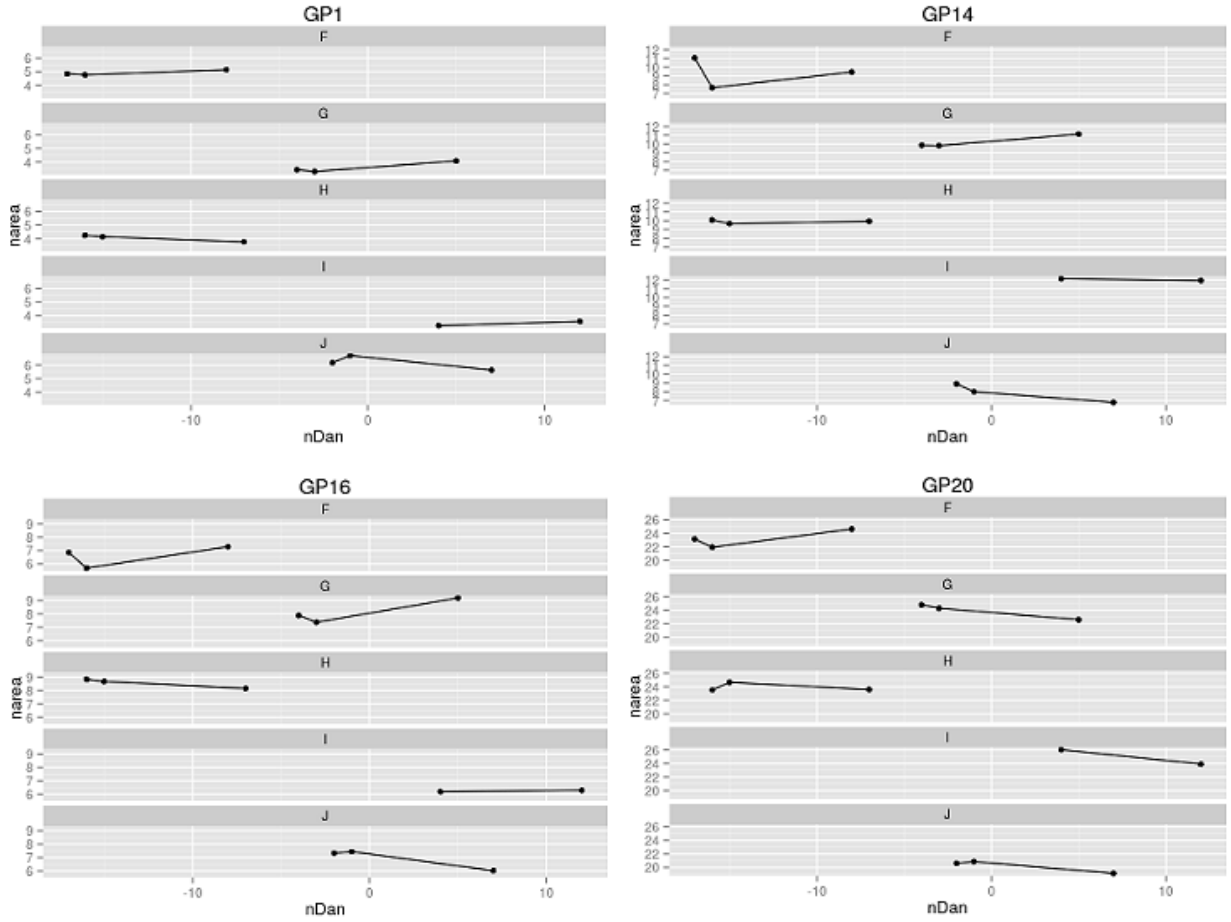
Slika 8b. Promjena (%) deriviranih parametara za svaku osobu tijekom deset dana (nulti, prvi i deveti dan).

S obzirom da su kod žena (osobe F-J) uočene izraženije promjene u razini glavnih glikanskih struktura i deriviranih parametara, one su dodatno promatrane u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa.

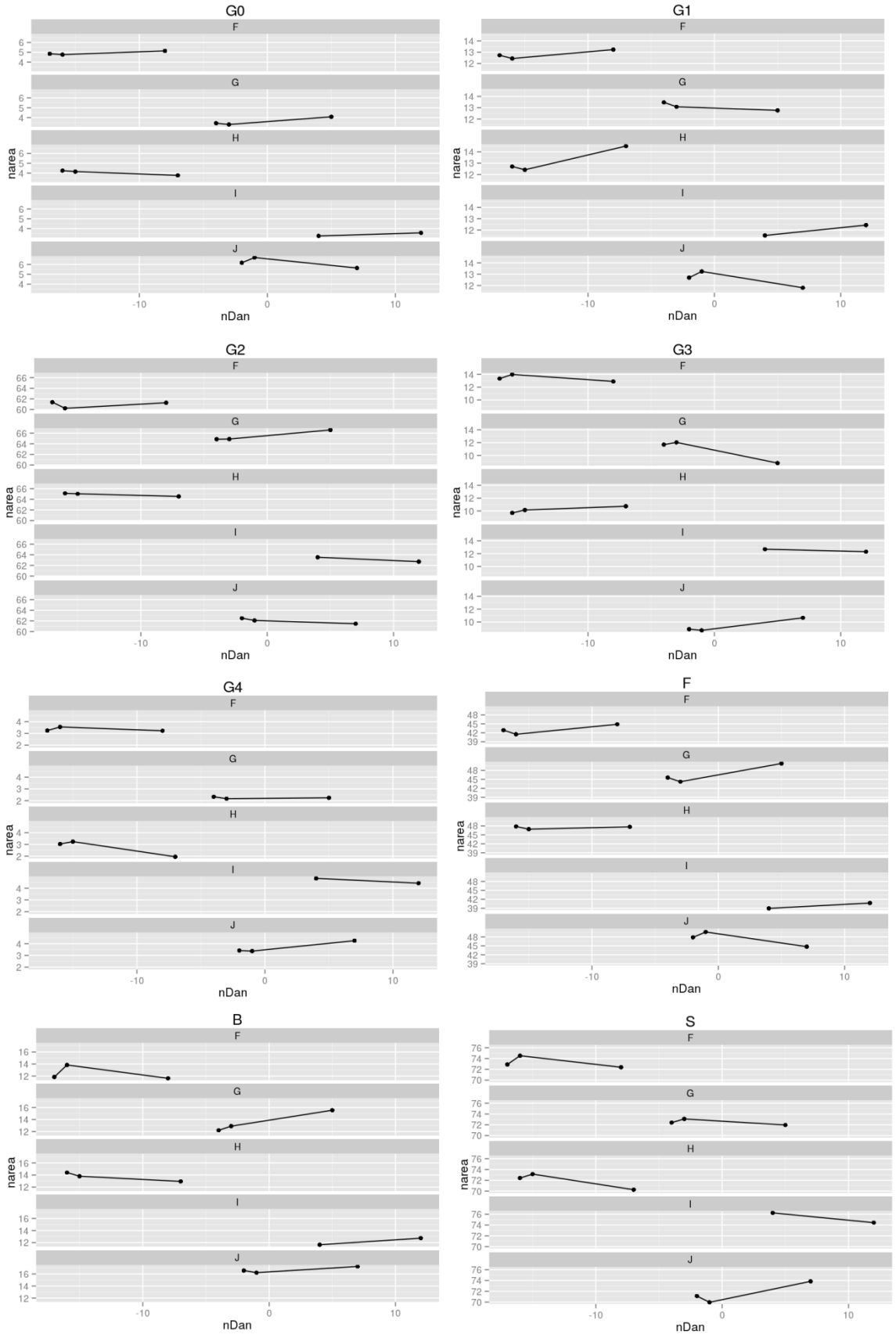
Za svaku od pet ispitanica, prikazane su promjene u razini glikana (**Slika 9a.**) i deriviranog parametra (**Slika 9b.**), sve u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa (prikazan na apscisi). Dan 0 (nula) predstavlja početak menstruacije, odnosno desno od dana 0 radi se o novom ciklusu, a lijevo o prethodnom. Ovulacija se javlja na polovini ciklusa (14. dan ako se radi normalnom ciklusu od 28 dana). Može se uočiti da su osobe F i H otprilike u istoj fazi ciklusa, u periodu od ovulacije pa do početka novog menstruacijskog ciklusa, kao i osobe G i J, koje se nalaze na prijelazu između dva ciklusa. Usprkos tome što se neke osobe nalaze u istoj fazi ciklusa, to nužno ne predstavlja i isti smjer promjene (povećanje ili smanjenje) razine GP1, GP14, GP16, GP20 i pojedinog deriviranog parametra. To je i za očekivati s obzirom da se radi o N-glikanima dobivenima s proteina plazme, kojih je mnogo, a pritom se ne zna da li je došlo do promijenjene glikozilacije nekog od proteina ili promjene u količini pojedinih proteina, kod svake ispitanice. Statističku značajnost uočenih promjena potrebno je utvrditi opsežnijom studijom s većim brojem ispitanika i većim brojem ponavljanja.

Na temelju dobivenih podataka može se reći da je N-glikom krvne plazme kod muškaraca vrlo stabilan te da se kod žena uočavaju izraženije promjene, koje su vrlo individualne neovisno o fazi menstruacijskog ciklusa te koje treba dodatno istražiti i objasniti većom studijom. Vrlo dobra vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme u periodu od pet dana već je uočena u jednom istraživanju (Gornik i sur., 2009), u kojem je pokazano da se isti značajnije ne mijenja niti nakon duljeg vremenskog perioda (otprilike godine dana) kod većine istih tih ispitanika. Iako je kod pojedinaca uočena vrlo dobra stabilnost N-glikoma krvne plazme, on na razini populacije pokazuje veliku varijabilnost u kompoziciji (Knežević i sur., 2010). Uočena vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme može biti posljedica epigenetičke regulacije genske ekspresije, koja se dosad pokazala važnom u glikozilaciji proteina (Horvat i sur., 2012; Saldova i sur., 2011). Povezanost starosti osobe i promjena u glikozilaciji proteina plazme, pokazali su Knežević i sur. (2010). Uočili su da s povećanjem dobi pojedinca raste razina agalaktoziliranih (G0), a posljedično se smanjuje razina digalaktoziliranih (G2) glikana, koji su pak više sijalinizirani (S). Razine glikana sa sržnom fukozom smanjivale su se kod žena i muškaraca s povećanjem dobi, dok je kod muškaraca uočen porast glikana s antenarnom fukozom. Kod većine ispitanika u ovom radu najuočljivija je veza između razine G0 glikana i starosti pojedinca, koja je dakle veća kod starijih nego kod mlađih ispitanika, izuzev osobe J. No ovdje se radi o malom uzorku odnosno malom broju

ispitanika, koji se ne razlikuju značajno po godinama te je stoga teško jednostavno potvrditi prijašnje istraživanje.



Slika 9a. Promjena razine (%) glavnih glikanskih struktura u plazmi tijekom deset dana, u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa svake ispitanice. Dan 0 predstavlja početak menstruacije. Desno od dana 0 prikazan je novi ciklus, a lijevo prethodni.



Slika 9b. Promjena razine (%) deriviranih parametara tijekom deset dana, u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa svake ispitanice. Dan 0 predstavlja početak menstruacije. Desno od dana 0 prikazan je novi ciklus, a lijevo prethodni.

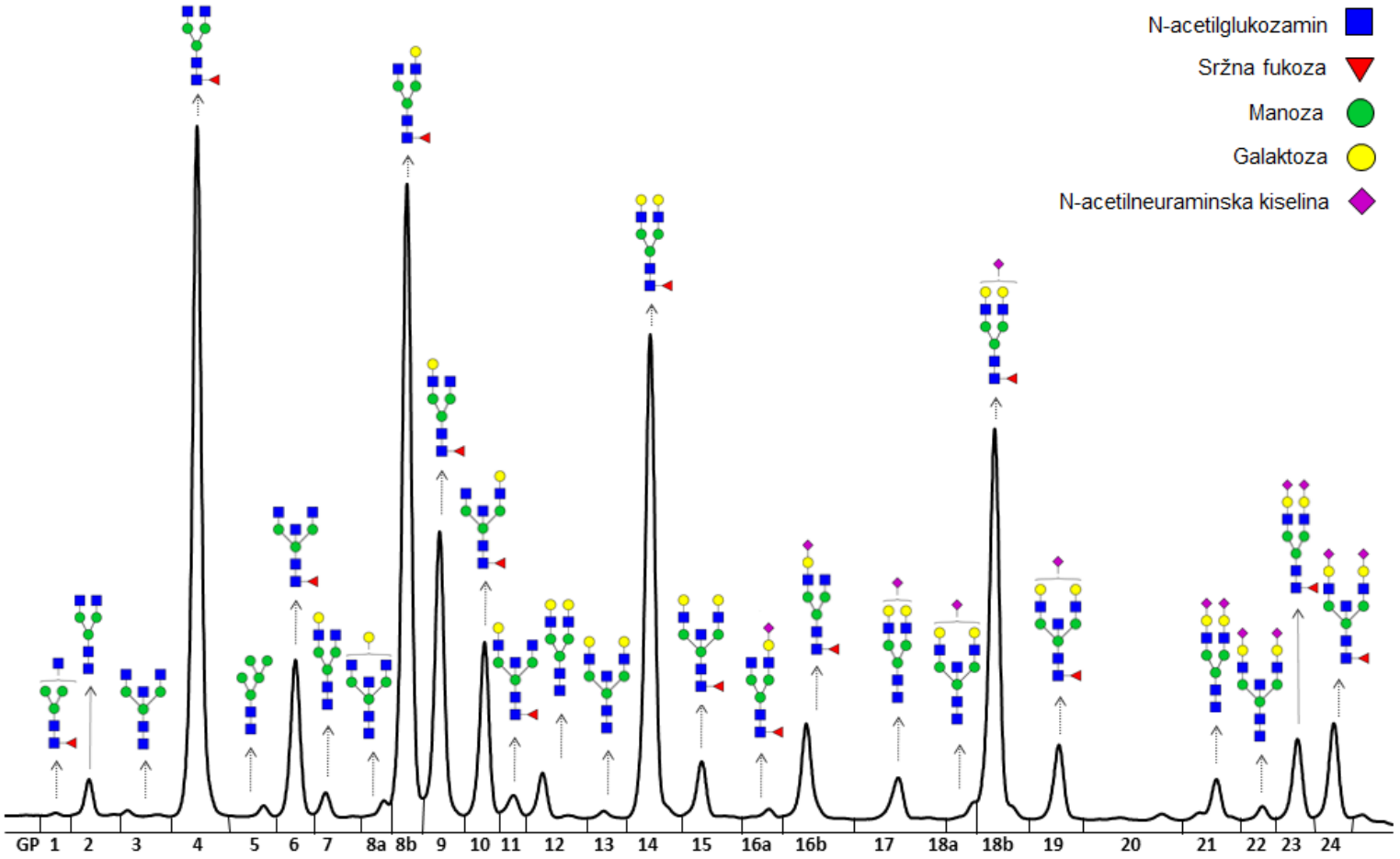
4.2. Vremenska stabilnost N-glikoma IgG

Kromatogrami koji predstavljaju profil N-glikana IgG svakog ispitanika, podijeljeni su na 24 kromatografska vrška tj pika (Pučić i sur., 2011), te su svakom piku pridružene glikanske strukture koje su određene MS i egzoglikozidaznim digestijama (**Slika 10.**). Količina glikana u svakom piku izračunata je kao postotak (%) od ukupne integrirane površine. Izračunato je i šest deriviranih parametara (G0, G1, G2, F, B, S).

Glikanske strukture koje su razdvojene na 24 pika i derivirani parametri, za svih deset ispitanika, opisani su medijanom (M), interkvartilnim rasponom (IQR) te minimalnom (Min) i maksimalnom (Max) vrijednošću (**Tablica 7.**). Također, u istoj tablici prikazane su i minimalne i maksimalne vrijednosti standardnog uzorka IgG za svaki pik i derivirani parametar, čiji je profil N-glikana tri puta nasumično analiziran, između analiza ostalih ispitanika, kako bi se utvrdile moguće varijacije u metodi. Metoda se pokazala vrlo stabilnom.

Slika 11a. prikazuje promjenu u glikozilaciji IgG tijekom 10 dana za svaku osobu tj promjenu u količini glavnih glikanskih struktura (GP4, GP8, GP14, GP18). N-glikom IgG čini se izuzetno stabilan kod svih muškaraca (osobe A-E), odnosno ne primjećuje se značajnija promjena u količini ovih glikanskih struktura. Jedino se kod osobe C primjećuje smanjenje razine GP4 (FA2) između prvog i devetog dana, s 26,16% na 24,80%. Kod žena (osobe F-J) promjena u glikozilaciji IgG je izraženija, kao što je bio slučaj kod proteina plazme, i to najviše kod osoba G i H. Kod osobe G, GP4 (FA2) raste s 10,11% nultog dana na 13,14% devetog dana odnosno GP18 (A2BG2S1, FA2G2S1) s 12,69% nultog dana na 15,00% devetog dana. GP8 (A2BG1, FA2[6]G1) naglo raste između nultog i prvog dana, s 18,13% na 19,82%, nakon čega pada na 18,24% devetog dana. GP14 (FA2G2) naglo raste s 20,43% nultog dana na 22,81 % prvog dana, pa pada na 19,04% devetog dana. Kod osobe H mogu se uočiti slične promjene, ali su one suprotnog smjera.

Slika 11b. prikazuje promjene deriviranih parametara tijekom deset dana za svaku osobu. Kod većine muškaraca, promjena deriviranih parametara nije izražena, osim kod osobe C, kod koje su uočene nešto veće razlike kod parametara G1, G2, B i S. Kod žena, najveće promjene su uočene kod osobe G i nešto manje kod osobe H. Kod osobe G primjećuje se značajnija promjena svih deriviranih parametra, a najviše parametra F koji između nultog i prvog dana raste s 91,81% na 96,41%, nakon čega se smanjuje na 94,36%. Promjena G0 parametra izražena je kod osobe G gdje raste s 13,92% nultog dana na 17,12% devetog dana. Parametar G1 raste kod osobe H, s 33,32% prvog dana na 36,76% devetog dana. Sve istaknute promjene su veće od varijacija u metodi.

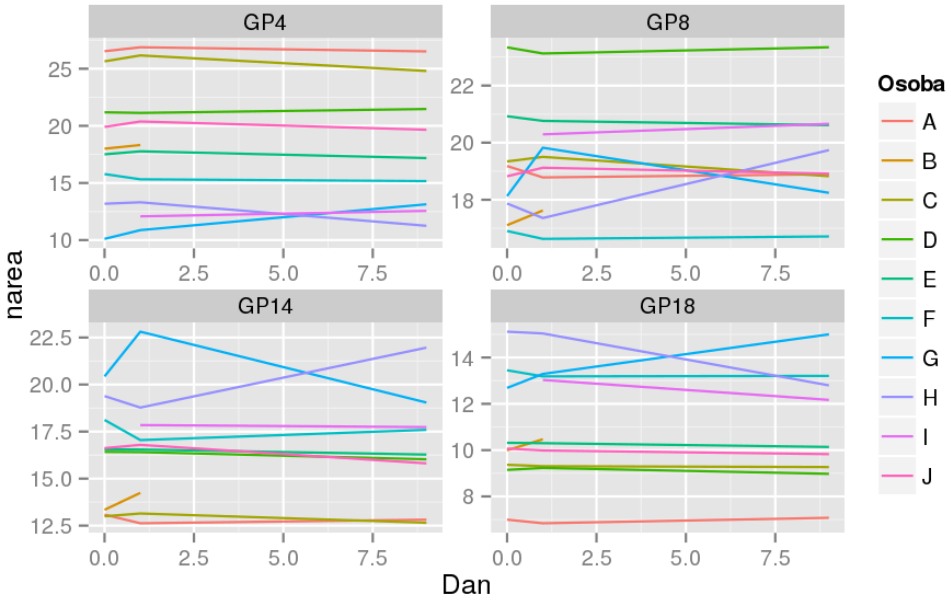


Slika 10. Reprezentativan kromatogram N-glikoma IgG, dobiven UPLC-HILIC metodom. Svakom od 24 pika, pridružene su glavne (najzastupljenije) glikanske strukture.

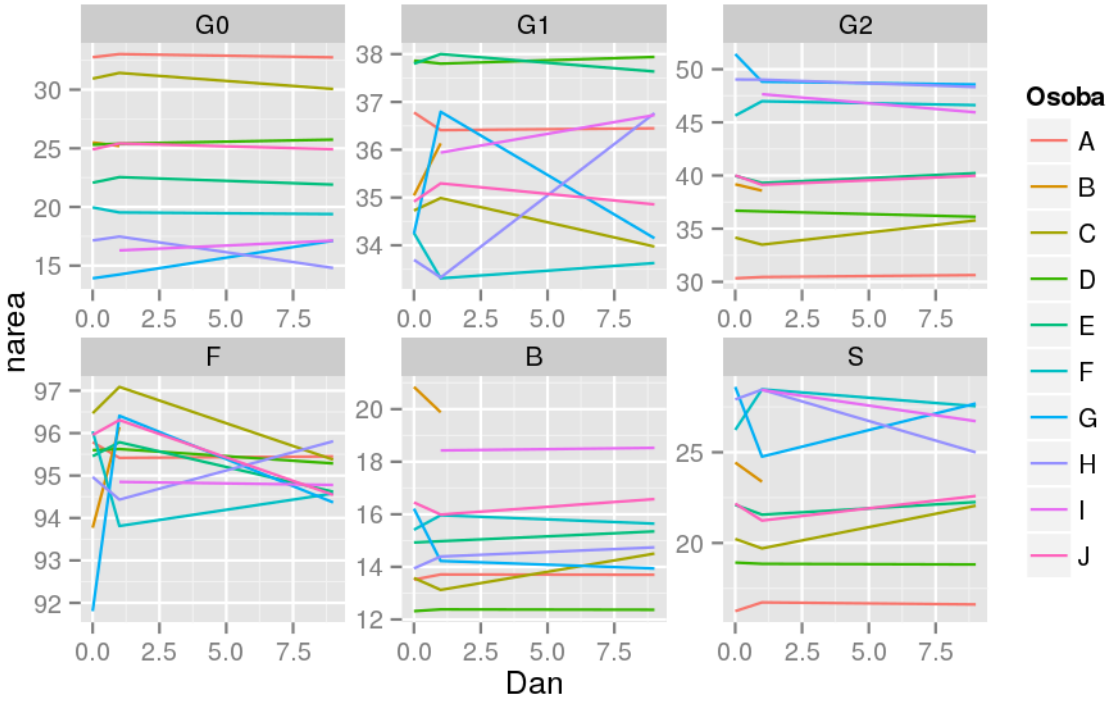
Tablica 7. Deskriptivna analiza N-glikana i deriviranih parametara, uključujući svih 10 ispitanika.

M – medijan, IQR – interkvartilni raspon, Min – minimun, Max – maksimum.

	% površine												IgG stand.	
	0. DAN				1. DAN				9. DAN					
Glikan	M	IQR	Min	Max	M	IQR	Min	Max	M	IQR	Min	Max	Min	Max
GP1	0,07	0,02	0,05	0,22	0,08	0,03	0,05	0,09	0,10	0,03	0,05	0,12	0,11	0,16
GP2	0,49	0,17	0,28	0,93	0,48	0,19	0,28	0,75	0,51	0,16	0,23	0,83	1,05	1,17
GP3	0,10	0,07	0,05	0,37	0,13	0,04	0,08	0,28	0,18	0,12	0,10	0,34	0,11	0,26
GP4	**18,00**	**5,41**	**10,11**	**26,53**	**18,05**	**7,13**	**10,87**	**26,88**	**17,18**	**8,33**	**11,25**	**26,52**	**26,19**	**26,66**
GP5	0,17	0,03	0,12	0,42	0,15	0,06	0,08	0,18	0,20	0,07	0,11	0,36	0,14	0,24
GP6	3,92	1,15	2,94	5,98	3,80	1,18	2,94	6,14	3,77	1,01	3,06	5,19	5,70	5,70
GP7	0,42	0,16	0,34	0,64	0,41	0,08	0,25	0,54	0,48	0,13	0,37	0,58	0,39	0,46
GP8	**18,82**	**1,47**	**16,90**	**23,34**	**19,31**	**2,26**	**16,63**	**23,12**	**18,91**	**1,80**	**16,71**	**23,34**	**18,32**	**18,38**
GP9	10,14	0,82	9,61	12,58	10,66	0,88	8,34	12,61	10,37	0,98	8,51	12,35	9,55	9,74
GP10	4,66	0,98	3,83	6,48	4,95	0,93	3,80	6,59	4,77	0,99	3,79	6,37	4,47	4,48
GP11	0,66	0,19	0,45	0,88	0,66	0,08	0,47	0,83	0,68	0,10	0,43	0,86	0,63	0,66
GP12	0,93	0,15	0,59	1,61	0,91	0,25	0,47	1,43	1,05	0,14	0,56	1,36	0,72	0,79
GP13	0,34	0,08	0,22	0,78	0,28	0,12	0,19	0,56	0,44	0,20	0,30	0,60	0,16	0,31
GP14	**16,56**	**4,78**	**13,00**	**20,43**	**16,67**	**2,87**	**12,63**	**22,81**	**16,28**	**1,93**	**12,65**	**21,96**	**11,30**	**11,67**
GP15	2,12	0,79	1,22	2,84	1,99	0,71	1,27	2,56	2,12	0,68	1,30	2,56	1,46	1,59
GP16	3,56	0,89	2,34	3,95	3,30	0,51	2,33	4,14	3,50	0,50	2,31	4,19	2,87	3,09
GP17	0,97	0,14	0,64	1,70	0,83	0,25	0,64	1,41	1,07	0,22	0,79	1,23	0,80	1,03
GP18	**10,07**	**3,32**	**7,00**	**15,12**	**10,39**	**3,67**	**6,84**	**15,04**	**10,14**	**3,53**	**7,08**	**15,00**	**7,65**	**8,25**
GP19	1,52	0,36	1,12	2,02	1,55	0,40	1,16	2,31	1,67	0,39	1,14	2,16	1,70	1,86
GP20	0,34	0,11	0,26	0,80	0,34	0,20	0,21	0,93	0,47	0,10	0,34	0,65	0,33	0,47
GP21	0,50	0,03	0,42	1,09	0,50	0,14	0,37	0,99	0,51	0,13	0,44	0,61	0,65	0,74
GP22	0,12	0,02	0,09	0,39	0,14	0,06	0,06	0,24	0,15	0,03	0,07	0,22	0,16	0,38
GP23	1,67	0,19	1,32	1,88	1,71	0,28	1,31	2,02	1,68	0,24	1,37	2,04	1,96	2,19
GP24	1,31	0,29	0,98	2,27	1,39	0,36	0,92	2,44	1,46	0,46	0,91	2,24	1,66	1,88
G0	**24,90**	**5,55**	**13,92**	**32,77**	**23,87**	**7,41**	**14,24**	**33,03**	**21,91**	**8,62**	**14,80**	**32,76**	**33,16**	**33,95**
G1	**34,91**	**2,53**	**33,70**	**37,87**	**36,04**	**1,63**	**33,31**	**38,00**	**36,45**	**2,62**	**33,63**	**37,93**	**33,50**	**33,59**
G2	**39,97**	**8,95**	**30,32**	**51,42**	**39,22**	**10,37**	**30,45**	**49,05**	**40,21**	**10,49**	**30,64**	**48,56**	**32,33**	**33,10**
F	**95,60**	**0,99**	**91,81**	**96,48**	**95,70**	**1,28**	**93,83**	**97,09**	**94,78**	**0,79**	**94,36**	**95,82**	**94,47**	**95,44**
B	**14,92**	**2,63**	**12,30**	**20,84**	**14,68**	**2,15**	**12,38**	**19,87**	**14,75**	**1,70**	**12,36**	**18,52**	**16,46**	**16,75**
S	**22,18**	**5,99**	**16,24**	**28,60**	**22,47**	**7,42**	**16,72**	**28,49**	**22,60**	**4,65**	**16,61**	**27,69**	**19,99**	**20,55**



Slika 11a. Promjena površine (%) najvećih pikova za svaku osobu tijekom 10 dana (nulti, prvi i deveti dan).



Slika 11b. Promjena (%) deriviranih parametara za svaku osobu tijekom 10 dana (nulti, prvi i deveti dan).

Za svaku od pet ispitanica, prikazane su promjene u glikozilaciji IgG (**Slika 12a.**) i razini deriviranih parametara (**Slika 12b.**), sve u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa (prikazan na apscisi). Dan 0 (nula) predstavlja početak menstruacije, odnosno desno od dana 0 radi se o novom ciklusu, a lijevo o prethodnom. Ovulacija se javlja na polovini ciklusa (14. dan ako se radi normalnom ciklusu od 28 dana). Može se uočiti da su osobe F i H otprilike u istoj fazi ciklusa, u periodu od ovulacije pa do početka novog menstruacijskog ciklusa, kao i osobe G i J, koje se nalaze na prijelazu između dva ciklusa.

Za osobe koje se nalaze u istoj fazi ciklusa može se primijetiti približno isti smjer promjene. Kod osoba G i H promjena je najizraženija, ali je suprotnog smjera u periodu između prvog i devetog dana.

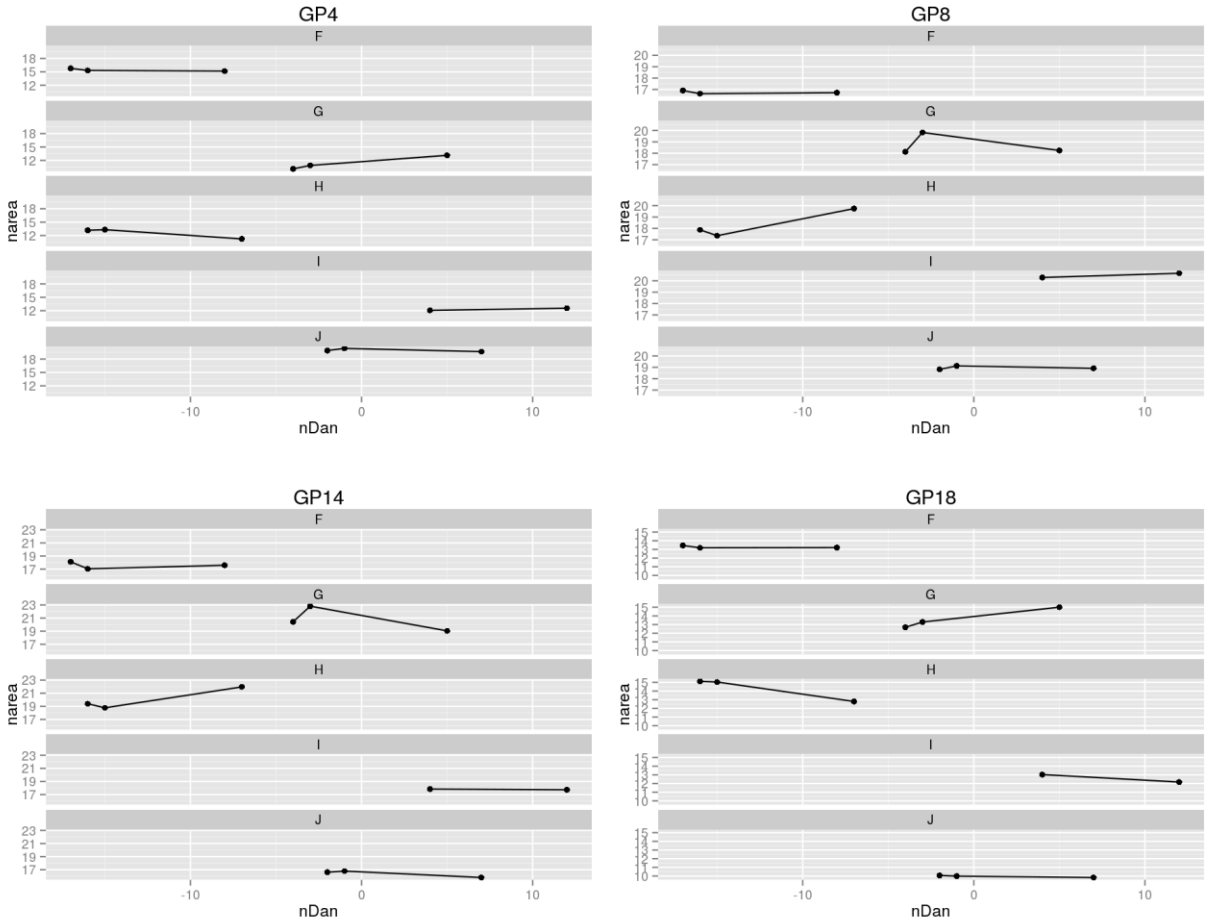
Osobi H, koja se nalazi u periodu nakon ovulacije, GP8 (A2BG1, FA2[6]G1) raste između prvog i devetog dana za 2,38%, a GP14 (FA2G2) za 3,18%. GP4 se u istom periodu smanjuje za 2,07%, a GP18 (A2BG2S1, FA2G2S1) za 2,22%. Kod osobe G, čija se zadnja vremenska točka nalazi pri završetku menstruacije, GP4 (FA2) raste za 2,27% između prvog i devetog dana, GP8 (A2BG1, FA2[6]G1) naglo raste nultog i prvog dana za 1,69% te pada za 1,58% deveti dan. GP14 (FA2G2) također naglo raste između nultog i prvog dana za 2,38% te pada za 3,03% deveti dan. GP18 (A2BG2S1, FA2G2S1) raste s 2,31% između nultog dana i devetog dana.

Promatrajući derivirane parametre, može se uočiti nešto veća razlika kod svih ispitanica. Parametar G0 raste za 3,2% između nultog i devetog dana kod osobe G, dok kod osobe H pada za 2,68% između prvog i devetog dana. Kod ispitanice H primjećuje se značajan rast parametra G1 za 3,44% između prvog i devetog dana, dok se rast od 2,54% primjećuje i kod osobe G, između nultog i prvog dana, nakon čega opada za 2,65% do devetog dana. Porast parametra F je najizraženiji kod osobe G i to između nultog i prvog dana, za 4,6%. Kod osobe H parametar F smanjuje se za 3,47% između prvog i devetog dana, dok se kod osobe G također smanjuju između nultog i prvog dana za 3,83% ,a potom rastu za 2,92%. Kod osobe G uočen je značajniji pad parametara G2 od 2,58% između nultog i prvog dana, kao i kod parametara B i S u istom periodu.

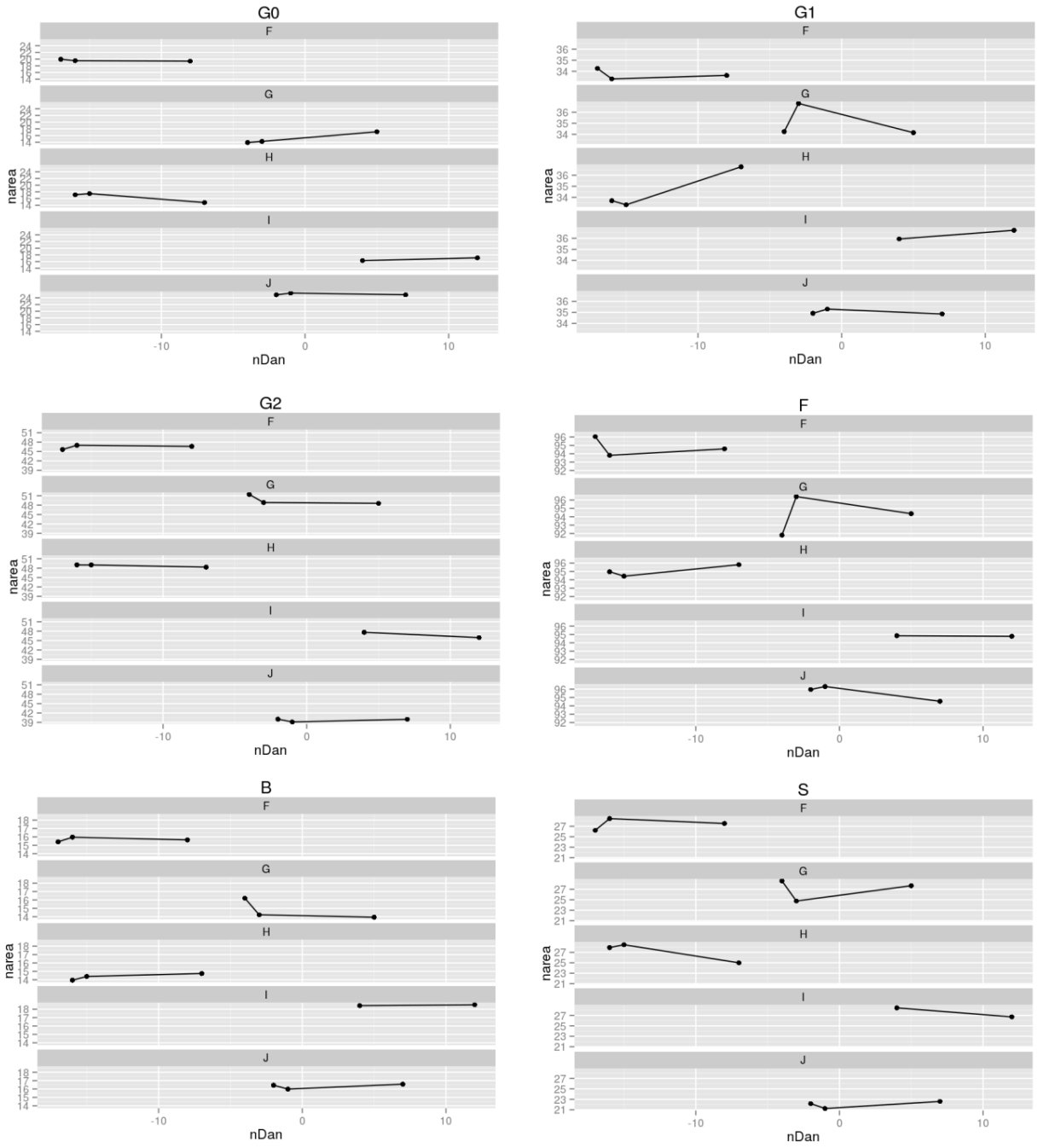
Za razliku od promjena koje su uočene kod glikanskih struktura i deriviranih parametara dobivenih analizom N-glikoma krvne plazme, gdje su se ispitanice u istoj fazi ciklusa međusobno razlikovale po smjeru promjene, kod glikana i deriviranih parametara dobivenih analizom N-glikoma IgG, promjene su pokazuju isti smjer u odnosu na fazu ciklusa. Također se primjećuje da uglavnom nulta i prva vremenska točka osobe G imaju isti smjer promjene kao prva i deveta vremenska točka osobe H, a da prva i deveta točka osobe G

i H, pokazuju suprotan smjer promjene, ovisno da li osobi završava menstruacija (osoba G) ili se tek nalazi u periodu nakon ovulacije (osoba H), što implicira da se radi o hormonskom utjecaju. Zasad ne postoji ni jedna studija koja se bavila povezanošću promjene glikozilacije proteina plazme i IgG u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa, stoga su navedene promjene uočene kao zanimljivost i treba ih dalje ispitati. Zbog malo broja ispitanika potrebno je provesti opsežniju studiju s većim brojem ispitanika i ponavljanja kako bi se utvrdilo da li postoji statistička značajnost uočenih promjena, unatoč činjenici da se metoda kojom su dobiveni dati podaci pokazala izuzetno stabilnom. Također, ne postoji studija koja se bavila analizom vremenske stabilnosti N-glikoma IgG kroz određeni vremenski period pa dobiveni podaci mogu služiti kao poticaj za daljnja istraživanja na ovom području.

Porast razine agalaktoziliranih (G0) glikana s povećanjem starosti pojedinca može se uočiti među ispitanicima uključenima u ovaj rad, izuzev osobe J, što potvrđuje prvotna opažanja u promjeni glikozilacije IgG s godinama (Parekh i sur., 1988.). Povećanje udjela glikana s račvajućim GlcNAc (Ruhaak i sur., 2010) i smanjenje sijalinizacije IgG (Pučić i sur., 2011) s povećanjem starosti pojedinca, nije uočeno kod ispitanika uključenih u ovaj rad, ponovno zbog njihovog malog broja i ne tako velike razlike u godinama.



Slika 12a. Promjena razine (%) glavnih glikanskih struktura IgG, tijekom deset dana, u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa svake ispitanice. Dan 0 predstavlja početak menstruacije. Desno od dana 0 prikazan je novi ciklus, a lijevo prethodni.



Slika 12b. Promjena razine (%) deriviranih parametara tijekom 10 dana, u odnosu na fazu menstruacijskog ciklusa svake ispitanice. Dan 0 predstavlja početak menstruacije. Desno od dana 0 prikazan je novi ciklus, a lijevo prethodni.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu prikazana je vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme i N-glikoma IgG kod svakog od deset zdravih ispitanika (pet muškaraca i pet žena), tijekom deset dana. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. N-glikom krvne plazme kod muškaraca pokazuje vrlo dobru stabilnost u periodu od deset dana. Kod žena je promjena izraženija te je smjer promjene u razini glavnih glikanskih struktura i deriviranih parametara izrazito individualan neovisno o fazi menstruacijskog ciklusa.

2. N-glikom IgG pokazuje vrlo dobru stabilnost u periodu od deset dana, a kod dvije ženske osobe uočava se promjena dinamičnijeg karaktera. Ovisno o fazi menstruacijskog ciklusa, GP8, GP14 te derivirani parametri G1 i F rastu nakon ovulacije, a smanjuju se pri završetku menstruacije. GP4, GP18 te parametri G0 i S pokazuju suprotan smjer promjene.

3. Uočena stabilnost N-glikoma krvne plazme i IgG upućuje na dobru genetsku kontrolu procesa glikozilacije te ukazuje na to da moguće promjene u glikozilaciji predstavljaju odraz okolišnih utjecaja i patofizioloških procesa u pozadini. Njihova analiza stoga može imati veliki dijagnostički i prognostički potencijal.

6. LITERATURA

1. Anumula KR. Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J Immunol Methods* 2012; 382:167-176.
2. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:4–8.
3. 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.
4. Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonselective and Efficient Fluorescent Labeling of Glycans Using 2-Amino Benzamide and Anthranilic Acid. *Analytical Biochemistry* 1995; 230(2):229–238.
5. Biofiles for Life Science Research. Glycobiology, 2007., http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/2/biofiles_issue6.pdf, pristupljeno 10.3.2015.
6. Bondt A, Rombouts Y, Selman MH, Hensbergen PJ, Reiding KR, Hazes JM, Dolhain RJ, Wuhrer M. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(11):3029-392.
7. Coloma MJ, Trinh RK, Martinez AR, Morrison SL. Position effects of variable region carbohydrate on the affinity and in vivo behavior of an anti-(1→6) dextran antibody. *J Immunol* 1999; 162:2162-2170.
8. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
9. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers* 2008; 25:267–278.
10. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(9):1318-26.
11. Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* 2009; 19(12):1547–1553.
12. Goward CR, Murphy JP, Atkinson T, Barstow DA. Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G. *Biochem J* 1990; 267:171-177.

13. Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal Biochem* 1996; 240:210–226.
14. Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of α1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1725:128–135.
15. Holland M, Yagi H, Takahashi N, Kato K, Savage CO, Goodall DM, Jefferis R. Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760(4):669-677.
16. Horvat T, Mužinić A, Barišić D, Bosnar MH, Zoldoš V. Epigenetic modulation of the HeLa cell membrane N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(9):1412-1419.
17. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* 2005; 21:11–16.
18. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 2006; 313:670–673.
19. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, McDonald JU, Orr SJ, Berger M, Petzold D, Blanchard V, Winkler A, Hess C, Reid DM, Majoul IV, Strait RT, Harris NL, Köhl G, Wex E, Ludwig R, Zillikens D, Nimmerjahn F, Finkelman FD, Brown GD, Ehlers M, Köhl J. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med* 2012; 18(9):1401-1406.
20. Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, Rudd PM, Wright AF, Campbell H, Rudan I, Lauc G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology* 2010; 20(8):959–969.
21. Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wright A, Kolčić I, O'Donoghue N, Bones J, Rudd PM, Lauc G. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res* 2009; 8(2):694-701.
22. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N,Šarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Spector T, Lauc G. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(7):779-789.

23. Lauc G, Essafi A, Huffman JE, Hayward C, Knežević A, Kattla JJ, Polašek O, Gornik O, Vitart V, Abrahams JL, Pučić M, Novokmet M, Redžić I, Campbell S, Wild SH, Borovečki F, Wang W, Kolčić I, Zgaga L, Gyllensten U, Wilson JF, Wright AF, Hastie ND, Campbell H, Rudd PM, Rudan I. Genomics meets glycomics: The first GWAS study of human N-glycome identifies HNF1α as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet* 2010; 6(12).
24. Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans - the third revolution in evolution. *Front Genet* 2014; 5:145.
25. Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci* 2015.
26. 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(10):713-23.
27. Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, Rademacher T. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J Exp Med* 1988;167(5):1731-1736.
28. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, Takeuchi F, Nagano Y, Miyamoto T, Kobata A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 1985; 316:452-457.
29. Pučić M, Knežević A, Vidić J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Šupraha-Goreta S, Wormald MR, Redžić I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, Wilson JF, Rudan I, Wuhrer M, Rudd PM, Josić Đ, Lauc G. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG – variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations, *Mol Cell Proteomics* 2011; 10(10).
30. Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, Škledar M, Picav N, Lauc G, Gornik O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology* 2012; 22(7):975–982.
31. Roberts MW, Ongkudon CM, Forde GM, Danquah MK. Versatility of polymethacrylate monoliths for chromatographic purification of biomolecules. *J Sep Sci* 2009; 32:2485–2494.
32. Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. Detailed structural analysis of n-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol* 2006; 347:125-143.

33. Ruhaak, L. R., Uh, H. W., Beekman, M., Koeleman, C. A., Hokke, C. H., Westendorp, R. G., Wuhrer, M., Houwing-Duistermaat, J. J., Slagboom, P. E., and Deelder, A. M. (2010) Decreased levels of bisecting GlcNAc glycoforms of IgG are associated with human longevity. *PLoS One* 2010; 5(9).
34. Saldova R, Shehni AA, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, Helland A, Yakhini Z, Børresen-Dale AL, Rudd PM. Association of N‑glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res* 2014; 13: 2314−2327.
35. Saldova R, Dempsey E, Pérez-Garay M, Mariño K, Watson JA, Blanco-Fernández A, Struwe WB, Harvey DJ, Madden SF, Peracaula R, McCann A, Rudd PM. 5-AZA-2'-deoxycytidine induced demethylation influences N-glycosylation of secreted glycoproteins in ovarian cancer. *Epigenetics* 2011; 6(11):1362-1372.
36. Saldova R, Fan Y, Fitzpatrick JM, Watson RW, Rudd PM. Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. *Glycobiology* 2011; 21(2):195-205.
37. Saldova R, Huffman JE, Adamczyk B, Mužinić A, Kattla JJ, Pučić M, Novokmet M, Abrahams JL, Hayward C, Rudan I, Wild SH, Wright AF, Polašek O, Lauc G, Campbell H, Wilson JF, Rudd PM. Association of medication with the human plasma N-glycome. *J Proteome Res* 2012; 11(3):1821-1831.
38. Saldova R, Royle L, Radcliffe CM, Abd Hamid UM, Evans R, Arnold JN, Banks RE, Hutson R, Harvey DJ, Antrobus R, Petrescu SM, Dwek RA, Rudd PM. Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology* 2007; 17(12):1344-1356.
39. Tanabe K, Deguchi A, Higashi M, Usuki H, Suzuki Y, Uchimura Y, Kuriyama S, Ikenaka K. Outer arm fucosylation of N-glycans increasesin sera of hepatocellular carcinoma patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374:219–225.
40. Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* 1985; 24:4665–4671.
41. Tetala KK, van Beek TA. Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *J Sep Sci* 2010; 33:422–438.
42. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction, 2005., http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf, pristupljeno 07.04.2015.

43. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, Hazes JM, Dolhain RJ. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(6):R193.
44. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
45. Vegeto E, Ciana P, Maggi A. Estrogen and inflammation: hormone generous action spreads to the brain. *Mol Psychiatry* 2002; 7(3):236−238.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Glikozilacija je proces koji se nalazi pod značajnom genskom kontrolom te je najmanje 10% ljudskog genoma posredno zaduženo za stvaranje širokog spektra glikanskih struktura. Prijašnja znanstvena istraživanja pokazala su da glikozilacija proteina može biti promijenjena pod utjecajem okolišnih faktora, primjerice pušenja, ali i različitih akutnih i kroničnih upalnih stanja te malignih oboljenja. Stoga je važno proučiti da li se N-glikom krvne plazme i N-glikom imunoglobulina G (IgG) zdrave osobe mijenjaju kroz kraći vremenski period, što je ujedno bila i tema ovog diplomskog rada.

U ispitivanju je bilo uključeno pet zdravih muškaraca i pet zdravih žena, kojima je tri puta tijekom deset dana, uzeta krv na antikoagulans (EDTA). Krvna plazma odvojena je centrifugiranjem te je iz nje, uz pomoć monolita s proteinom G, izoliran IgG. N-glikani proteina krvne plazme i IgG, oslobođeni su s proteina enzimom PNGaza F i fluorescentno obilježeni 2-aminobenzamidom, nakon čega su analizirani tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti, bazirane na kromatografiji hidrofilnih interakcija (UPLC-HILIC). Dobiveni kromatogrami, koji predstavljaju profil N-glikana krvne plazme, podijeljeni su na 39 kromatografskih vršaka, a oni koji predstavljaju profil N-glikana IgG, na 24 kromatografska vrška odnosno pika. Količina glikana unutar svakog pika izračunata je kao postotak (%) od ukupne integrirane površine.

Analizom dobivenih podataka, uočeno je da N-glikom krvne plazme, tijekom deset dana, pokazuje vrlo dobru stabilnost kod muškaraca. Kod žena je promjena izraženija te je smjer promjene izrazito individualan i neovisan o fazi menstruacijskog ciklusa. N-glikom IgG izrazito je stabilan kod većine ispitanih osoba, a najveća promjena uočena je kod dvije ženske osobe. One su se u danim trenucima nalazile u različitim fazama menstruacijskog ciklusa, što se moglo odraziti na opažen suprotan smjer promjene istih glikanskih struktura i deriviranih parametra.

Ova studija stoga može poslužiti kao predložak za neka daljnja i opsežnija istraživanja vremenske stabilnosti N-glikoma plazme i IgG, na većem broju ispitanika, uz veći broj ponavljanja, kako bi se utvrdila moguća statistička značajnost uočenih promjena i potencijalna povezanost s pojedinom fazom menstruacijskog ciklusa kod žena.

SUMMARY

Glycosylation is a process that is under significant genetic control and at least 10% of human genome is indirectly responsible for creating a wide range of different glycan structures. Past studies showed that glycosylation can be altered during acute and chronic inflammatory diseases, carcinomas or as a consequence of environmental influence, like smoking. Thus, it is important to study temporal stability of N-glycan profiles in human plasma and immunoglobulin G (IgG), which was also the aim of this thesis.

In this work five healthy male and five healthy female individuals were included. Blood was taken three times trough ten days in epruvetes containing anticoagulant (EDTA) and plasma was separated by centrifugation. IgG was isolated using Protein G monolithic plate. N-glycans were released using PNGase F enzyme and fluorescently labeled with 2-aminobenzamide. Fluorescently labeled N-glycans were separated by ultra performance liquid chromatography, based on hydrophilic interaction chromatography. The chromatograms obtained were all seperated in the same manner into 39 peaks, for human plasma N-glycome, and 24 peaks for IgG N-glycome. The amount of glycans in each peak was expressed as percentage (%) of total integrated area.

The analysis indicated very good temporal stability of human plasma N-glycome in male individuals. The changes were more pronounced in female individuals, but the direction of changes were extremely individual. IgG N-glycome indicated pronounced temporal stability in most individuals and the biggest changes in glycosylation were observed in two females. They were in different stages of menstrual cycle and the observed changes in glycosylation were in the opposite direction for the same glycan structures and derived traits in both female individuals. This work can serve as a template for more extensive studies of temporal stability of human plasma and IgG N-glycome in the future, with more samples, to determine possible statistical significance of changes in protein glycosylation.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme i imunoglobulina G

Maja Hanić

SAŽETAK

Glikozilacija je proces koji se nalazi pod značajnom genskom kontrolom te je najmanje 10% ljudskog genoma posredno zaduženo za stvaranje širokog spektra glikanskih struktura. Prijašnja znanstvena istraživanja pokazala su da glikozilacija proteina može biti promijenjena pod utjecajem okolišnih faktora, primjerice pušenja, ali i različitih akutnih i kroničnih upalnih stanja te malignih oboljenja. Stoga je važno proučiti da li se N-glikom krvne plazme i N-glikom imunoglobulina G (IgG) zdrave osobe mijenjaju kroz kraći vremenski period, što je ujedno bila i tema ovog diplomskog rada. U ispitivanju je bilo uključeno pet zdravih muškaraca i pet zdravih žena, kojima je tri puta tijekom deset dana, uzeta krv na antikoagulans (EDTA). Krvna plazma odvojena je centrifugiranjem te je iz nje, uz pomoć monolita s proteinom G, izoliran IgG. N-glikani proteina krvne plazme i IgG, oslobođeni su s proteina enzimom PNGaza F i fluorescentno obilježeni 2-aminobenzamidom, nakon čega su analizirani tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti, bazirane na kromatografiji hidrofilnih interakcija (UPLC-HILIC). Dobiveni kromatogrami, koji predstavljaju profil N-glikana krvne plazme, podijeljeni su na 39 kromatografskih vršaka, a oni koji predstavljaju profil N-glikana IgG, na 24 kromatografska vrška odnosno pika. Količina glikana unutar svakog pika izračunata je kao postotak (%) od ukupne integrirane površine. Analizom dobivenih podataka, uočeno je da N-glikom krvne plazme, tijekom deset dana, pokazuje vrlo dobru stabilnost kod muškaraca. Kod žena je promjena izraženija te je smjer promjene izrazito individualan i neovisan o fazi menstruacijskog ciklusa. N-glikom IgG izrazito je stabilan kod većine ispitanih osoba, a najveća promjena uočena je kod dvije ženske osobe. One su se u danim trenucima nalazile u različitim fazama menstruacijskog ciklusa, što se moglo odraziti na opažen suprotan smjer promjene istih glikanskih struktura i deriviranih parametra. Ova studija stoga može poslužiti kao predložak za neka daljnja i opsežnija istraživanja vremenske stabilnosti N-glikoma plazme i IgG, na većem broju ispitanika, uz veći broj ponavljanja, kako bi se utvrdila moguća statistička značajnost uočenih promjena i potencijalna povezanost s pojedinom fazom menstruacijskog ciklusa kod žena.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranice, 16 grafičkih prikaza, 7 tablica i 45 literaturnih navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikani; N-glikom krvne plazme; N-glikom imunoglobulina G; Vremenska stabilnost; UPLC-HILIC

Mentor: **Dr. sc. Gordan Lauc**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordan Lauc**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Olga Gornik, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of biochemistry and molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Temporal stability of human plasma and immunoglobulin G *N*-glycomes

Maja Hanić

SUMMARY

Glycosylation is a process that is under significant genetic control and at least 10% of human genome is indirectly responsible for creating a wide range of different glycan structures. Past studies showed that glycosylation can be altered during acute and chronic inflammatory diseases, carcinomas or as a consequence of environmental influence, like smoking. Thus, it is important to study temporal stability of N-glycan profiles in human plasma and immunoglobuline G (IgG), which was also the aim of this thesis. In this work five healthy male and five healthy female individuals were included. Blood was taken three times trough ten days in epruvetes containing anticoagulant (EDTA) and plasma was separated by centrifugation. IgG was isolated using Protein G monolithic plate. N-glycans were released using PNGase F enzyme and fluorescently labeled with 2-aminobenzamide. Fluorescently labeled N-glycans were separated by ultra performance liquid chromatography, based on hydrophilic interaction chromatography (UPLC-HILIC). The chromatograms obtained were all seperated in the same manner into 39 peaks, for human plasma N-glycome, and 24 peaks for IgG N-glycome. The amount of glycans in each peak was expressed as percentage (%) of total integrated area. The analysis indicated very good temporal stability of human plasma N-glycome in male individuals. The changes were more pronounced in female individuals, but the direction of changes were extremely individual. IgG N-glycome indicated pronounced temporal stability in most individuals and the biggest changes in glycosylation were observed in two female individuals. They were in different stages of menstrual cycle and the observed changes in glycosylation were in the opposite direction for the same glycan structures and derived traits in both female individuals. This work can serve as a template for more extensive studies of temporal stability of human plasma and IgG N-glycome in the future, with more samples, to determine possible statistical significance of changes in protein glycosylation.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 16 figures, 7 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycans; Human plasma N-glycome; Immunoglobuline G N-glycome; Temporal stability; UPLC-HILIC

Mentor: **Gordan Lauc**, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordan Lauc**, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Olga Gornik, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2015.