Razvoj metode za analizu glikanskog profila IgG-a izoliranog iz sinovijalne tekućine

Krešić, Bernard

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:436700

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Bernard Krešić

RAZVOJ METODE ZA ANALIZU GLIKANSKOG PROFILA IgG-a IZOLIRANOG IZ SINOVIJALNE TEKUĆINE

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordanu Laucu na pružanju prilike za rad i usvajanje novih znanja.

Velika zahvala i dr. sc. Ireni Trbojević Akmačić na pomoći, strpljenju, pristupačnosti i korisnim savjetima tijekom cijelog postupka izrade diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi oduvijek nepresušan izvor potpore.

I na kraju, zahvaljujem se prijateljima i rodbini, koji su mi uljepšavali slobodne trenutke tijekom studija.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Glikani ... 1
1.2. Glavne skupine glikana i glikokonjugata ... 3
1.3. Biosintetski put glikozilacije ... 4
1.4. Imunoglobulin G ... 6
1.5. Reumatoidni artritis ... 9
2. OBRAZLOŽENJE TEME ... 11
3. MATERIJALI I METODE ... 13
3.1. Materijali ... 13
3.1.1. Kemikalije i enzimi ... 13
3.1.2. Otopine ... 14
3.1.3. Uzorci ... 15
3.2. Metode ... 15
3.2.1. Pročišćavanje IgG-a imunoprecipitacijom ... 15
3.2.1.1. Protokol ... 16
3.2.1.2. Optimiranje protokola ... 17
3.2.2. SDS-PAGE ... 18
3.2.2.1. Gel i uzorci ... 18
3.2.2.2. Provođenje SDS-PAGE ... 19
3.2.3. N-deglikozilacija IgG-a i obilježavanje glikana ... 19
3.2.3.1. Priprema uzoraka i potrebnih kemikalija ... 19
3.2.3.2. Denaturacija proteina ... 19
3.2.3.3. N-deglikozilacija proteina ... 19
3.2.3.4. Priprema 2-AB otopine za obilježavanje glikana ... 20
3.2.3.5. Obilježavanje glikana 2-AB-om ... 20
3.2.3.6. Priprema 1 mL AcroPrep GHP 0,2 μm filter pločice ... 20
3.2.3.7. Nanošenje i pročišćavanje 2-AB obilježenih uzoraka na pripremljenu filter pločicu 20
3.2.3.8. Eluiranje 2-AB obilježenih glikana ... 20
3.2.4. UPLC analiza N-glikana ... 21
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 24
5. ZAKLJUČCI ... 44
6. LITERATURA ... 45
7. SAŽETAK/SUMMARY ... 48

1. UVOD

1.1. Glikani

Uz DNA, proteine i lipide, glikani su jedan od četiri osnovna gradivna bloka stanice. Najbrojniji su i najraznolikiji prirodni biopolimeri, sagrađeni od monosaharida koji se najčešće vežu na proteine i lipide u staničnom sekretornom putu, tj. u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu. No njihov značaj nije potkrijepljen samo brojevima, već i neophodnošću za sam početak života. Pokazano je da su oni nužni za postojanje višestaničnog života, gledajući kako je potpuna odsutnost glikana letalna za embrij (Marek i sur., 1999). Svi glikani organizma/tkiva/stanice/proteina se nazivaju glikomom, a područje koje proučava glikom se naziva glikomikom. Glikomika je relativno mlado područje istraživanja, ali se sve više shvaća njezina važnost u potpunom razumijevanju fiziologije čovjeka, što potvrđuje i broj od preko 1.5 milijun publikacija u zadnjih 5 godina (Lauc i sur., 2016).

Činjenice da brojem gena čovjek premašuje jednostavne bakterije za samo faktor pet, da imamo gotovo isti broj gena kao miš ili zebrica, te da se naš genom razlikuje od genoma čimpanze za samo 4% nam jasno govore da naša posebnost ne proizlazi samo iz broja gena ili gena specifičnih/jedinstvenih za čovjeka (Gornik i sur., 2011; Varki i Altheide, 2005). Mislili smo da ćemo sekvenciranjem ljudskog genoma otkriti što je to što nas izdiže na posebno mjesto u životinjskom carstvu, a otkrili smo da ipak nismo toliko drugačiji od bliskih (pa čak i ne tako bliskih) životinja, bar što se genoma tiče. Ispostavilo se da geni predstavljaju samo paletu mogućnosti, skup alata, a da je način na koji ih koristimo ono što stvara toliku razliku. Epigenetika, nekodirajuće DNA, RNA izrezivanje, posttranslacijske modifikacije su neka od bioloških svojstava koja nam to omogućuju. Jedna od posttranslacijkih modifikacija koja pokazuje ogroman potencijal u rasvjetljavanju velikog broja mehanizama posebnog korištenja alata (gena) je upravo glikozilacija. Razumijevanje glikozilacije u čovjeku je važan korak prema potpunom razumijevanju načina na koje ljudsko tijelo funkcionira (Gornik i sur., 2011).

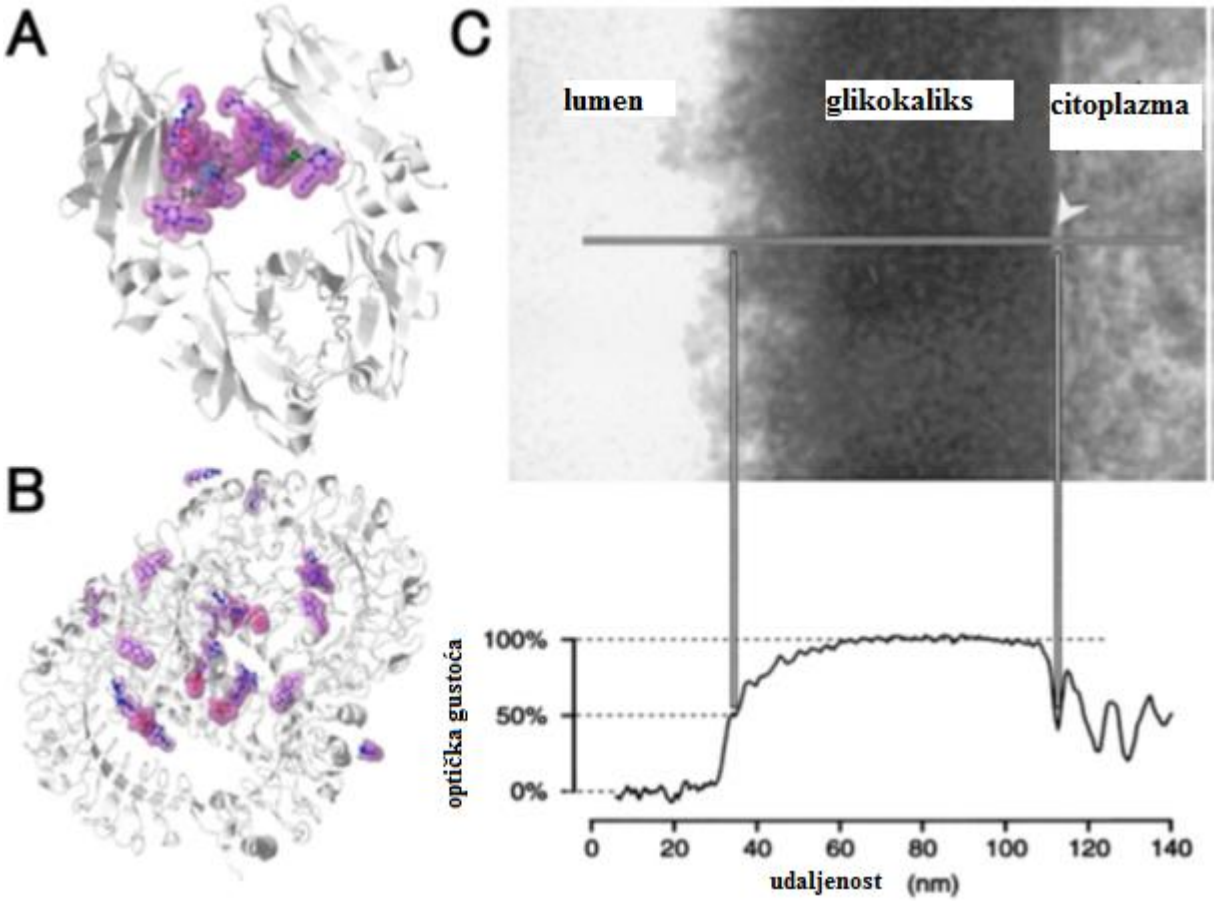
Iako je glikomika relativno novo područje, glikobiologija kao starije i općenitije područje ima dugu povijest koja je počela sa istraživanjem osnovnih komponenti stanica i monomernim sastavom polisaharida. Klinička primjenjivost je već početkom 20. stoljeća postala evidentna. Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu 1930. g. je pripala Karlu Landsteineru „za njegovo otkriće ljudskih krvnih grupa“ koje su posljedica različitih glikana na eritrocitima i

koji su danas najvažnija klasifikacija krvnih grupa u transfuziji (www.nobelprize.org). Heparin je antitrombotički glikan i jedan od najkorištenijih lijekova na svijetu, s procjenama od milijardu doza godišnje (Ohtsubo i Marth, 2006). Važni primjeri su i antivirotici zanamivir i oseltamivir, strukturni analozi sijalinske kiseline koji inhibiraju virusnu neuraminidazu i transmisiju virusa, te hijaluronska kiselina koja se koristi u terapiji artritisa. Mnogi rekombinantni farmaceutici, uključujući terapijska monoklonska protutijela, su glikoproteini. Specifične glikoforme ovih protutijela su ključne za njihovu biološku aktivnost i poluživot u cirkulaciji, te za njihovu moguću indukciju imunosnog sustava (Hart i Copeland, 2010).

Glikani se sintetiziraju od monosaharidnih ostataka kroz pažljivo regulirani enzimski kontrolirani proces glikozilacije. Za razliku od proteina, koji su definirani slijedom nukleotida u genima, glikani se oblikuju kroz kompleksne dinamičke interakcije između stotina enzima, transkripcijskih faktora, ionskih kanala i drugih proteina. Na sintezu glikana utječe genetička podloga (na razini proteina/enzima potrebnim za sintezu glikana) i okolišni faktori. Glikani integriraju te dvije sastavnice, te predstavljaju oblik stanične memorije, koja modulira trenutnu staničnu fiziologiju na osnovi relativno nedavnih događaja. Da bi se promijenio ili prilagodio ljudski protein uobičajeno su potrebne godine, mutacije, te uspješno nasljeđivanje biranih karakteristika, dok je glikom spreman na gotovo trenutne promjene (gledajući u odnosu na proteine) koje se događaju kroz cijeli životni vijek (Lauc i sur., 2016.).

Glikozilacija proteina je ubikvitarna posttranslacijska modifikacija koju možemo pronaći u svim domenama života (Moremen i sur., 2012). Glikani sudjeluju u brojnim molekularnim procesima, kao što su smatanje proteina, stanična adhezija, transport molekula, transdukcija signala, modulacija aktivnosti receptora i drugi. Kao takvi imaju veliku ulogu u svim fundamentalnim funkcijama višestaničnog organizma, uključujući imunosni sustav, posebno u pogledu održavanja funkcije mukozne barijere, razlikovanja „svojeg“ od „tuđeg“ i ponašanja imunosnih stanica. Ljudske stanice su prekrivene debelim slojem glikana vezanih za membranske proteine i lipide koji se zove glikokaliks. Glikokaliks je najmanje 10, a ponekad i 1000 puta deblji od same stanične membrane (Slika 1). Taj omotač predstavlja stanični otisak prsta, način na koje tijelo raspoznaje „svoje“ od „tuđeg“. Nađe li se u našem tijelu stanica s drugačijim, nepoznatim omotačem (npr. infektivni organizam, transplantirano tkivo, ali i vlastite bolesne stanice), tijelo će ubrzo pokrenuti svoj obrambeni mehanizam protiv takve stanice (Lauc i sur., 2016). No glikani nisu svojstveni samo višestaničnim organizmima, što je i pokazano na primjeru „dobre bakterije“ *Bacteroides fragilis* koja je dio normalne

ljudske crijevne mikroflore. Glikozilacija proteina je ključna u fiziologiji *B. fragilis* i nužna za kompetitivnu kolonizaciju crijeva (Fletcher i sur., 2009).



Slika 1. Prikaz udjela glikana u nekim glikoproteinima i debljine glikokaliksa u odnosu na staničnu membranu. Dva primjera glikoproteinske strukture: fragment F_c imunoglobulina G (A) i TLR 8 (B) (eng. *toll-like receptor*) prikazani su kao molekularni modeli. Polipeptidna okosnica je prikazana sivo, a glikani su u boji. Usprkos njihovom drugačijem biosintetskom porijeklu, i glikanski i polipeptidni dio sudjeluju u strukturi i funkciji glikoproteina. Glikani su osobito važni na staničnoj membrani gdje tvore glikokaliks (C), kompleksan sloj glikoproteina i proteoglikana koji je najmanje 10 puta deblji od fosfolipidnog dvosloja stanične membrane. Preuzeto i prilagođeno iz Vogel i sur., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 20:1571, 2000.

1.2. Glavne skupine glikana i glikokonjugata

Glavne skupine glikana u ili na eukariotskim stanicama su primarno definirane prema prirodi veze s aglikonom (protein ili lipid). Glikoprotein je glikokonjugat u kojem protein nosi jedan ili više glikana kovalentno vezanih za polipeptidnu okosnicu, uobičajeno preko N ili O veza. N-glikan je šećerni lanac kovalentno vezan za asparaginski ostatak polipeptidnog lanca, i to

preko *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) na konsenzusnu sekvencu peptida Asn-X-Ser/Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim Pro. N-glikani dijele zajedničku pentasaharidnu sržnu regiju i mogu se razvrstati u tri glavne klase: oligomanozni tip, kompleksni tip i hibridni tip. O-glikani su često vezani na polipeptid preko *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc) na hidroksilnu grupu serinskog ili treoninskog ostatka i mogu se razvrstati u više različitih klasa prema sastavu sržne regije. Jedan primjer su mucini kao veliki glikoproteini koji nose puno blisko zbijenih O-glikana. Proteoglikan je glikokonjugat koji sadrži jedan ili više glikozaminoglikanskih (GAG) lanaca vezanih na protein nosač preko tipične sržne regije glikana koja završava ksiloznim ostatkom vezanim na hidroksilnu grupu serinskog ostatka. Razlika između proteoglikana i glikoproteina je inače arbitrarna, jer neki polipeptidi mogu nositi i GAG lance i različite N- i O-glikane (Varki i sur., 2009).

Glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) sidro je glikanski most između fosfatidilinozitola i fosfoetanolamina koji je u amidnoj vezi sa karboksilnim krajem proteina. Ova struktura je praktički jedino sidro koje veže takve proteine za lipidni dvosloj. Glikosfingolipid (često zvan samo glikolipid) se sastoji od glikana najčešće vezanog preko glukoze ili galaktoze na terminalnu primarnu hidroksilnu grupu lipida ceramida, koji se sastoji od dugolančane osnove (sfingozin) i masne kiseline. Glikolipidi mogu biti neutralni ili anionski. Gangliozid je anionski glikolipid koji sadrži jedan ili više sijalinskih ostataka. Treba napomenuti da dosada nabrojani glikani predstavljaju samo najčešće klase glikana nađenih u eukariotskim stanicama. Postoje još brojne klase koje se rjeđe susreću na jednoj ili drugoj strani stanične membrane životinjskih stanica (Varki i sur., 2009).

1.3. Biosintetski put glikozilacije

Većina dobro karakteriziranih puteva biosinteze glikana se odvija unutar ER-a i Golgijevog aparata. U skladu s tim, novo sintetizirani proteini podrijetlom iz ER-a su kotranslacijski i posttranslacijski modificirani šećernim lancima u raznim etapama njihovog putovanja prema konačnoj destinaciji. U reakcijama glikozilacije uobičajeno se koriste aktivirani oblici monosaharida (nukleotidni šećeri) kao donori za reakcije katalizirane glikoziltransferazama. Ti nukleotidni donori su gotovo uvijek sintetizirani u citosolu ili jezgri iz monosaharidnih prekursora endogenog ili egzogenog podrijetla. Da bi bili dostupni za reakcije glikozilacije, donori moraju biti aktivno preneseni preko membranskog dvosloja u lumen ER-a ili Golgijevog aparata. Puno truda je uneseno u razumijevanje mehanizama reakcija glikozilacije

u ER-u i Golgijevom aparatu i jasno je da razni faktori odlučuju završni produkt glikozilacije. Neki manji šećerni lanci nastaju na citoplazmatskoj strani tih unutarstaničnih organela i prebacuju se preko membrane u lumen, ali većina se sintetizira postepenim dodavanjem jednog po jednog šećera na rastući glikan u unutrašnjosti ER-a ili Golgijevog aparata. Neovisno od toga, dio glikokonjugata koji je okrenut prema unutrašnjosti ER-a i Golgijevog aparata će na kraju svog sintetskog puta biti okrenut prema unutrašnjosti sekretorne granule ili lizosoma i neće bit izložen citosolu. Biosintetski enzimi (glukotransferaze, sulfostransferaze, itd.) odgovorni za kataliziranje tih reakcija su dobro proučeni i njihove točne lokacije su pomogle u definiranju različitih funkcionalnih odjeljaka ER-Golgi puta. Prema klasičnom modelu enzimi su fizički poredani kroz biosintetski put glikana u točnom poretku u kojem zapravo rade. Međutim, ispostavilo se da je to vrlo pojednostavljeno gledište, jer postoji značajno preklapanje u rasporedu tih enzima, te zapravo raspored određenog enzima ovisi o tipu stanice (Varki i sur., 2009). Štoviše, novija istraživanja pokazuju da se glikoziltransferaze nalaze u kompleksima, što uvelike određuje njihovu aktivnost (Kellokumpu i sur., 2016).

Sva gore spomenuta topološka razmatranja o biosintezi glikana su obrnuta kad su u pitanju nuklearna i citoplazmatska glikozilacija. Aktivna mjesta glikoziltranferaza uključenih u taj tip glikozilacije su okrenuta prema citosolu, koji je u direktnoj komunikaciji sa unutrašnjošću jezgre. Do sredine 1980.-ih je bila prihvaćena dogma da se glikokonjugati, kao što su glikoproteini i glikolipidi, nalaze isključivo na vanjskoj površini stanice, na unutarnjim (luminalnim) površinama unutarstaničnih organela i na sekretornim molekulama. Kao što je spomenuto ranije, ta dogma je bila u skladu s tada poznatim biosintetskim putevima glikozilacije, koji su se odvijali upravo u lumenu ER-Golgi puta. Posljedično, usprkos nekim suprotnim naznakama, smatralo se da citosol i jezgra nemaju nikakvu glikozilacijsku sposobnost. Danas je jasno da se neki tipovi glikokonjugata sintetiziraju u citosolu i jezgri, te da i ostaju tamo. Jedan značajan primjer takvog tipa glikozilacije je O-vezani GlcNAc, koji bi mogao zapravo biti brojčano najuobičajeniji tip glikozilacije u mnogim vrstama stanica. Činjenica da je ovako značajan tip glikozilacije bio previđen od strane većine istraživača toliko dugo vremena je ujedno pokazatelj relativne neistraženosti procesa glikozilacije (Varki i sur., 2009).

1.4. Imunoglobulin G

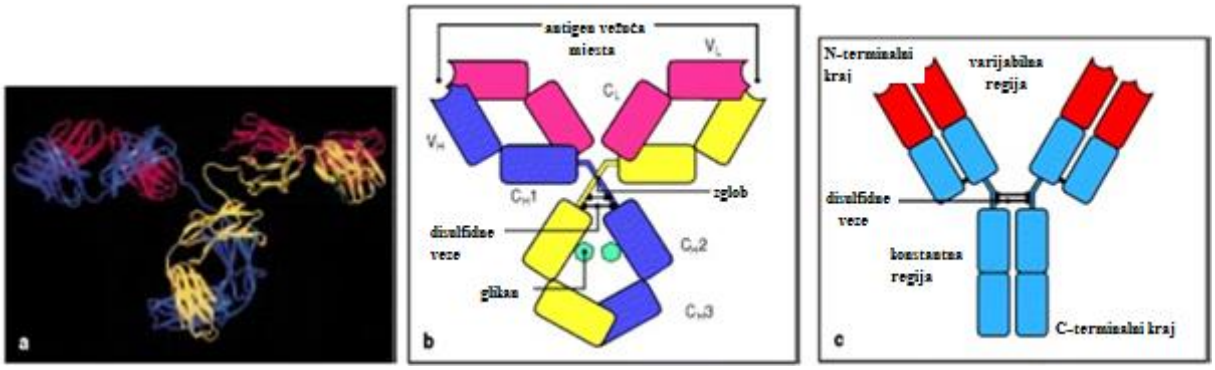
1890. godine von Behring i Kitasato primijetili su postojanje agensa u tijelu koji je mogao neutralizirati toksin difterije. Sljedeće godine, pojavio se naziv „*Antikörper*“, ili antitijela, u radu koji je opisivao sposobnost tog agensa da razlikuje dvije supstance. Posljedično, supstanca koja inducira proizvodnju antitijela se nazivala „*Antisomatogen + Immunkörperbildner*“, ili agens koji inducira antitijelo. Izraz antigen je kratica tog naziva (Schroeder i Cavacini, 2010).

Imunosni sustav sadrži dvije vrste limfocita pomoću kojih može specifično prepoznati antigen: limfocite B i limfocite T. Limfociti B stvaraju protutijela (imunoglobuline). Kada se nalaze na staničnoj površini protutijela služe kao antigenski receptori, a kada se izlučuju iz stanice obavljaju važne efektorske funkcije (Cox i Sinclair, 1997).

Protutijela imaju središnju ulogu u molekulskim mehanizmima imunosnog odgovora. Glavno i najzastupljenije protutijelo u krvnoj plazmi je imunoglobulin G (IgG). Godine 1959. Rodney Porter je pokazao da IgG može biti pocijepan na tri fragmenta od 50 kDa pomoću enzima papaina. Dva od tih fragmenata vežu antigen, te su nazvani F_{ab} (F označuje fragment; ab – eng. *antigen binding*). Treći fragment je nazvan F_c jer je pokazao sklonost kristalizaciji (eng. *crystallyzable*). Fragment F_c nema sposobnost vezanja antigena, ali ima druga važna biološka svojstva koja nazivamo efektorskim funkcijama, kao što je započinjanje kaskade komplementa (Berg i sur., 2013).

IgG se sastoji od dvije vrste polipeptidnih lanaca. Jedan od njih, veličine otprilike 50 kDa, je nazvan teški ili H (eng. *heavy)* lanac. Drugi, veličine otprilike 25 kDa, je nazvan laki ili L (eng. *light)* lanac. Svaka IgG molekula se sastoji od dva teška i dva laka lanca (Slika 2). Teški lanci su međusobno povezani disulfidnim vezama i svaki teški lanac je vezan s jednim lakim lancem disulfidnom vezom. U svakoj imunoglobulinskoj molekuli dva teška i dva laka lanca su identični. Postoje dvije vste lakih lanaca, nazvani lambda (λ) i kapa (κ). Određeni imunoglobulin ima ili κ ili λ lake lance, nikad po jedan od oba. Do sad nisu pronađene nikakve razlike u funkciji između tih lanaca, a njihovi omjeri su različiti u različitim životinjskim vrstama. Razlog za ovu varijaciju nije poznat. Teški lanac imunoglobulina određuje njegovu klasu i podklasu. IgG sadrži gama (γ) teški lanac, ali postoje i njegove podklase (IgG1, 2, 3, 4 u čovjeku) (Janeway i sur., 2001). Redoslijed aminokiselina velikog broja teških i lakih lanaca je poznat i otkriva dvije važne karakteristike molekula imunoglobulina. Prvo, svaki lanac se sastoji od nekoliko sličnih, iako ne identičnih,

ponavljajućih slijedova, svaki oko 110 aminokiselina dugačak. Svaki od tih sljedova tvori jednu odvojenu domenu proteina. Laki lanac ima dvije takve imunoglobulinske domene, dok ih teški lanac ima četiri. Druga važna karakteristika koju nam otkriva aminokiselinski slijed lanaca je velika raznolikost N-terminalnih sljedova obje vrste lanaca među imunoglobulinima iste klase. Ta varijabilnost sljedova je ograničena na otprilike prvih 110 aminokiselina, što odgovara području prve imunoglobulinske domene, dok su ostale domene konstantne u lancima iste klase. N-terminalne varijabilne ili V (eng. *variable*) domene teških i lakih lanca (V_H i V_L) zajedno tvore V regiju imunoglobulina i daju mu sposobnost vezanja ogromnog broja različitih antigena. Konstantne ili C (eng. *constant*) domene teških i lakih lanaca (C_H i C_L) tvore C regiju koja ima efektorske funkcije. Teški lanac ima više C domena i numeriraju se od N-terminalnog prema C-terminalnom kraju (C_{H1}, C_{H2}, itd.) (Janeway i sur., 2001).

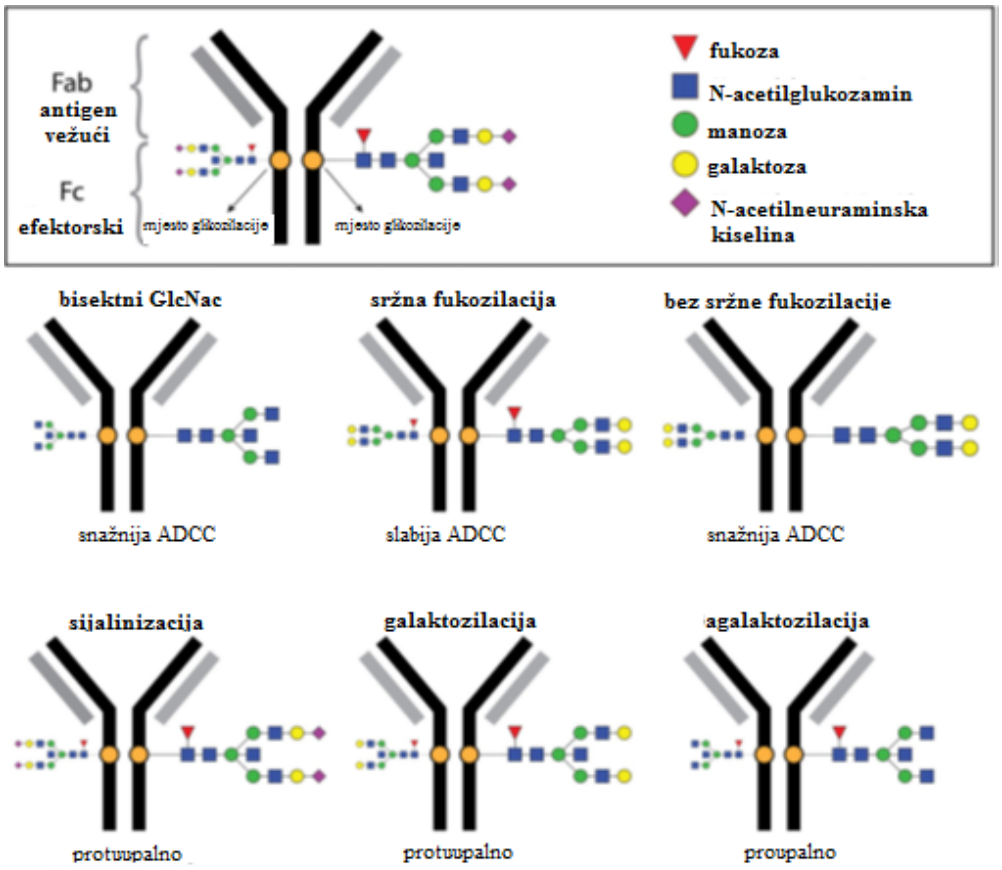


Slika 2. Struktura protutijela. Slika a prikazuje vrpčasti dijagram polipeptidne okosnice napravljen na osnovi kristalografske strukture IgG-a dobivene uz pomoć X-zraka. Tri globularne regije tvore oblik slova Y. Dva vezna mjesta za antigen su na vrhovima ruku, koje su vezane za trup slova Y fleksibilnom zglobnom regijom. Shematski prikaz strukture je na slici b, gdje se jasno vide četiri lanca i odvojene domene na svakom lancu. Slika c je pojednostavljeni shematski prikaz molekule antitijela. Preuzeto i prilagođeno iz Harris i sur., Nature 360:369-372, 1992.

Kao što je već rečeno, dok fragmenti F_{ab} prepoznaju antigen, fragment F_c ima efektorsku funkciju, što znači da on odlučuje koji je slijed akcija nakon prepoznavanja antigena. Fragment F_c mora stupiti u interakciju s $F_c\gamma$ receptorom ($F_c\gamma R$) na efektorskoj stanici imunosnog sustava da bi bio pokrenut odgovarajući slijed reakcija. Zna se da je potrebna kotranslacijska modifikacija F_c-a N-glikanom da bi ta interakcija bila moguća (Subedi i Barb, 2015). Efektorske funkcije imunoglobulina mogu biti vrlo različite, čak i potpuno suprotne, kao što su upala i supresija imunog odgovora. Pošto je aminokiselinski slijed fragmenta F_c, za razliku od fragmenta F_{ab}, nepromjenjiv, to ne može biti izvor različitih efektorskih

mogućnosti. Tu mogućnost različitih odgovora na antigene mu daju upravo N-glikani (Ahmed i sur., 2014).

Glikozilacija je od velike važnosti za pravilno funkcioniranje imunosnog sustava, a jedan od najproučavanijih glikoproteina je upravo IgG. Svaka domena C_{H2} fragmenata F_c teških lanaca nosi kovalentnu vezani bi-antenarni N-glikan na asparaginskom ostatku 297 (Novokmet i sur., 2014). Vezani oligosaharidi imaju strukturnu i funkcionalnu važnost za imunoglobulin i njegove efektorske funkcije. Nedostatak galaktoznih ostataka se povezuje s reumatoidnim artritisom. Dodatak sijalinske kiseline dramatično mijenja fiziološku ulogu IgG-a, mijenjajući ga iz proupalnog u protuupalnog posrednika. Dodatak fukoze glikanskoj srži ometa vezanje IgG-a i $F_c\gamma$RIIIa i značajno smanjuje sposobnost stanično posredovane citotoksičnosti ovisne o antitijelima (ADCC, eng. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Slika 3) (Lauc i sur., 2013). Posljedično, glikozilacija IgG-a je značajan faktor u razvoju terapeutskih monoklonskih antitijela i postoji potreba za razvojem homogeno glikoziliranih protutijela, čime bi se poboljšala njihova sigurnost i efikasnost (Lin i sur., 2015).



Slika 3. Različita svojstva IgG-a pri različitoj glikozilaciji. Preuzeto i prilagođeno iz Lauc i sur., 2016.

1.5. Reumatoidni artritis

Pokretni zglobovi (sinovijalni zglobovi ili „pravi zglobovi“) su najuobičajeniji zglobovi u ljudskom tijelu. Oni omogućuju pokrete između dvije susjedne koštane površine uz malo trenje i veliku otpornost trošenju. Normalni pokretni zglobovi sadrže šupljinu ispunjenu sinovijalnom tekućinom koju izlučuje sinovijalna membrana. Sinovijalna tekućina je viskozna tekućina koja ima podmazujuću i metaboličku funkciju unutar zgloba. Sadrži podmazujuće molekule, kao što su hijaluronan i proteoglikan-4, koje su izvor njene viskoznosti. Održavanje normalnog sastava sinovijalne tekućine je nužno za homeostazu zgloba (Hui i sur., 2012).

Reumatoidni artritis (RA), koji zahvaća otprilike 1% populacije, predstavlja autoimunosni napad primarno usmjeren na sinovijalne membrane pokretnih zglobova (Cox i Sinclair, 2000). Trajni sinovitis uzrokuje uništenje zglobne hrskavice, eroziju okolnih kostiju i periartikularnu dekalcifikaciju, što nakon nekog vremena rezultira smanjenom funkcijom zglobova. Osim što RA dugoročno vodi prema invaliditetu i sistemskim komplikacijama, najprimjetnija posljedica je teško kontrolirana bol, što značajno smanjuje kvalitetu života zahvaćenih pacijenata (Meier i sur., 2013). Uz to, pacijenti s RA su podložniji morbiditetu i mortalitetu povezanim s infektivnim bolestima, te su u dvostruko većoj opasnosti od teške infekcije u usporedbi s općom populacijom. Taj povećani rizik nije rezultat isključivo same autoimunosne bolesti, već i imunosupresivne terapije koju najčešće koriste ovi pacijenti (Perry i sur., 2014).

Uz današnju standardnu prvu liniju terapije RA koja se sastoji od različitih DMARD (eng. *disease-modifying antirheumatic drugs*) poput metotreksata (zlatni standard), glukokortikoida, leflunomida, sulfasalazina, hidroksiklorokina i soli zlata, sve više se koriste biološki lijekovi različitih mehanizama djelovanja, pri čemu često monoterapija nije dovoljna, već je za postizanje remisije potrebna kombinacija lijekova (Meier i sur., 2013). Trenutno najveća prepreka korištenju bioloških lijekova je njihova vrlo visoka cijena. Jedan mjesec terapije biološkim lijekom je značajno skuplji od godišnje zalihe metotreksata. Iako su trenutno vrlo rijetki na tržištu, biosimilari predstavljaju mogući most preko ove cjenovne prepreke, i sve se više napora ulaže u njihov razvoj (Gulacsi i sur., 2015).

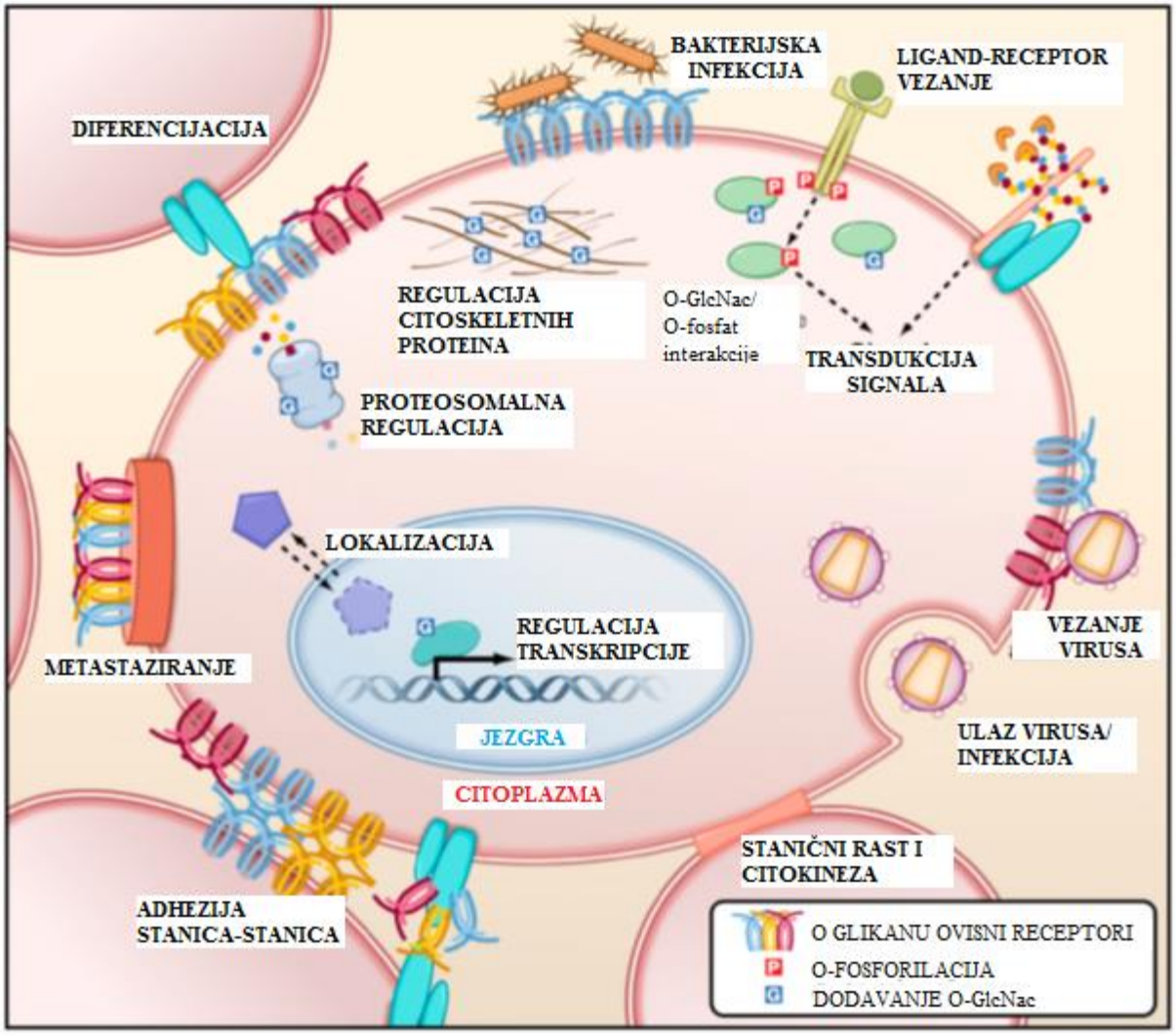
Uz dosad spomenute DMARD i biološke lijekove, novi terapijski potencijal pokazuju mezenhimalne matične stanice (MSC, eng. *mesenchymal stem cells*). Gotovo svaki dio zglobne strukture, uključujući okolne kosti, masno tkivo zgloba, zglobnu hrskavicu i

sinovijalnu membranu, sadrži rezidentne MSC koje mogu diferencirati u osteoblaste, hondroblaste, adipocite, pa čak i mioblaste. MSC porijeklom iz sinovijalne membrane pokazuju najveći potencijal hondrogeneze, što ih čini potencijalnim alatom za popravljanje uništene hrskavice. Daljnje istraživanje tih mehanizama izgleda kao obećavajući put prema nalaženju terapije za degeneraciju hrskavice (de Sousa i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikozilacija je najzastupljeniji i najraznolikiji oblik posttranslacijske modifikacije. Svi stanični proteini s odgovarajućim slijedom aminokiselina (Asn-X-Ser/Thr) potencijalno mogu biti N-glikozilirani dok putuju kroz ER i Golgijev aparat. Glikani su direktno uključeni u gotovo svaki biološki proces, te imaju važnu ulogu u velikom broju bolesti (Slika 5), poput urođenih poremećaja glikozilacije, tumora, reumatoidnog artritisa, AIDS-a (Menni i sur., 2013), boli u donjem dijelu leđa ili lumbaga (Freidin i sur., 2016), i upalnih bolesti crijeva (ulcerozni kolitis i Crohnova bolest) (Trbojević Akmačić i sur., 2015b). Od kritične važnosti su za imunosni sustav, neke od najvažnijih interakcija između imunosnog sustava i bakterija i virusa su ovisne o glikanima. Glikani su ključni u raspoznavanju „svojeg“ od „tuđeg“, te promijenjeni glikom može voditi u autoimune bolesti. Uz to, glikani imaju i veliku potencijalnu dijagnostičku vrijednost u medicini. Klinički markeri za rak su često glikoproteini, ali većina današnjih dijagnostičkih testova mjeri ekspresiju polipeptida, zanemarujući glikanski dio. Uzimajući u obzir poznate promjene glikana povezane s rakom, vrlo je vjerojatno da bi testovi koji detektiraju specifične glikoforme bili osjetljiviji i specifičniji, te bolji u ranoj detekciji raka.(Hart i Copeland, 2010).

Svrha ovog rada je razvoj metode za analizu N-glikana IgG-a iz sinovijalne tekućine kao važnog biološkog uzorka u proučavanju reumatoidnog artritisa. IgG je izoliran iz sinovijalne tekućine imunoprecipitacijom uz korištenje protein G zrna, te su optimirani uvjeti pročišćavanja. Razvijena metoda će biti korištena u daljnjem istraživanju povezanosti reumatoidnog artritisa i N-glikana IgG-a, poželjno u obliku koji omogućuje visokoprotočnu analizu velikog broja uzoraka.



Slika 5. Glikani u staničnoj biologiji. Kompleksni glikani na staničnoj površini su mete bakterija i virusa, reguliraju staničnu adheziju i razvoj, utječu na metastaziranje stanica raka, i reguliraju ogroman broj interakcija receptor:ligand. Glikani u sekretornom putu reguliraju „kvalitetu“ proteina i transport molekula. O-GlcNAc vezan u jezgri u kombinaciji s fosforilacijom regulira signalizaciju, funkciju citoskeleta i ekspresiju gena u odgovoru na nutrijente i stres. Preuzeto i prilagođeno iz Hart i Copeland, 2010.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

OPIS	PROIZVOĐAČ
Acetonitril, LCMS Chromasolv ≥99,9 % čistoće	Fluka
Acetonitril, HPLC čistoće	Panreac
2-aminobenzamid (2-AB)	Sigma-Aldrich
Amonijak (25 % otopina)	Merck
Amonijev hidrogenkarbonat (AB)	Acros Organics
Boja za proteinske gelove GelCode Blue Safe Protein Stain	Thermo Fisher
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etanol	Carlo Erba
Formijatna kiselina (FA)	Merck Millipore
Glicerol	Acros Organics
Hijaluronidaza	Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Kalijev dihidrogenfosfat	Sigma-Aldrich
Kalijev klorid	EMD Millipore
Kloridna kiselina (HCl)	Kemika
Marker molekulskih masa Precision Plus Protein Standards All Blue (M)	Bio-Rad
β-merkaptoetanol	Acros Organics
Natrijev bromfenol plavo	Acros Organics
Natrijevdodecil sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natrijev hidrogenfosfat	Acros Organics
Natrijev klorid	Carlo Erba
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Mini gel za elektroforezu	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE MES SDS pufer za elektroforezu	Thermo Fisher Scientific

Octena kiselina (HAc)	Merck
2-pikolin boran	Sigma-Aldrich
PNGaza F, 10 U/μL	Promega
Protein G agaroza	Merck
Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	Acros Organics

3.1.2. Otopine

OTOPINA	**PRIPRAVA**
70% etanol	Razrjeđivanjem apsolutnog etanola, svježe pripremljen prije upotrebe
20 % ACN	Razrjeđivanjem 100 % ACN-a
96% ACN	Razrjeđivanjem 100% ACN-a, svježe pripremljen i ohlađen 2 sata na 4 °C
100 mM amonijev formijat, pH 4,4	Razrjeđivanjem koncentrirane 2 M otopine amonijevog formijata, pH 4,4
1,33 % SDS (w/V)	Za 100 mL otopine uz miješanje je otopljeno 1,33 g SDS-a u otprilike 90 mL vode te nakon otapanja nadopunjeno vodom do 100 mL
4 % Igepal CA-630 (v/V)	Za 100 mL otopine uz miješanje je otopljeno 4 mL Igepal-a u otprilike 90 mL vode zagrijane na 40 °C te nakon otapanja nadopunjeno vodom do 100 mL
10x PBS	Za 1000 mL otopine izvagano je 80,028 g NaCl, 13,832 g Na_2HPO_4, 2,964 g KH_2PO_4, 1,976 g KCl te otopljeno u vodi i nadopunjeno do 1000 mL
5x PBS	Razrjeđivanjem 10x PBS
1x PBS pH 7,4	Razrjeđivanjem 10x PBS, titrirano s 1 M otopinom NaOH do pH 7,4.
0,1 M formijatna kiselina	Razrjeđivanjem koncentrirane formijatne kiseline

1 M amonijev hidrogenkarbonat	Za 100 mL otopine uz miješanje je otopljeno 7,9 g amonijevog hidrogenkarbonata u 100 mL vode.
3x pufer za nanošenje uzorka za elektroforezu	Za 100 mL pufera potrebno je u 70 mL vode dodati 0,76 g Tris, 2,3 g SDS, 10 mL glicerola. Otopina je titrirana s HCl do pH 6,8 te je dodano 50 mg bromfenol plavo. Otopina je nadopunjena do 100 mL s vodom i čuvana na 4 °C
3x pufer za nanošenje uzorka za elektroforezu s β-merkaptoetanolom	Na 1 mL 3x pufera za nanošenje uzorka za elektroforezu potrebno je dodati 50 µl β-merkaptoetanola
Otopina hijaluronidaze	5 mg (2000 U) je otopljeno u 5 mL 1x PBS pH 7,4, vorteksirano ipodijeljeno u 20 alikvota (250 µL svaki, c=1mg/mL). Spremljeno na -20 °C

3.1.3. Uzorci

Nekoliko različitih uzoraka je korišteno u procesu optimiranja ove metode. Kombinirani (eng. *pool*) uzorci plazme su korišteni za razvoj i optimizaciju metode pri ocjenjivanju primjerenosti korištenih pufera i uspješnosti koraka ispiranja. Kombinirani uzorci sinovijalne tekućine su korišteni za daljnje korake razvijanja metode.

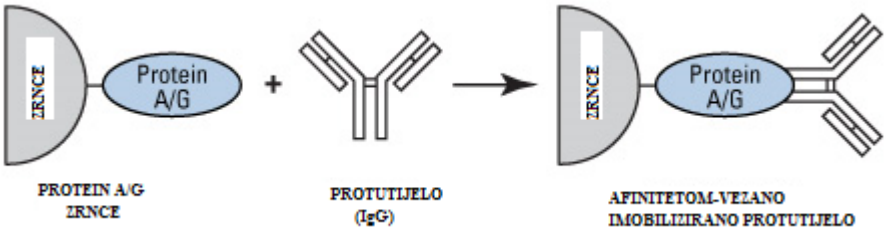
3.2. Metode

Za izolaciju IgG-a korištena je metoda imunoprecipitacije uz protein G agarozu (Poglavlje 3.2.1.). Sakupljane su sve eluirane frakcije, te je u njima spektrofotometrijski izmjerena koncentracija proteina na 280 nm na uređaju NanoDrop 8000 proizvođača Thermo Fisher Scientific. Od svake frakcije su uzeti određeni alikvoti za SDS-PAGE kojom je ispitivana uspješnost pročišćavanja IgG-a (Poglavlje 3.2.2.). Uzorci su nakon toga deglikozilirani i fluorescentno obilježeni (Poglavlje 3.2.3.). Analiza glikanskog profila IgG-a provedena je korištenjem metode UPLC (Poglavlje 3.2.4.).

3.2.1. Pročišćavanje IgG-a imunoprecipitacijom

Imunoprecipitacija koristi specifičnost antitijela za izolaciju ciljanog proteina (antigena) iz kompleksnog uzorka. U klasičnoj metodi uzorak se inkubira sa specifičnim antitijelom, te nastaje kompleks antigen-antitijelo. Taj kompleks se potom veže (najčešće) na protein G ili protein A zrna preko regije F_c specifičnog antitijela. Zrna i uzorak se centrifugiraju da bi se istaložili, supernatant odbaci i zrna se ponovo isperu i centrifugiraju kako bi uklonili nevezane proteine iz uzorka. Zrna se zatim izlažu denaturirajućim ili kiselim uvjetima kako bi kompleks disocirao (Kaboord i Perr, 2008).

U ovom radu cilj je bio izolirati IgG, tako da nisu bila potrebna specifična antitijela koja bi ga prvo vezala, već se direktno vezao na protein G zrna (Slika 4). Protein G je prvi put izoliran iz streptokoka (vrsta G148) kao komponenta bakterijskog staničnog zida. Ispostavilo se da veže sve humane IgG podklase, kao i zečji, mišji i kozji IgG. Dio IgG molekule koji je većinski odgovoran za vezanje s proteinom G je fragment F_c, iako postoje i slabe interakcije s fragmentima F_{ab} (Bjorck i Kronvall, 1984).



Slika 4. Princip imunoprecipitacije. Preuzeto i prilagođeno s www.thermofisher.com

Agarozna zrna proteina G koncentracije 2 mg/mL suspendirana u 50% otopini (20 % etanola u destiliranoj vodi) su korištena za izolaciju IgG-a. Prema specifikacijama proizvođača kapacitet vezanja zrna je 20 mg humanog IgG-a/mL agaroze. Čuvaju se na 4 °C.

3.2.1.1. Protokol

a. Uzorci plazme ili sinovijalne tekućine (100 µL) su pipetirani u tubice i razrijeđeni 8 puta s PBS-om (dodano je 700 µL PBS-a).

b. 65 µL suspenzije (32,5 µL agaroze) protein G zrna je pipetirano koristeći nastavak sa skraćenim vrhom u odabrane odjeljke čiste 0,45 µm GHP filter pločice dok se protein G miješao na miješalici.

c. Zrna su oprana s 4 x 100 µL PBS pufera uz korištenje uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma.

d. GHP filter ploča koja sadrži zrna je stavljena na pločicu za skupljanje.

e. Uzorci su premješteni na zrna i miješani 5 min na miješalici.

f. Nespecifično vezani proteini su uklonjeni filtriranjem uz vakuum.

g. Zrna su oprana s 4 x 100 µL PBS pufera uz korištenje uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma. Zadnja frakcija je prikupljena (W4).

h. U čistu 1 mL pločicu za skupljanje dodan je neutralizacijski pufer (za 100 µL FA eluata potrebno 17 µL AB).

i. GHP filter pločica je stavljena na pločicu za skupljanje s neutralizacijskim puferom, te je IgG eluiran u 2 frakcije dodavanjem 2 x 100 µL FA.

j. Uzorci su miješani na miješalici 5 min u svakom eluacijskom koraku, te onda eluirani koristeći uređaj za filtriranje uz pomoć vakuuma.

k. Eluirane frakcije su skupljene i neutralizirane odvojeno, svaka u svoju pločicu za skupljanje s dodanim neutralizacijskim puferom (ukupno 117 µL svaka), te posušene u vakuum centrifugi (umanjeno za količine alikvota potrebnih za SDS-PAGE) i spremljene privremeno na 4 °C ili na -20 °C u slučaju kad deglikozilacija nije rađena isti dan.

3.2.1.2. Optimiranje protokola

Optimirani koraci su dopisivani redoslijedom kojim su se dodavali pri izvođenju eksperimenata.

a) U koraku **g** su dodana još dva koraka ispiranja, tako da su zrna oprana s 6 x 100 µL PBS pufera uz korištenje uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma. Zadnja frakcija je prikupljena (W6).

b) U koraku **i** je dodan još jedan eluacijski korak, tako da je IgG eluiran u 3 frakcije dodavanjem 3 x 100 µL FA.

c) Nakon koraka **a** su dodana dva koraka filtriranja uzoraka, prvo kroz Pall AcroPrep 1 mL 0,45 µm GHP filter pločicu, i potom kroz Pall AcroPrep 1 mL 0,2 µm GHP filter pločicu.

d) U koraku **a** je u uzorke sinovijalne tekućine, umjesto 700 µL PBS-a, dodano 675 µL PBS-a i 25 µL 1 mg/mL otopine hijaluronidaze, te su uzorci inkubirani u termomikseru 30 min/37 °C.

e) U svim koracima je „obični“ PBS zamijenjen PBS-om s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M).

3.2.2. SDS-PAGE

Elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) pri denaturirajućim uvjetima proteini se odjeljuju uglavnom na osnovi mase. Smjesa proteina se prvo otapa u otopini natrijeva dodecil-sulfata (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), anionskog detergenta koji razara gotovo sve nekovalentne interakcije u nativnom proteinu. Dodaju se i merkaptoetanol (2-tioetanol) ili ditiotreitol da bi se reducirale disulfidne veze. Anioni SDS-a se vežu na protein u konstantnom omjeru od oko jednog aniona SDS na svaka dva aminokiselinska ostatka. Ovaj kompleks ima veliki negativni naboj, puno veći od prirodnog naboja proteina koji postaje zanemariv, te je otprilike proporcionalan masi proteina. Nakon završene elektroforeze proteini u gelu se vizualiziraju bojenjem bojama poput Coomassie-plavo ili srebrom, dajući niz vrpci. Mali proteini se kreću brže kroz gel nego veliki proteini. Pokretljivost većine proteina pod ovim je uvjetima linearno razmjerna logaritmu njihove mase. Mogu se razlikovati vrpce proteina čija se masa razlikuje za oko 2% (npr. 50 i 51 kDa, što je posljedica razlike od oko 10 aminokiselina). Ovom metodom se može ispitivati učinkovitost provedenog postupka pročišćavanja. Kako pročišćavanje napreduje, broj vrpci se smanjuje, a pojavnost jedne vrpce se povećava (Berg i sur., 2013).

3.2.2.1. Gel i uzorci

Za SDS-PAGE korišten je NuPAGE Bis-Tris Mini gel, 4-12% koncentracijski gradijent poliakrilamida, s 12 jažica, 1,0 mm debljine, komercijalno dostupan pripravljeni gel, uz uređaj za provođenje elektroforeze XCell SureLock Mini cell system, koji je preporučen od strane proizvođača za korištenje gela. XCell SureLock Mini cell system može provoditi elektroforezu na dva gela istovremeno. Prije stavljanja u uređaj gelovi su isprani destiliranom vodom, a nakon uklanjanja češljića jažice su dodatno isprane puferom za elektroforezu prema uputi proizvođača. Nakon umetanja gelova, u komoricu za elektroforezu je dodan NuPAGE MES SDS Running buffer, pufer za elektroforezu, te su istim puferom jažice gela dodatno isprane neposredno prije nanošenja uzoraka kako bi se uklonio glicerol iz jažica.

Od svake eluirane frakcije (E1-E3) uzeto je 10 μL za SDS-PAGE. Cijela količina frakcije W6 (100 μL) je uzeta i posušena u vakuum centrifugi za SDS-PAGE i resuspendirana u 10 μL

MQ H_2O. Dodatno, uzeto je 10 µL interno pripravljenog IgG standarda koncentracije 0,66 mg/mL i 10 µL 1mg/mL hijaluronidaze u PBS-u. Svim uzorcima je dodano 5 µL interno pripravljenog 3x pufera za nanošenje uzorka s β-merkaptoetanolom. Svi uzorci su inkubirani 5 minuta na 95 °C i u cijelosti (15 µL) naneseni pipetom u jažice. Dodan je i komercijalno dostupan standard smjese proteina poznatih molekulskih masa Precision Plus Protein Standards All Blue u količini od 5 µL.

3.2.2.2. Provođenje SDS-PAGE

Nakon spajanja aparature i nanošenja uzoraka provedena je elektroforeza na 200 V u trajanju od 35 minuta.

Po završetku elektroforeze gelovi su odvojeni od plastičnog okvira i isprani 3 puta po 5 minuta uz miješanje u 150-200 mL MQ H_2O. Nakon toga je dodana GelCode Blue Safe Protein Stain boja i gelovi su bojani uz miješanje 1 sat. Na kraju su gelovi isprani u maloj količini MQ H_2O i uz miješanje odbojani preko noći u MQ H_2O.

3.2.3. N-deglikozilacija IgG-a i obilježavanje glikana

Suhi uzorci IgG-a pročišćeni imunoprecipitacijom uz protein G se deglikoziliraju komercijalno dostupnim enzimom PNGaza F. Oslobođeni glikani se obilježavaju fluorescentnom bojom i pročišćavaju od suviška reagensa prije analize na UPLC-u.

3.2.3.1. Priprema uzoraka i potrebnih kemikalija

1,33% SDS, 4% Igepal i 5x PBS su stavljeni na sobnu temperaturu 30 minuta prije upotrebe.

Pločica za skupljanje s posušenim uzorcima je izvađena iz hladnjaka na sobnu temperaturu 30 minuta prije upotrebe.

3.2.3.2. Denaturacija proteina

U svaki uzorak je dodano 30 µL 1,33% SDS-a, te su promiješani pipetom.

Uzorci su zaštićeni prozirnom ljepljivom folijom i stavljeni na inkubaciju na 65 °C/10 min, te ohlađeni na sobnoj temperaturi 30 minuta.

Potom je u svaki uzorak dodano 10 µL 4% Igepal-a koji inaktivira denaturirajući SDS, promiješani su pipetom i ostavljeni 15 minuta na miješalici pokriveni folijom.

3.2.3.3. N-deglikozilacija proteina

Otopina enzima je pripravljena miješanjem 0,12 µL PNGaze F i 10 µL 5 x PBS po uzorku. Svakom uzorku je dodano 10 µL otopine enzima i promiješani su pipetom. Uzorci su zaštićeni prozirnom ljepljivom folijom i inkubirani na 37 °C 18 sati.

3.2.3.4. Priprema 2-AB otopine za obilježavanje glikana

Otopina za obilježavanje glikana sadrži 25 µL 30% HAc u DMSO, 0,48 mg 2-AB i 1,12 mg PB po uzorku.

Nakon priprave 30% HAc u DMSO dodani su 2-AB i PB uz miješanje pipetom, te je pripravljena smjesa dodatno promiješana na vortexu do potpunog otapanja.

3.2.3.5. Obilježavanje glikana 2-AB-om

Svakom uzorku je dodano 25 µL otopine za obilježavanje glikana i promiješani su pipetom. Uzorci su zaštićeni prozirnom ljepljivom folijom i miješani na miješalici 10 minuta, te potom inkubirani na 65 °C 2 sata. Po završetku inkubacije pločica s uzorcima je ostavljena na miješalici na sobnoj temperaturi 30 minuta.

3.2.3.6. Priprema 1 mL AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločice

96% ACN i 70% etanol su svježe pripravljeni. Acetonitril je ohlađen na 4 °C 2 sata.

U svaki odjeljak (koji će se koristiti) filter pločice je dodano 200 µL 70% etanola i vakuumirano u otpad. Nakon toga odjeljci filter pločice su na isti način isprani s 200 µL MQ H_2O i 200 µL hladnog 96% ACN.

3.2.3.7. Nanošenje i pročišćavanje 2-AB obilježenih uzoraka na pripremljenu filter pločicu

Svakom uzorku je dodano 700 µL hladnog (na 4 °C ohlađenog) 100% ACN-a, lagano su promiješani pipetom i preneseni na pripremljenu filter pločicu. Uzorci su ostavljeni 2 minute na sobnoj temperaturi i vakuumirani u otpad.

U svaki uzorak je dodano 200 µL hladnog 96% ACN i vakuumirano u otpad. Postupak je ponovljen ukupno 3 puta.

Filter pločica s uzorcima je stavljena na 1 mL stalak za pločicu, u svaki uzorak je dodano 200 µL hladnog 96% ACN, te je potom pločica centrifugirana u centrifugi 5 minuta na 164 *g* (Eppendorf centrifuga, model 5804, rotor A-2-DWP).

3.2.3.8. Eluiranje 2-AB obilježenih glikana

Filter pločica s uzorcima je stavljena na čistu ABgene PCR pločicu.

Svakom uzorku je dodano 90 µL MQ H_2O, te je pločica stavljena na miješalicu 15 minuta. Potom je pločica centrifugirana u centrifugi 5 minuta na 164 *g* da bi sakupili prvu frakciju eluata u PCR pločicu. Postupak je još jednom ponovljen (ukupni sakupljeni volumen je 180 µL)

PCR pločica je zatvorena PCR kapicama i spremljena na -20°C do analize UPLC-om.

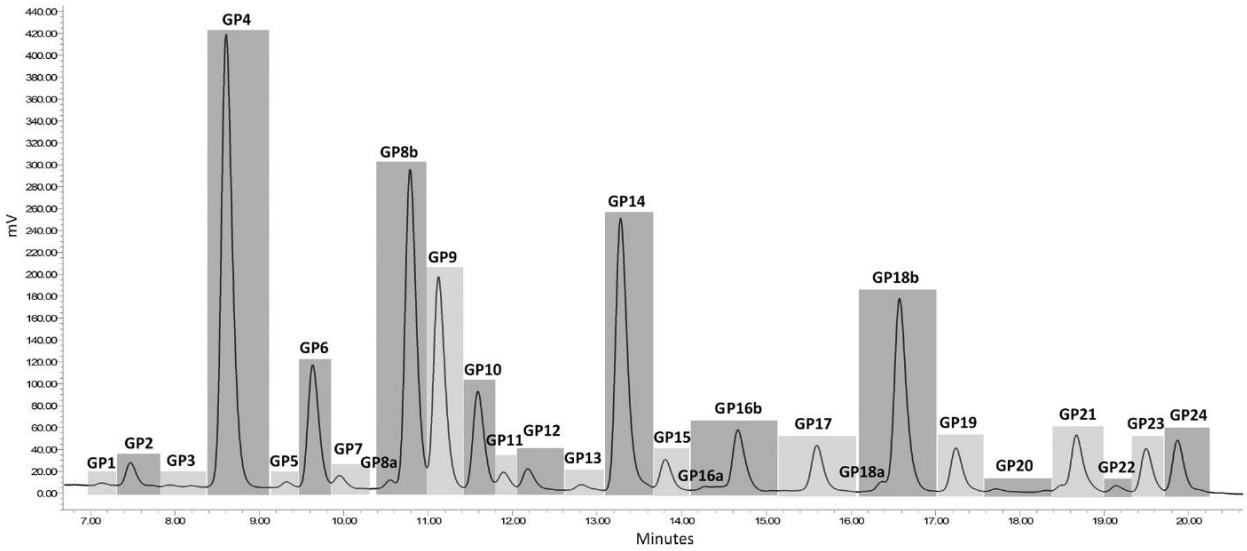
3.2.4. UPLC analiza N-glikana

Trenutno postoji nekoliko pristupa visokoprotočnoj analizi N-glikana: tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (UPLC, eng. *ultra-performance liquid chromatography*), tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS, eng. *liquid chromatography mass spectrometry*), kapilarna gel elektroforeza (CGE, eng. *capillary gel electrophoresis*) i matriksom potpomognuta laserska desorpcija spregnuta sa spektrometrijom masa (MALDI-MS, eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*). Najčešće se koristi UPLC zbog relativno niske cijene opreme, vrlo dobre, pouzdane i robustne kvantifikacije i mogućnosti odvajanja glikanskih izomera. Standardna procedura za UPLC analizu uključuje deglikozilaciju proteina, označavanje slobodnih glikana fluorescentnom bojom, čišćenje uzorka od viška reagensa i fluorescentnu detekciju označenih i pročišćenih glikana (Trbojević Akmačić i sur., 2015a).

UPLC analiza obilježenih glikana koja se temelji na hidrofilnim interakcijama napravljena je na uređaju Waters Acquity UPLC H-class. Signal se detektirao uz pomoć fluorescencijskog detektora na valnim duljinama 250 nm za pobudu i 428 nm za emisiju. Uzorci su pripremljeni u 80% ACN-u i razdvojeni na koloni ACQUITY UPLC® BEH Glycan s BEH (eng. *bridgedethylene hybrid*) česticama veličine 1,7 µm te dimenzijama kolone 2,1 x 100 mm. Korištena su dva otapala: otapalo A je bio 100 mM amonijev formijat, pH 4,4, a otapalo B 100% ACN (LC-MS čistoće). Omjer otapala A/B na početku analize je bio 25/75, gradijentno je mijenjan do 38/62 kroz 25 minuta, te u 26. minuti promijenjen na 100/0.Kolona je ispirana u tim uvjetima 10 minuta, nakon čega je sustav uravnotežen na početne uvjete (omjer otapala A/B 25/75) prije analize sljedećeg uzorka. Ukupno vrijeme analize po uzorku je bilo 36 minuta, a volumen injekcije 40 µL. Protok kolone je bio 0,400 mL/min, temperatura kolone 60 °C, a temperatura uzoraka prije injektiranja 10 °C.

Uzorci su kalibrirani koristeći vanjski standard koji se sastoji od hidroliziranih i 2-AB obilježenih oligomera glukoze, pomoću kojeg su vremena zadržavanja pojedinačnih kromatografskih pikova glikana prevedena u jedinice glukoze. Dodatno su propuštani i uzorci MQ H_2O (*blank*) te interni standard 2-AB obilježenih IgG glikana.

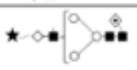
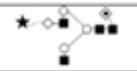
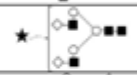
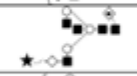
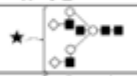
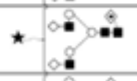
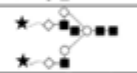
Svaki kromatogram IgG-a je razdvojen na 24 kromatografska pika (Slika 6, Tablica 1). Udio površine svakog kromatografskog pika je izražen kao postotak ukupne površine svih pikova koji odgovaraju glikanskim strukturama (Pučić i sur., 2011).



Slika 6. Kromatogram IgG glikoma. Kromatogram je podijeljen na 24 kromatografska pika. Preuzeto iz: Pučić i sur., 2011

Tablica 1. Sastav IgG glikoma. Strukture glikana u svakom kromatografskom piku i prosječni postotak pojedinih struktura (%) su određeni masenom spektrometrijom. Kratice u opisivanju strukture: svi N-glikani imaju sržni dio koji se sastoji od dva GlcNAc i tri manoze; F predstavlja sržnu fukozu α1-6 vezanu na unutarnji GlcNAc; Mx broj (x) manoza na sržnim GlcNAc; Ax broj antena (GlcNAc) na srži od tri manoze; A2 biantenarni glikan s oba GlcNAc β1-2 vezana; B GlcNAc β1-4 vezan na β1-3 manozu; Gx broj β1-4 vezanih galaktoza (G) na antene; [3]G1 i [6]G1 predstavljaju galaktozu na anteni α1-3 ili α1-6 manoze; Sx broj sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu. Strukture su slikovito prikazane kao GlcNAc (kvadrat), manoza (krug), fukoza (romb s točkom), galaktoza (romb) i sijalinska kiselina (zvijezda). Preuzeto iz Pučić i sur., 2011

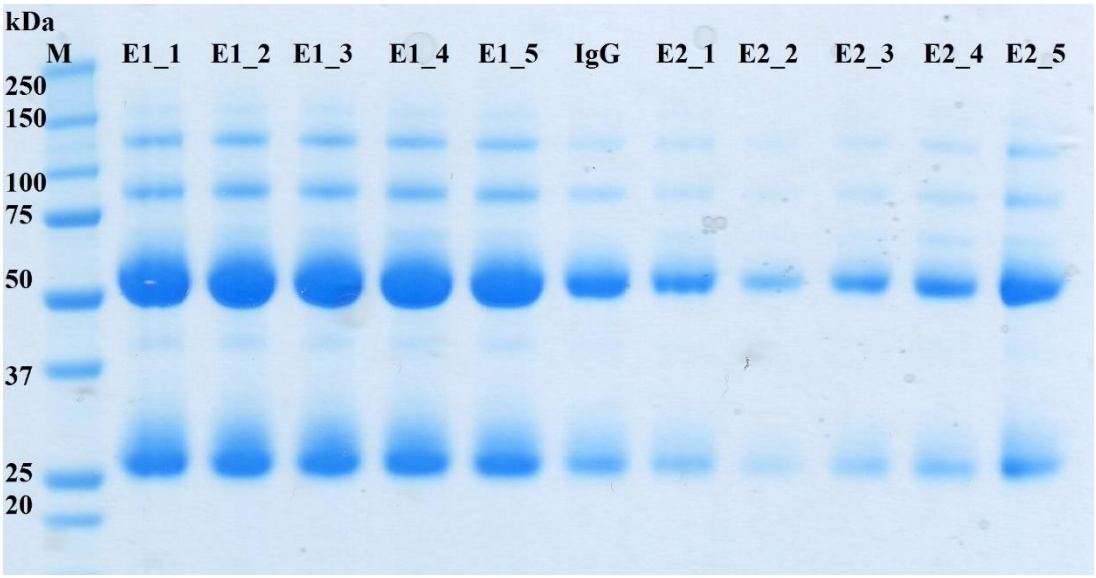
GLIKANSKI PIK	KOMPOZICIJA PIKA	STRUKTURA	%
GP1	F(6)A1		100
GP2	A2		100
GP3	A2B		100
GP4	F(6)A2		100
GP5	M5		63
	F(6)A2		37
GP6	F(6)A2B		97
	A2[6]G1		3
GP7	A2[3]G1		75
	F(6)A2B		25
GP8a	A2BG1		93
	F(6)A2[6]G1		7
GP8b	F(6)A2[6]G1		100
GP9	F(6)A2[3]G1		100
GP10	F(6)A2[6]BG1		100
GP11	F(6)A2[3]BG1		100
GP12	A2G2		91
	F(6)A2[3]BG1		9
GP13	A2BG2		87
	F(6)A2G2		13
GP14	F(6)A2G2		100

GLIKANSKI PIK	KOMPOZICIJA PIKA	STRUKTURA	%
GP15	F(6)A2BG2		83
	F(6)A1G1S1		8
	A2G1S1		5
	F(6)A2G2		4
GP16a	F(6)A2[6]G1S1		63
	M4A1G1S1		25
	A2BG1S1		13
GP16b	F(6)A2[3]G1S1		91
	F(6)A2[6]BG1S1		9
GP17	A2G2S1		89
	F(6)A2[3]BG1S1		11
GP18a	A2BG2S1		91
	F(6)A2G2S1		9
GP18b	F(6)A2G2S1		100
GP19	F(6)A2BG2S1		100
GP20	n.d.		/
GP21	A2G2S2		100
GP22	A2BG2S2		100
GP23	F(6)A2G2S2		100
GP24	F(6)A2BG2S2		100

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prvi eksperiment izolacije IgG-a pomoću protein G zrna je proveden s kombiniranim uzorcima plazme (50 μL) da bi procijenili primjerenost korištenih pufera i uspješnost pročišćavanja uzoraka. Izolacija IgG-a iz plazme pomoću protein G zrna je poznata procedura i u ovom slučaju služi kao početna pozitivna kontrola. Za pročišćavanje IgG-a iz uzoraka korištena je metoda imunoprecipitacije uz protein G zrna prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1., te su prikupljene W4 frakcije i frakcije E1 i E2 iz dva eluacijska koraka. Nakon pročišćavanja uzoraka provedena je SDS-PAGE (prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.) svake frakcije kako bi provjerili učinkovitost ispiranja od nespecifično vezanih proteina, te eventualnu prisutnost onečišćenja u pročišćenom uzorku. Pročišćeni uzorak bi u reducirajućim uvjetima trebao imati dvije vidljive vrpce nakon provedenog pročišćavanja, jednu koja predstavlja teški lanac (oko 50 kDa) i jednu koja predstavlja laki lanac IgG-a (oko 25 kDa). SDS-PAGE u kombinaciji sa spektrofotometrijskim podatcima o koncentraciji proteina s NanoDropa je služio za procjenu uspješnosti prošlog koraka.

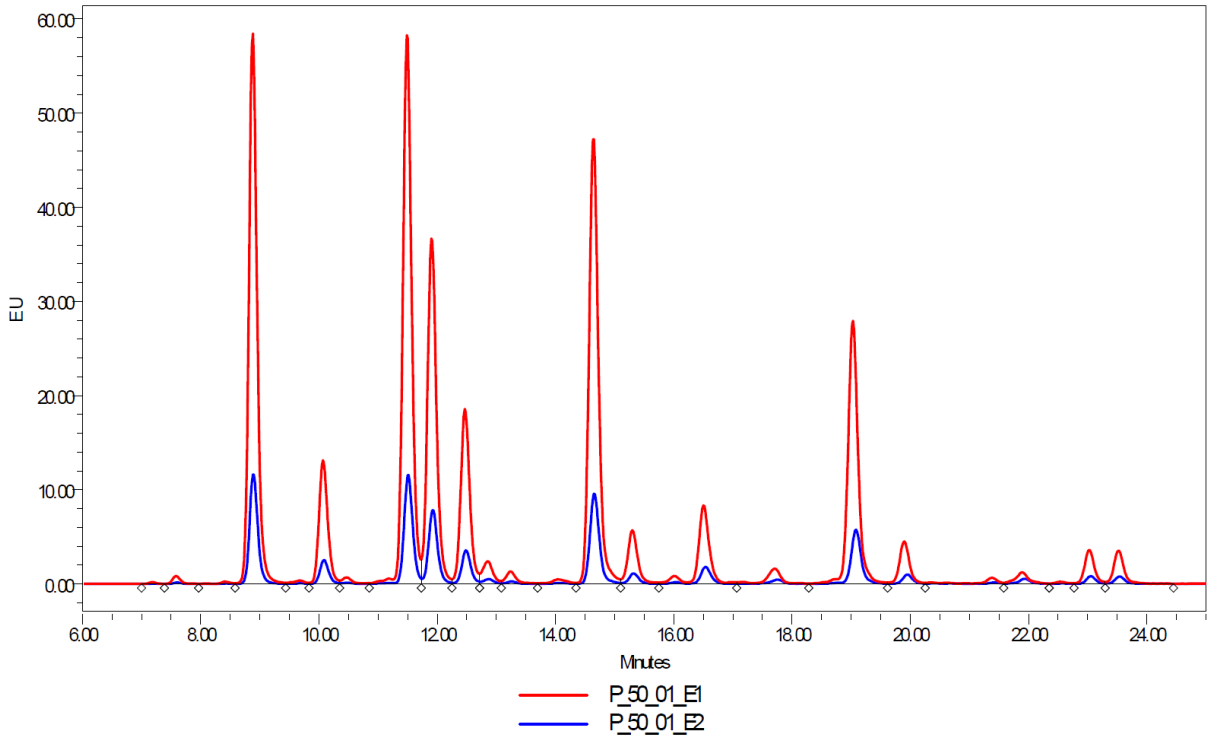
Izmjerena je koncentracija proteina od prosječno 1,284 g/L u prvom eluatu, 0,379 g/L u drugom eluatu, te 0,053 g/L u frakciji W4, što upućuje da se značajna količina proteina eluira i u drugom koraku, te da potencijalno zaostaje nešto nespecifično vezanih proteina. Gel dobiven nakon provedene SDS-PAGE je vidljiv na slici 7. Na gelu su jasno vidljive vrpce na



Slika 7. SDS-PAGE frakcija prikupljenih prilikom pročišćavanja IgG-a imunoprecipitacijom uz protein G zrna iz kombiniranih uzoraka plazme. M – proteinski marker, **E1_1 – E1_5** – prvi eluati IgG-a pročišćeni iz pet istovjetnih kombiniranih uzoraka plazme, **IgG** – IgG standard, **E2_1 – E2_5** – drugi eluati IgG-a pročišćeni iz pet istovjetnih kombiniranih uzoraka plazme

50 i 25 kDa, što odgovara teškom i lakom lancu IgG-a. Vidljive su i vrpce na otprilike 150 i 100 kDa koje bi mogle predstavljati nativni i djelomično denaturirani IgG u manjim količinama, te slabo vidljive vrpce iznad vrpce teškog lanca i na otprilike 40 kDa koje bi mogle predstavljati onečišćenja. Drugi gel, na kojem su se nalazile prikupljene frakcije W4, nije uspješno razvijen.

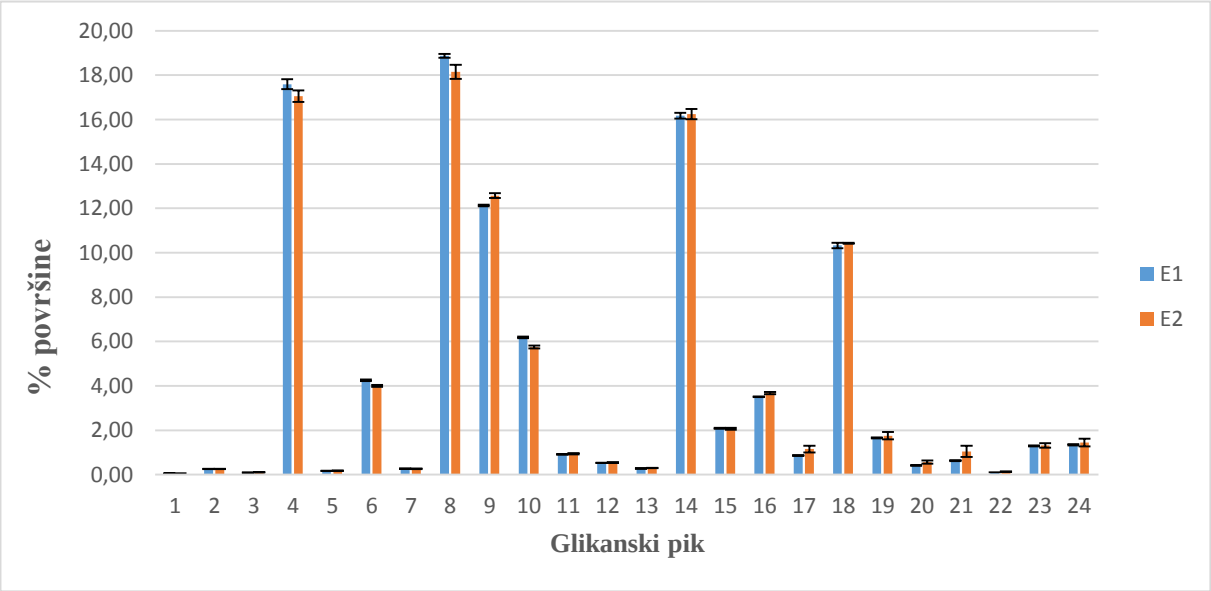
Uzorci su zatim deglikozilirani i obilježeni fluorescentnom bojom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3 i napravljena je UPLC analiza prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4. Slika 8 pokazuje reprezentativne dobivene kromatograme iz frakcija E1 i E2.



Slika 8. Kromatogram N-glikana IgG-a iz frakcija E1 (crveno) i E2 (plavo) izoliranog iz 50 µL kombiniranih uzoraka humane plazme. EU – jedinica emisije (eng. *emission unit*).

Dobiveni kromatografski profil N-glikana (Slika 8) odgovara onom poznatom iz literature (Pučić i sur., 2011, Slika 6) te potvrđuje da se doista radi o uspješno izoliranom IgG-u, a intenziteti kromatografskih pikova omogućavaju uspješno provođenje daljnje UPLC analize N-glikana IgG-a nakon njegove izolacije iz uzoraka plazme primjenom korištenih pufera. Dodatno, kromatogram glikana IgG-a iz druge frakcije eluiranja (E2) nema zanemariv intenzitet, što je u skladu s izmjerenim koncentracijama proteina u frakciji E2, te SDS-PAGE

analizom. Ovi rezultati govore u prilog tome da se značajan dio IgG-a eluira u kasnijim frakcijama. Usporedbom vrijednosti udjela površine koje svaki glikanski pik IgG-a zauzima u ukupnoj površini kromatograma (% površine) vidljivo je da su profili prvog i drugog eluata slični, te da je reproducibilnost dobra (Slika 9). Kako bi se poboljšala učinkovitost eluiranja IgG-a sa protein G zrna, u sljedećem eksperimentu je dodan još jedan eluacijski korak u postupak i provjerena količina proteina u tom eluatu kako bi se odredio ukupan volumen potreban za potpuno eluiranje, te dva dodatna koraka ispiranja protein G zrna prije samog eluiranja IgG-a u svrhu boljeg pročišćavanja.



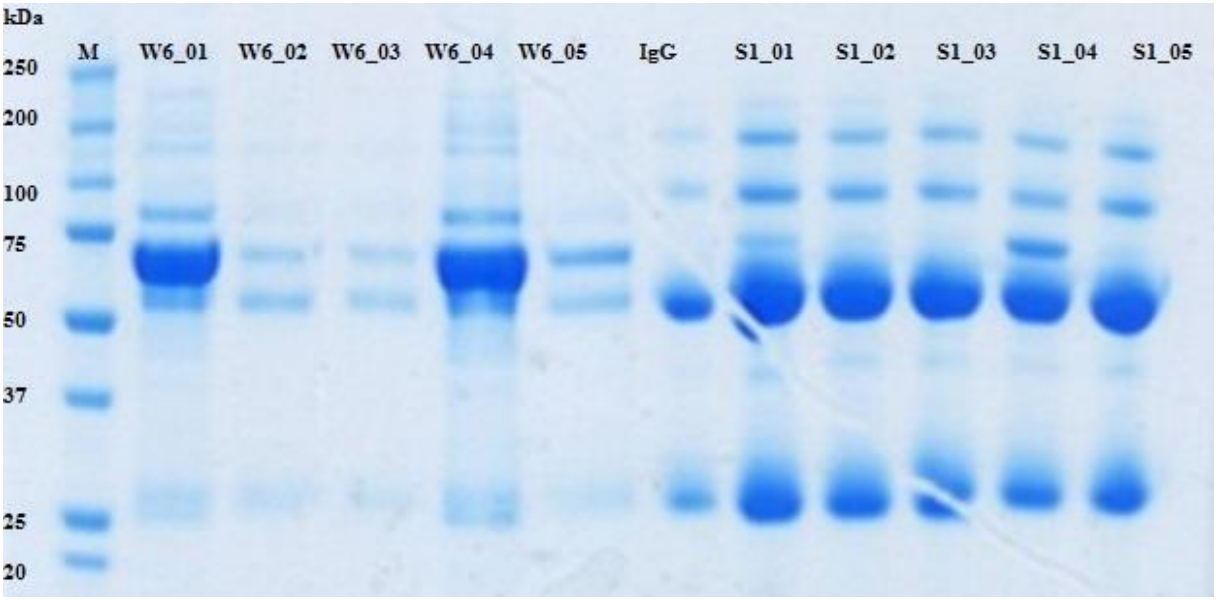
Slika 9. Udjeli površine (%) koje svaki glikanski pik IgG-a analiziranog iz pojedinih frakcija eluiranja (E1-E2) pri pročišćavanju iz kombiniranih uzoraka humane plazme zauzima u ukupnoj površini kromatograma. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija (n = 5) za svaki od 24 glikanska pika.

Kako je pokazana primjerenost korištenog pufera, u sljedećem eksperimentu, i svim ostalima, su se koristili kombinirani uzorci sinovijalne tekućine (100 µL). Drugi eksperiment se planirao provesti slijedeći isti protokol, uz ranije navedene izmjene. Međutim, velika viskoznost sinovijalne tekućine je stvarala probleme već pri početnom pipetiranju uzoraka, pri čemu je precizno pipetiranje bilo otežano zbog nepotpunog ulaženja i izlaženja uzoraka iz nastavaka za pipetiranje. U koraku nakon premještanja uzoraka na protein G zrna, u kojem nespecifično vezani proteini trebaju biti uklonjeni filtriranjem uz vakuum, došlo je do zaustavljanja protoka kroz 0,45 µm GHP filter pločicu. Problem se pokušao riješiti dodatnim

razrjeđivanjem uzoraka, tako da je uzorcima dodano prvo 200 μL PBS-a, a potom još dva puta po 100 μL PBS-a, no dodatno razrjeđenje niti povećanje vakuuma nije poboljšalo protok uzoraka kroz filter. Eksperiment je u ovom trenutku zaustavljen. Smanjenje brzine protoka nije bio potpuno neočekivani problem, ali se nije očekivalo da će prolazak uzorka kroz filter u potpunosti biti onemogućen. Kako i sama protein G zrna otežavaju prolaz kroz 0,45 μm filter, što u kombinaciji sa viskoznom sinovijalnom tekućinom potpuno onemogućava prolaz, pretpostavljeno je da bi filtriranje uzoraka sinovijalne tekućine prije nanošenja na zrna moglo ublažiti ili riješiti problem.

U trećem eksperimentu su, uz ranije spomenute izmjene, dodana dva koraka filtriranja uzoraka razrijeđene sinovijalne tekućine prije nanošenja na protein G zrna, prvo kroz 0,45 μm filter, a potom kroz 0,20 μm filter. Uzorci su uspješno propušteni kroz filtere, uz napomenu da je često dolazilo do zastoja u protoku, te je bilo potrebno dodatno miješanje uzoraka pipetom, kao i značajno povećavanje podtlaka stvorenog korištenjem uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma. Tijekom pročišćavanja su prikupljene frakcije zadnjeg ispiranja nespecifično vezanih proteina (W6), te pojedinačno sve tri frakcije pri eluiranju IgG-a s protein G zrna (E1-E3). Dodatni koraci filtriranja uzoraka su omogućili postupak izolacije IgG-a iz sinovijalne tekućine, ali je brzina procedure znatno smanjena, a trošak analize povećan.

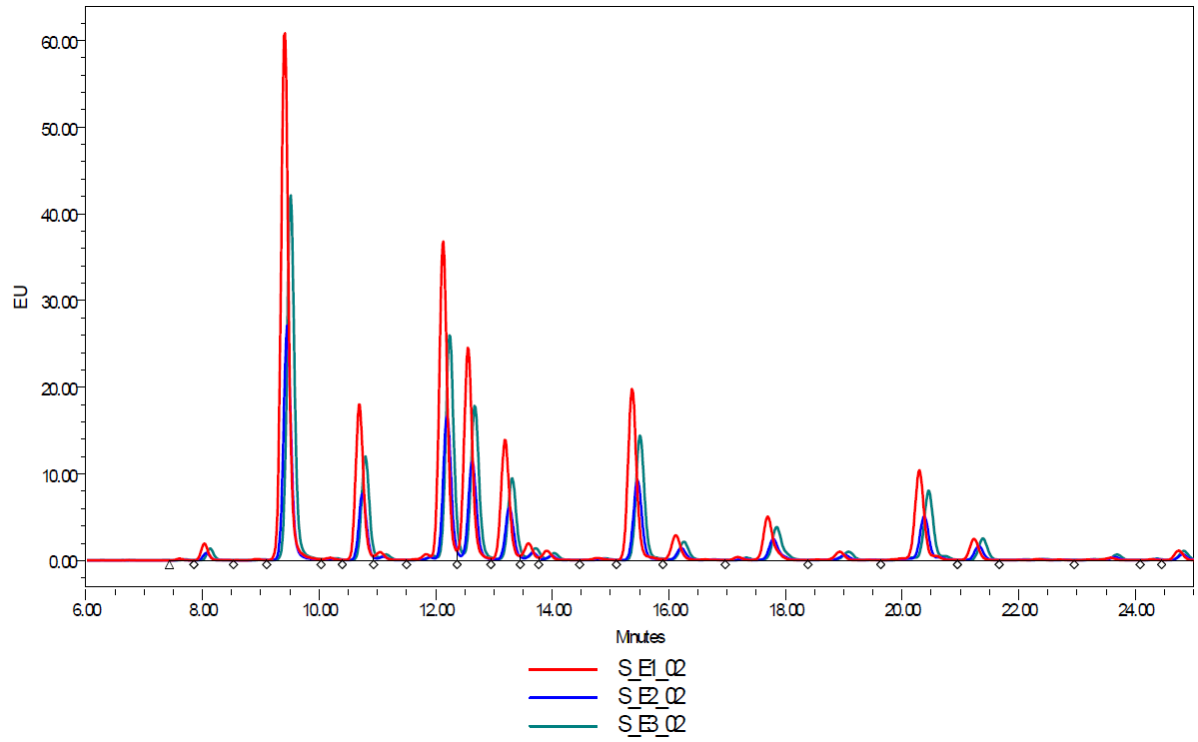
Spektrofotometrijski izmjerene koncentracije proteina su iznosile prosječno 1,504 g/L u prvom eluatu, 0,351 g/L u drugom eluatu, 0,124 g/L u trećem eluatu i 0,038 g/L u frakciji W6. Gel dobiven nakon provedene SDS-PAGE se može vidjeti na slici 10. Pri pripremi uzoraka za drugi gel je zabunom u skoro sve uzorke umjesto pufera za nanošenje uzorka s *β*-merkaptoetanolom dodan standard smjese proteina poznatih molekulskih masa, tako da je taj gel neiskoristiv.



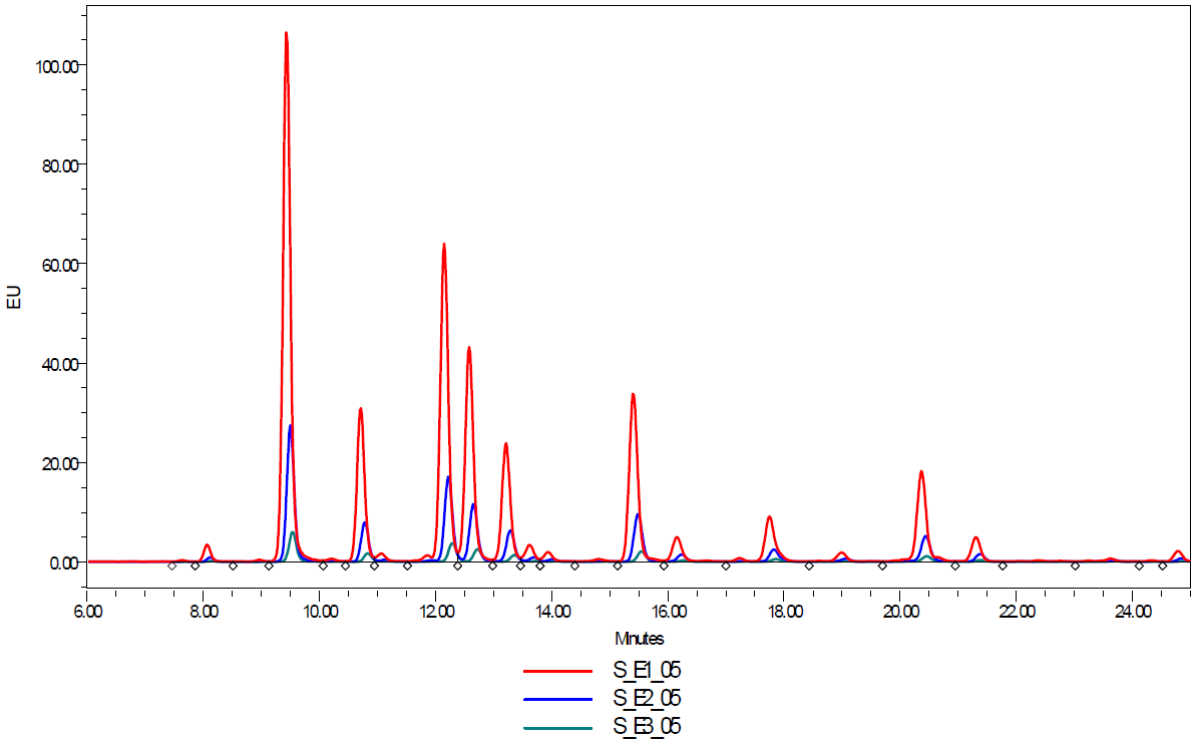
Slika 10. SDS-PAGE frakcija prikupljenih prilikom pročišćavanja IgG-a imunoprecipitacijom uz protein G zrna iz kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine M – proteinski marker, **W6_01 – W6_05** – frakcije prikupljene pri šestom ispiranju protein G zrna nakon dodavanja uzoraka, **IgG** – IgG standard, **S1_01 – S1_05** – prvi eluati IgG-a pročišćeni iz pet istovjetnih kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine

Iz gela je vidljivo da je IgG uspješno izoliran, što u prvoj frakciji IgG eluata (S1_01-S1_05) pokazuju prisutne vrpce koje odgovaraju teškom i lakom lancu IgG-a. Kao i u eksperimentu s kombiniranim uzorcima humane plazme, vidljive su i druge, slabije vrpce koje mogu odgovarati nativnom IgG-u, djelomično denaturiranom IgG-u i onečišćenjima. U frakcijama W6 su vidljive slabe vrpce koje po položaju otprilike odgovaraju vrpcama vidljivim u eluatima IgG-a iz uzoraka sinovijalne tekućine, što upućuje na eluiranje IgG-a s protein G zrna već pri koracima ispiranja od ostalih nespecifično vezanih proteina. Dodatno, dvije jače vrpce u W6_01 i W6_04 frakcijama koje odgovaraju masi proteina od oko 65 kDa pokazuju da postupak ispiranja vezanog IgG-a od nespecifično vezanih proteina nije reproducibilan, što bi se barem djelomično moglo objasniti neravnomjernim protokom uzoraka i otopina za ispiranje uzrokovanih viskoznošću sinovijalne tekućine.

Eksperiment je proveden do kraja, a kromatogrami dobiveni UPLC analizom se nalaze na slikama 11 i 12.



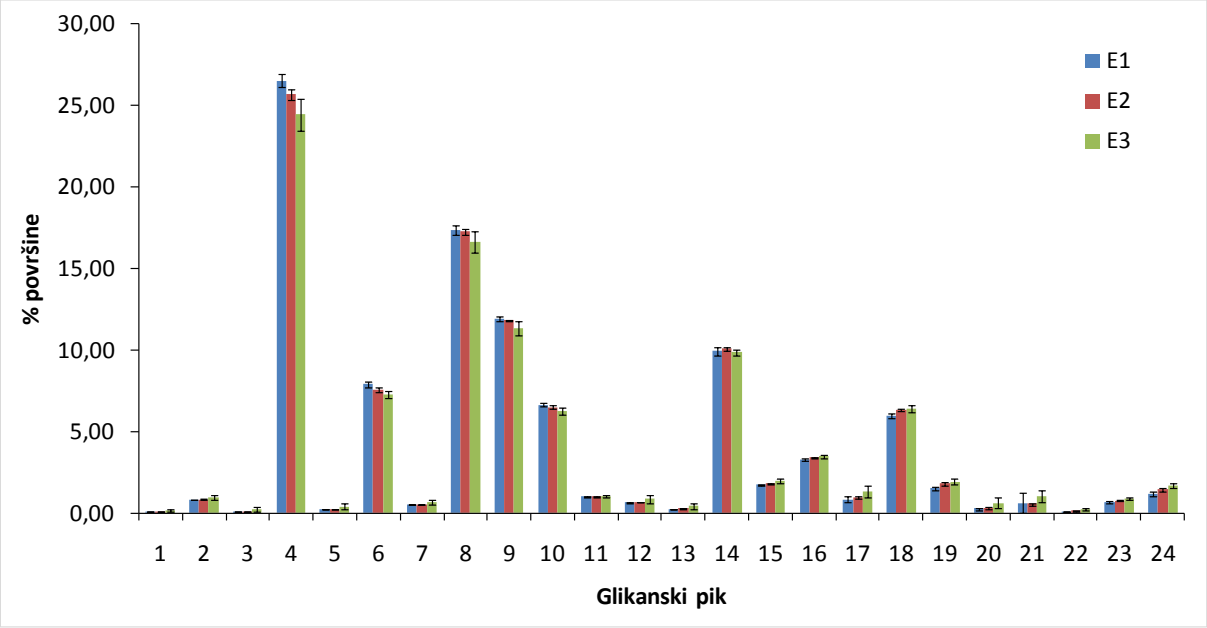
Slika 11. Kromatogram N-glikana IgG-a iz frakcija E1 (crveno), E2 (plavo) i E3 (zeleno) izoliranog iz 100 µL kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine (replikat S_02). EU – jedinica emisije (eng. *emission unit*).



Slika 12. Kromatogram N-glikana IgG-a iz frakcija E1 (crveno), E2 (plavo) i E3 (zeleno) izoliranog iz 100 µL kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine (replikat S_05). EU – jedinica emisije (eng. *emission unit*).

Spektrofotometrijskim mjerenjem je pokazano da se manja količina proteina nalazi i u trećem eluatu. Imajući u vidu relativno malu izmjerenu koncentraciju proteina u trećem eluatu, može se pretpostaviti da bi u četvrtom eluatu bila zanemarivo mala količina proteina, tako da dodatno eluiranje uzoraka nije potrebno. Međutim, iako je srednja koncentracija proteina izmjerena u pojedinačnim eluatima najveća u E1, a najmanja u E3, izmjerene vrijednosti između 5 replikata su dosta varirale, što upućuje na neravnomjerno eluiranje IgG-a sa protein G zrna. Kromatogrami prikazani na slikama 10 i 11 su također potvrdili da se IgG neravnomjerno eluirao sa zrna, s obzirom da se intenziteti signala dobivenih iz pojedinih frakcija znatno razlikuju (primjerice između istovjetnih uzoraka S_02 i S_05).

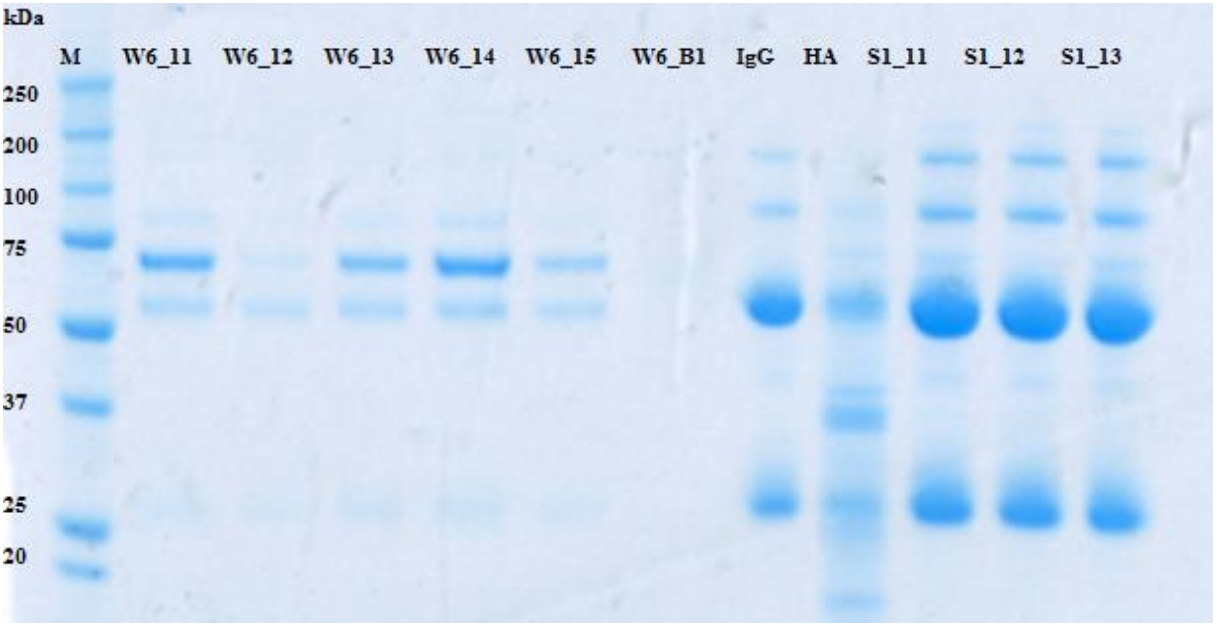
Onečišćenja eluiranog IgG-a drugim proteinima koja su primijećena na SDS-PAGE gelu uzoraka prikupljenih u prvom eksperimentu su prisutna i u ovom eksperimentu. Međutim, usporedbom vrijednosti udjela površine koje svaki glikanski pik IgG-a zauzima u ukupnoj površini kromatograma (% površine) vidljivo je da je reproducibilnost analize N-glikana IgG-a vrlo dobra, te se najvjerojatnije radi o onečišćenjima neglikoziliranim proteinima koja ne utječu na konačni signal N-glikana IgG-a (Slika 13). Vrpce vidljive u W6 frakcijama mogu biti nespecifično vezani proteini iz uzorka, posljedica odvajanja IgG-a s protein G zrna pri ispiranju PBS-om ili odvajanja proteina G sa zrna, ali u svakom slučaju u maloj količini, što osim slabog intenziteta vrpce potvrđuje i spektrofotometrijsko mjerenje proteina u frakciji W6.



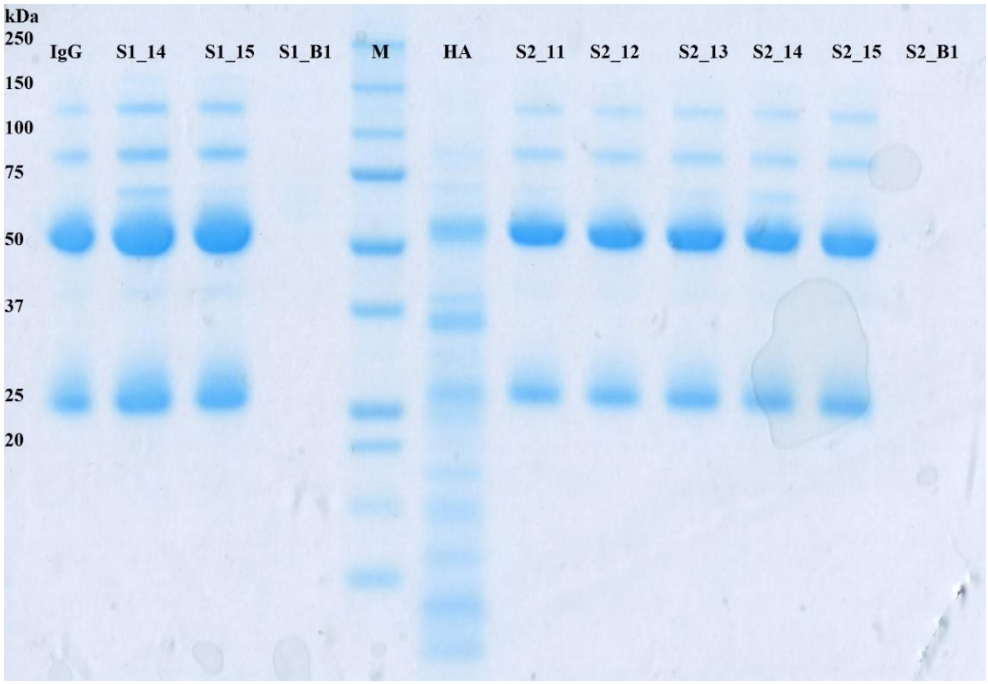
Slika 13. Udjeli površine (%) koje svaki glikanski pik IgG-a analiziranog iz pojedinih frakcija eluiranja (E1-E3) pri pročišćavanju iz kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine zauzima u ukupnoj površini kromatograma. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija (n = 5) za svaki od 24 glikanska pika.

Iako je dodatno filtriranje uzoraka sinovijalne tekućine kroz 0,45 μm i 0,2 μm filtere prije nanošenja na protein G zrna omogućilo provođenje eksperimenta do kraja, uvjeti poput čestih zastoja u filtriranju, potrebe za miješanjem uzoraka pipetom za vrijeme filtriranja i povećavanjem podtlaka stvorenog korištenjem uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma nisu prihvatljivi u visoko-protočnim istraživanjima, te je bilo potrebno problemu posvetiti dodatnu pažnju, te dodatno optimirati postupak pročišćavanja. Kako je hijaluronska kiselina glavna komponenta koja pridonosi viskoznosti sinovijalne tekućine (Hui i sur., 2012), u sljedećem eksperimentu je pokušano smanjenje viskoznosti sinovijalne tekućine korištenjem enzima hijaluronidaze. Hijaluronidaza nasumično hidrolizira 1,4-veze između N-acetil-ß-D-glukozamina i D-glukuronata u hijaluronatu i 1,4-ß-D-glikozidne veze između N-acetil-galaktozamina ili N-acetil-galaktozamin-sulfata i glukuronske kiseline u kondroitinu, kondroitin-4- i -6-sulfatu, i dermatanu. Tetramer je od 60 kDa i s obzirom da proizvođač navodi da hijaluronidaza sadrži 5 % manoze i 2,2 % glukozamina, što bi moglo smetati u analizi glikanskog profila IgG-a, glikozilacijski profil samog enzima je provjeren analizom glikana različitih količina hijaluronidaze. Prema specifikacijama proizvođača specifična aktivnost hijaluronidaze je 400-1000 U/mg krutine (u izračunima potrebne mase enzima je pretpostavljena najmanja aktivnost – 400 U/mg).

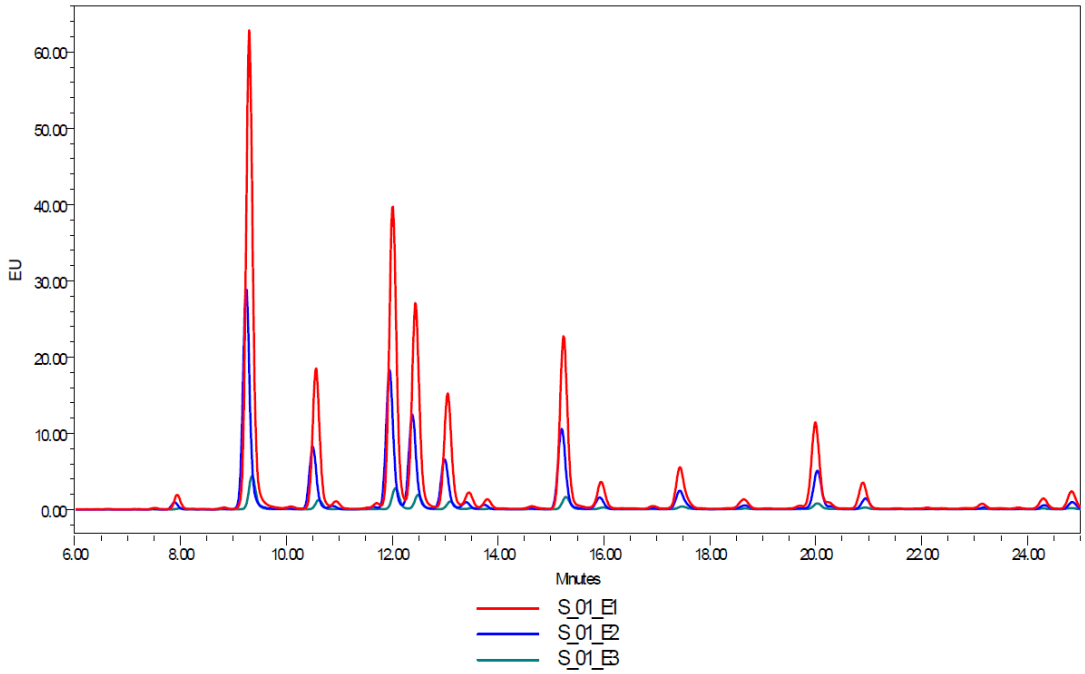
U četvrtom eksperimentu se koristila hijaluronidaza u količini od 10 U/ 0,7 mL razrijeđenog uzorka sinovijalne tekućine i uzorci su inkubirani u termomikseru 30 min/37 °C (Wedderburn i sur., 2000). Proizvođač preporuča svježu pripremu otopine enzima ili čuvanje kao 1 mg/mL otopine u PBS-u na -20 °C. Koraci filtriranja prije nanošenja uzoraka na protein G zrna dodani u prethodnom eksperimentu su zadržani. Hijaluronidaza je uspješno smanjila viskoznost sinovijalne tekućine, s kojom je nakon inkubacije u termomikseru bilo značajno lakše manipulirati i nije dolazilo do zastoja pri filtriranju. Zbog sumnje u koeluiranje proteina G (veličine oko 65 kDa) sa agaroznih zrna (vrpce u frakciji W6 prošlog eksperimenta) je korišten i *blank* uzorak (čisti PBS). Dodatno, SDS-PAGE je provedena i na uzorku hijaluronidaze (10 µL 1 mg/mL otopine u PBS-u), te su količine od 25 µL (količina korištena u eksperimentima), 50 µL i 100 µL iste otopine posušene u vakuum centrifugi, deglikozilirane, obilježene fluorescentnom bojom i analizirane na UPLC uređaju. Spektrofotometrijski izmjerene koncentracije proteina nakon pročišćavanja IgG-a u eksperimentu gdje su uzorci sinovijalne tekućine prethodno tretirani hijaluronidazom su iznosile prosječno 0,948 g/L u prvom eluatu, 0,486 g/L u drugom eluatu, 0,086 g/L u trećem eluatu i 0,045 g/L u frakciji W6. Razvijeni SDS-PAGE gelovi se nalaze na slikama 14 i 15 a kromatogrami uzoraka i hijaluronidaze na slikama 16, 17, 18 i 19.



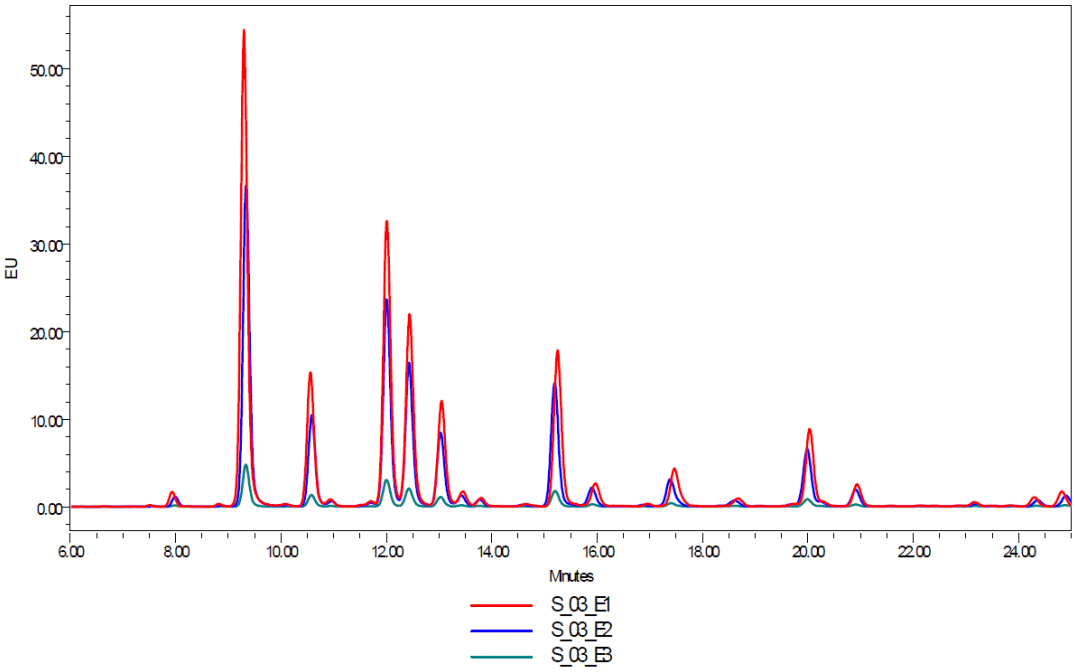
Slika 14. SDS-PAGE frakcija prikupljenih prilikom pročišćavanja IgG-a imunoprecipitacijom uz protein G zrna iz kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine obrađene hijaluronidazom. M – proteinski marker, **W6_11 – W6_15** – frakcije prikupljene pri šestom ispiranju protein G zrna nakon dodavanja uzoraka, **W6_B1** - *blank* uzorak prikupljen pri šestom ispiranju protein G zrna, **IgG** – IgG standard, **HA** – otopina hijaluronidaze, **S1_11 – S1_13** – prvi eluati IgG-a pročišćeni iz pet istovjetnih kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine



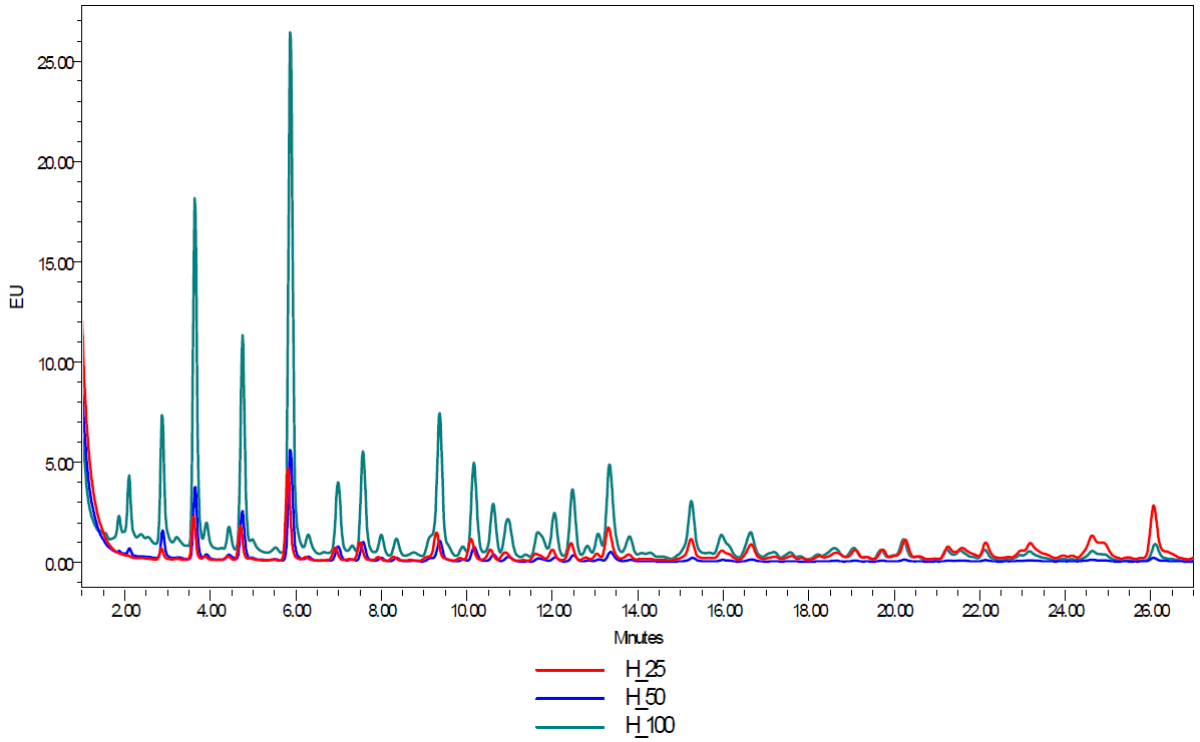
Slika 15. SDS-PAGE frakcija prikupljenih prilikom pročišćavanja IgG-a imunoprecipitacijom uz protein G zrna iz kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine obrađene hijaluronidazom. IgG – IgG standard, **S1_14 – S1_15** – prvi eluati IgG-a pročišćeni iz pet istovjetnih kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine, **S1_B1** – *blank* uzorak prvi eluat, **M** – proteinski marker, **HA** – otopina hijaluronidaze, **S2_11 – S2_15** – drugi eluati IgG-a pročišćeni iz pet istovjetnih kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine, **S2_B1** – *blank* uzorak drugi eluat



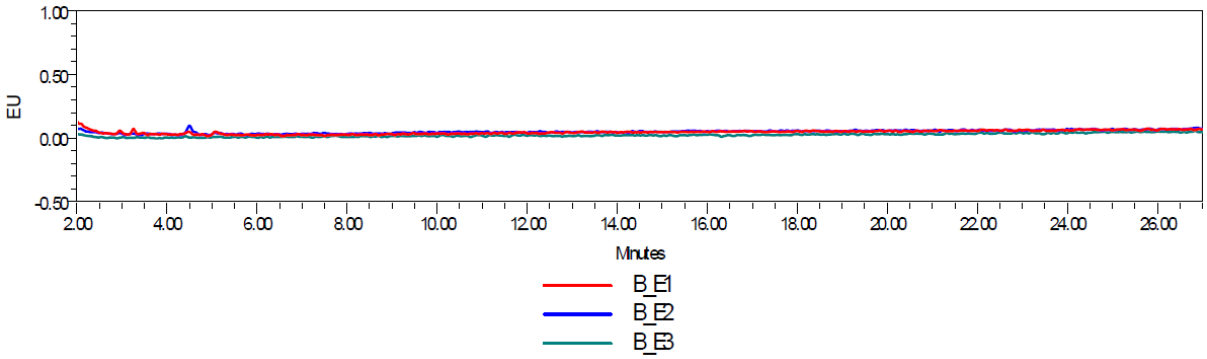
Slika 16. Kromatogram N-glikana IgG-a iz frakcija E1 (crveno), E2 (plavo) i E3 (zeleno) izoliranog iz 100 µL kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine (replikat S_01) obrađene hijaluronidazom. EU – jedinica emisije (eng. *emission unit*).



Slika 17. Kromatogram N-glikana IgG-a iz frakcija E1 (crveno), E2 (plavo) i E3 (zeleno) izoliranog iz 100 µL kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine (replikat S_03) obrađene hijaluronidazom. EU – jedinica emisije (eng. *emission unit*).



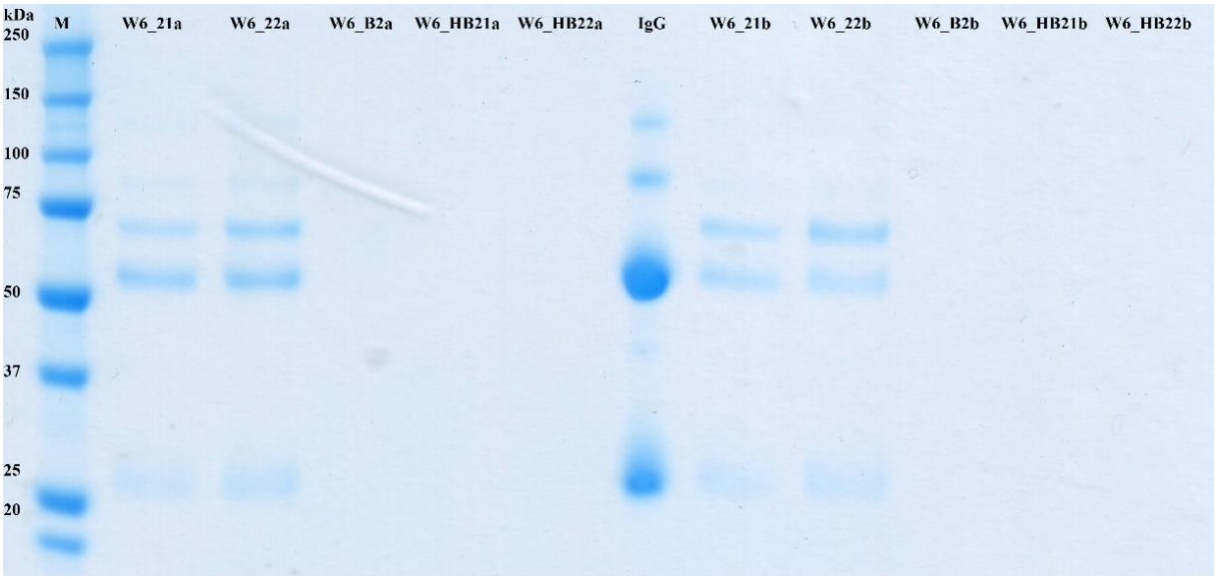
Slika 18. Kromatogram N-glikana 1 mg/mL otopine hijaluronidaze u PBS-u u količinama od 25 (crveno, količina korištena u eksperimentu), 50 (plavo) i 100 µL (zeleno).



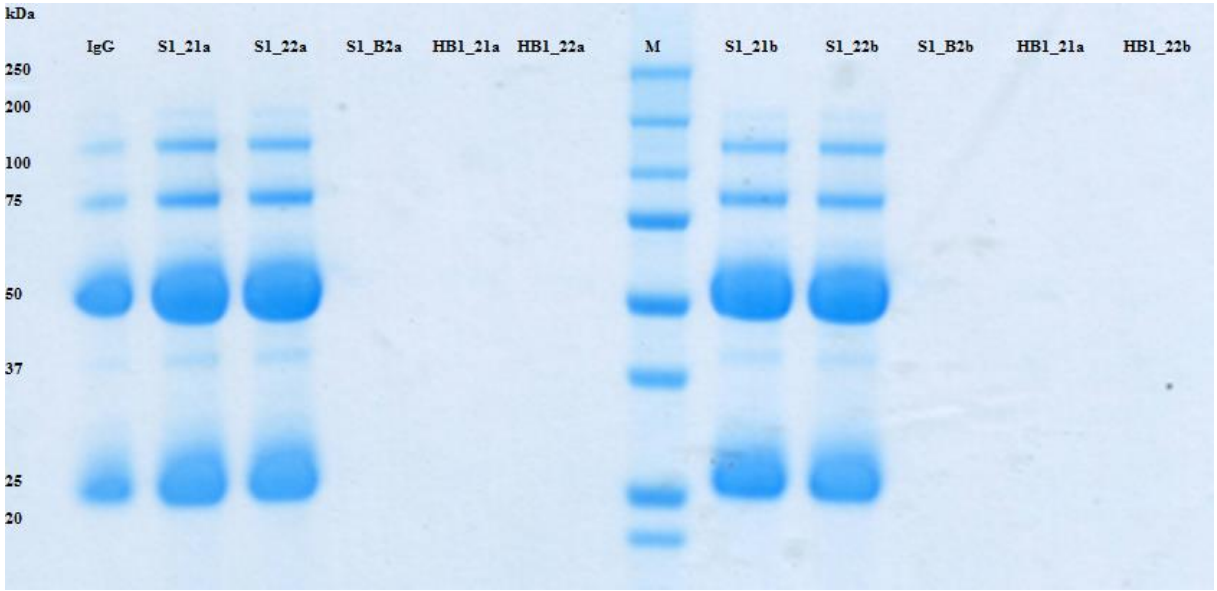
Slika 19. Kromatogram *blank* uzoraka (čisti PBS) iz frakcija E1 (crveno), E2 (plavo) i E3 (zeleno).

SDS-PAGE gelovi pokazuju da je IgG uspješno izoliran, te da su prisutna već komentirana onečišćenja u uzorcima i frakcijama W6. Uzorak hijaluronidaze daje velik broj vrpci, što ukazuje da hijaluronidaza nije čista. Kako su svi *blank* uzorci bez vrpci, može se ukloniti sumnja na eluiranje proteina G sa agaroze prilikom pročišćavanja IgG-a. Iz kromatograma prikazanih na slikama 16 i 17 se vidi da su intenziteti signala dobiveni iz pojedinih frakcija ujednačeniji nego u prošlom eksperimentu, što ukazuje na reproducibilnije eluiranje IgG-a. Kromatogram hijaluronidaze potvrđuje rezultate dobivene na SDS-PAGE gelu, pokazuje da je hijaluronidaza glikozilirana u većoj mjeri nego što je navedeno u certifikatu proizvođača, te da sadrži i druge vrste šećera osim manoze i glukozamina. Iako je intenzitet pikova za količinu hijaluronidaze koja se koristi u eksperimentima (25 μL**)** mali, potrebno je poboljšati postupak pročišćavanja IgG-a. Kromatogrami *blank* uzoraka ne pokazuju nikakve značajne pikove koji bi mogli smetati u analizi glikana IgG-a. Kako je problem viskoznosti sinovijalne tekućine riješen, cilj sljedećeg eksperimenta bio je probati postići bolje pročišćavanje uzoraka korištenjem PBS-a s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M) kako bi se učinkovitije uklonili nespecifično vezani proteini.

U petom eksperimentu je, uz dosad korišteni PBS, korišten i PBS s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M) koji bi mogao poboljšati čistoću izoliranog IgG-a. S uzorcima je postupano po protokolu iz zadnjeg eksperimenta. Korišteni su i *blank* uzorci s hijaluronidazom kako bi se provjerilo koliko je zaostaje nakon pročišćavanja, tj. jesu li signali koji potječu od hijaluronidaze značajni u smislu da utječu na rezultate analize glikana IgG-a. Spektrofotometrijski izmjerene koncentracije proteina su iznosile prosječno 1,313 g/L u prvom eluatu, 0,291 g/L u drugom eluatu, 0,076 g/L u trećem eluatu i 0,041 g/L u frakciji W6. Na slikama 20 i 21 se mogu vidjeti SDS-PAGE gelovi, a slike 22, 23, 24 i 25 pokazuju kromatograme N-glikana izoliranog IgG-a i N-glikana hijaluronidaze korištene kao *blank* uzorak.

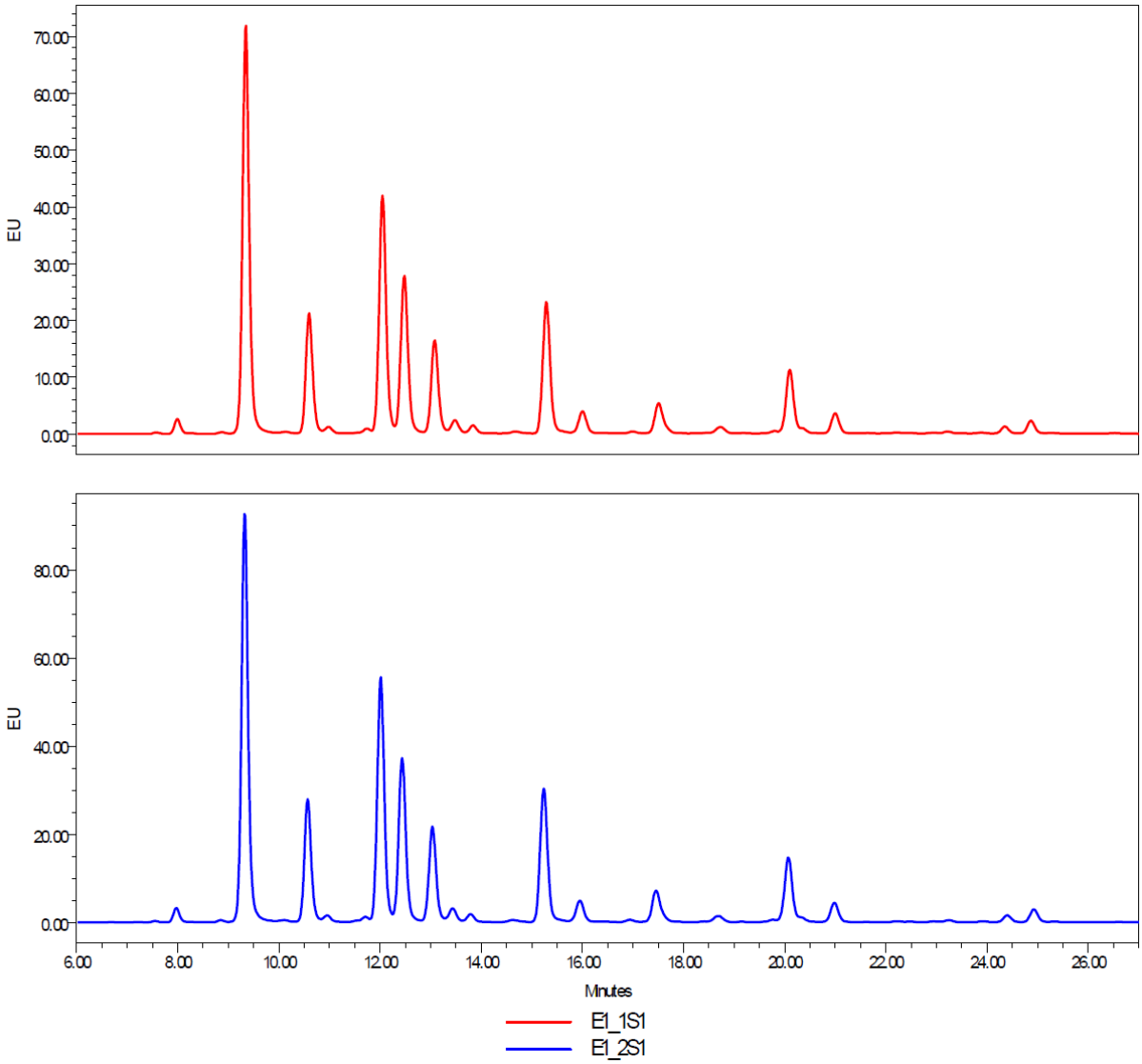


Slika 20. SDS-PAGE frakcija prikupljenih prilikom pročišćavanja IgG-a imunoprecipitacijom uz protein G zrna iz kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine obrađene hijaluronidazom (uz ispiranje od nespecifično vezanih proteina normalnim ili 0,25 M NaCl PBS-om). M – proteinski marker, **W6_21** i **W6_22** – frakcije prikupljene pri šestom ispiranju protein G zrna nakon dodavanja uzoraka, **W6_B2**- *blank* uzorak prikupljen pri šestom ispiranju protein G zrna, **W6_HB21** i **W6_HB22** – *blank* uzorak s hijaluronidazom prikupljen pri šestom ispiranju protein G zrna, **IgG** – IgG standard, **a** - označava da je korišten 1x PBS, **b** – označava da je korišten 1x PBS s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M)

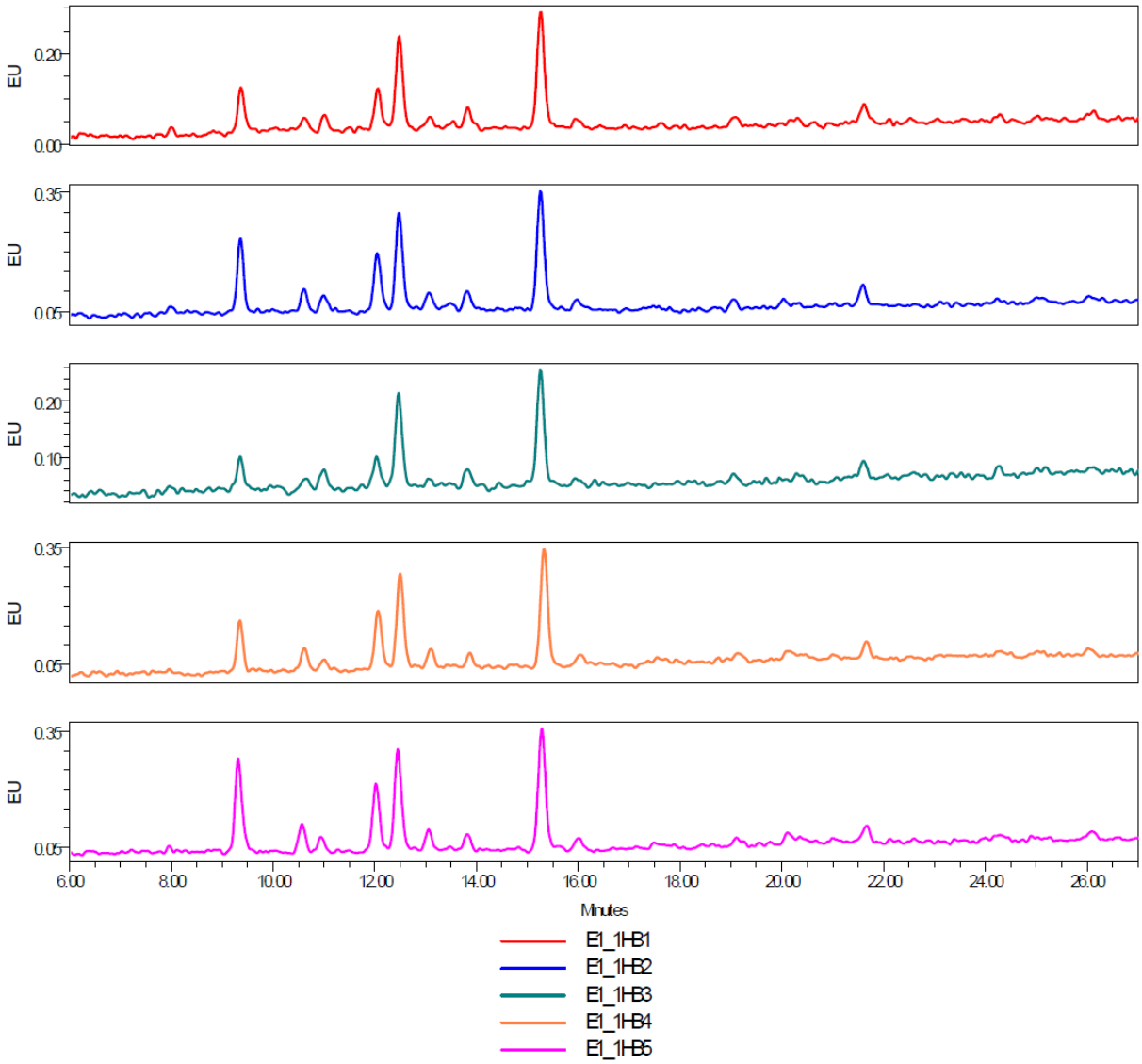


Slika 21. SDS-PAGE frakcija prikupljenih prilikom pročišćavanja IgG-a imunoprecipitacijom uz protein G zrna iz kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine obrađene hijaluronidazom (uz ispiranje od nespecifično vezanih proteina normalnim ili 0,25 M NaCl PBS-om). IgG – IgG standard, **S1_21** i **S1_22** – prvi eluati uzoraka IgG-a pročišćenih iz sinovijalne tekućine, **S1_B2** – *blank* uzorak prvi eluat, **HB1_21** i **HB1_22** – *blank* uzorak s hijaluronidazom prvi eluat, **M** – proteinski marker, **a** - označava da je korišten 1x PBS, **b** – označava da je korišten 1x PBS s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M)

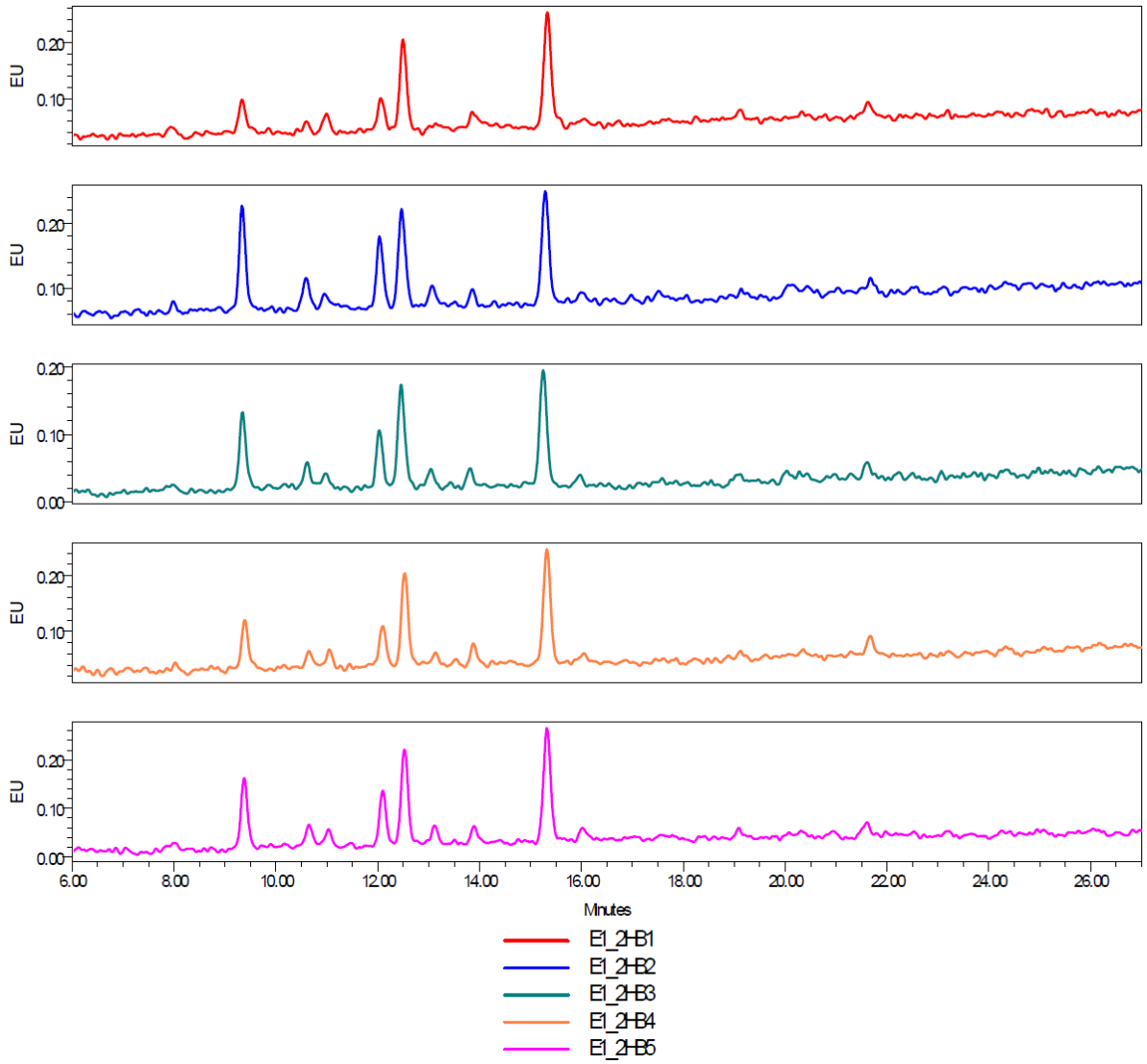
Razlike između korištenja „običnog“ PBS-a i 0,25 M NaCl PBS-a su jedva primjetne na gelovima. Frakcije W6 pri korištenju 0,25 M NaCl PBS-a daju nešto slabije vidljive vrpce, što upućuje na nešto uspješnije pročišćavanje IgG-a. *Blank* uzorci s hijaluronidazom nemaju vrpce ni u frakcijama W6, ni u prvim eluatima, bez obzira na korišteni PBS. Kako je hijaluronidaza glikozilirana, njena odsutnost nakon pročišćavanja uzoraka je poželjna, što ovi rezultati potvrđuju. Kromatogrami prikazani na slici 22 pokazuju da su pri korištenju 0,25 M NaCl PBS-a za pročišćavanje uzoraka dobiveni bolji intenziteti pikova. Usporedbom kromatograma na slikama 23 i 24 se može vidjeti da su pikovi koji daju *blank* uzorci s hijaluronidazom, iako ipak prisutni, nešto slabijeg intenziteta kad se koristi 0,25 M NaCl PBS umjesto običnog PBS-a. Smanjenje količine hijaluronidaze korištene u eksperimentima i produljenje vremena inkubacije bi moglo dodatno umanjiti intenzitet pikova koje hijaluronidaza daje, kao i korištenje hijaluronidaze veće čistoće od drugog proizvođača. Dodatno, kromatogram na slici 25 pokazuje da *blank* uzorci (čisti PBS) ne daju nikakve značajne pikove neovisno o korištenom PBS-u.



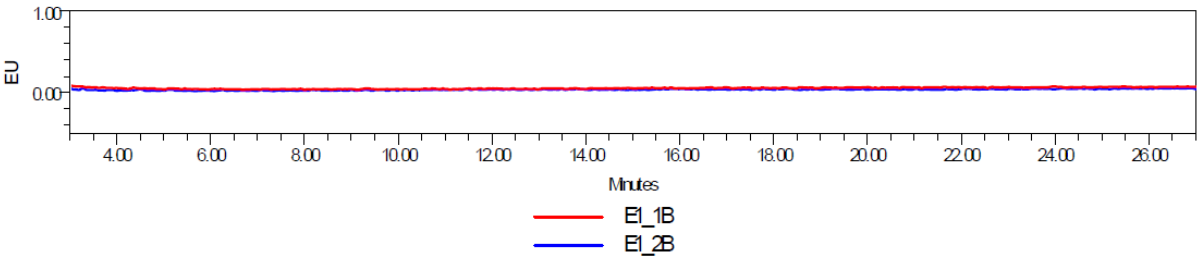
Slika 22. Kromatogram N-glikana IgG-a izoliranog iz kombiniranih uzoraka sinovijalne tekućine obrađene hijaluronidazom uz ispiranje od nespecifično vezanih proteina normalnim PBS-om – crveno, te PBS-om koji sadrži 0,25 M NaCl - plavo.



Slika 23. Kromatogram N-glikana hijaluronidaze korištene kao *blank* uzorak uz korištenje normalnog PBS-a prilikom pročišćavanja.

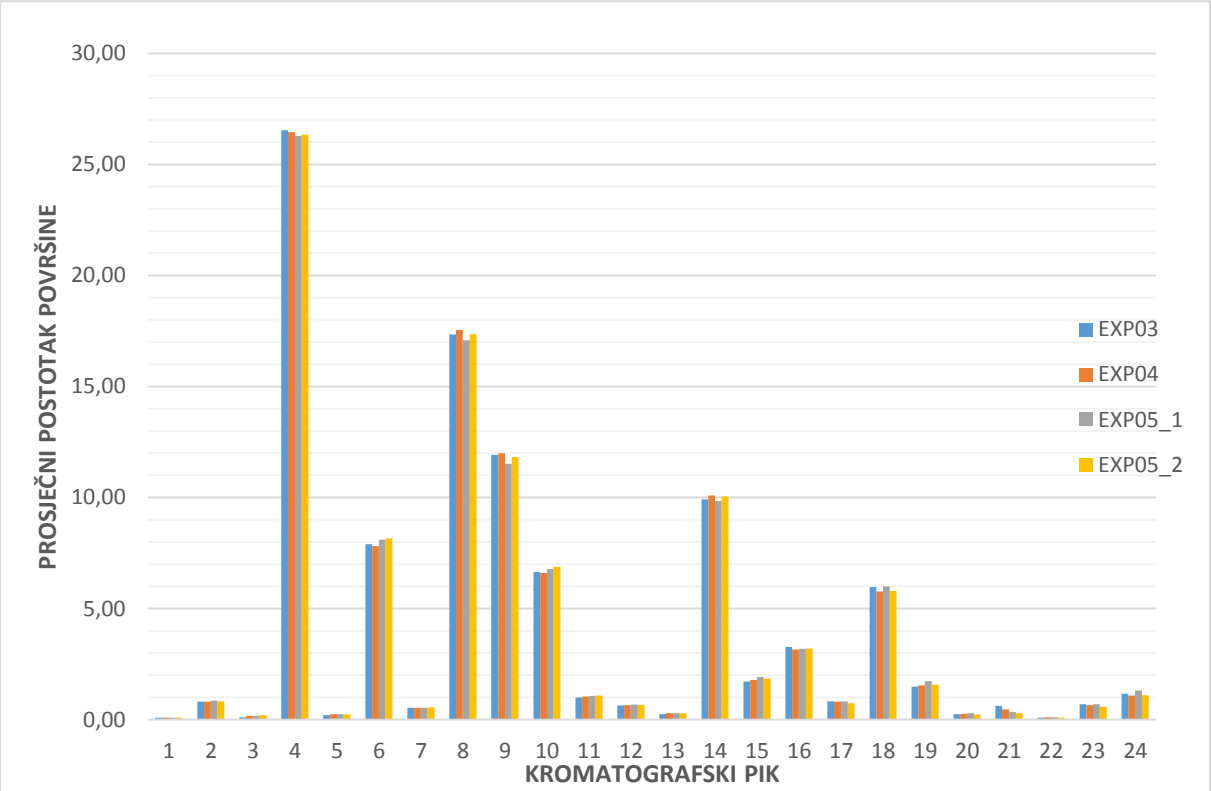


Slika 24. Kromatogram N-glikana hijaluronidaze korištene kao *blank* uzorak uz korištenje PBS-a koji sadrži 0,25 M NaCl prilikom pročišćavanja.



Slika 25. Kromatogram *blank* uzoraka uz korištenje normalnog (crveno) te PBS-a koji sadrži 0,25 M NaCl (plavo) prilikom pročišćavanja.

Nakon provedenih eksperimenata uspoređeni su prosječni postotci površine svakog pika, standardne devijacije i koeficijenti varijacije (CV). Graf koji uspoređuje prosječne postotke površina glikanskih pikova dobivenih UPLC analizom prvih eluata uzoraka IgG-a iz trećeg, četvrtog i petog eksperimenta je prikazan na slici 26. Iako se iz grafa vidi da postoje varijacije u prosječnim postotcima površine pojedinih glikanskih pikova, te varijacije su male (unutar 0,5 %), što ukazuje na dobru reproducibilnost metode.



Slika 26. Prosječni postotci površina glikanskih pikova dobivenih UPLC analizom prvih eluata uzoraka IgG-a iz trećeg, četvrtog i petog eksperimenta. EXP05_1 predstavlja dio uzoraka iz petog eksperimenta u obrađivanju kojih je korišten „normalni“ PBS, a EXP05_2 dio uzoraka kod kojih je korišten PBS s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M).

Tablica 2 sadrži standardne devijacije i koeficijente varijacije površina glikanskih pikova dobivenih UPLC analizom prvih eluata uzoraka IgG-a iz trećeg, četvrtog i petog eksperimenta. Najveći koeficijent varijacije imaju pikovi male površine, budući da za njih male promjene u postotcima površine jako pridonose varijaciji.

Tablica 2. Standardne devijacije (Stdev) i koeficijenti varijacije (CV) površina glikanskih pikova dobivenih UPLC analizom prvih eluata uzoraka IgG-a iz trećeg, četvrtog i petog eksperimenta. EXP05_1 predstavlja dio uzoraka iz petog eksperimenta kod kojih je korišten „normalni“ PBS za pročišćavanje, a EXP05_2 dio uzoraka kod kojih je korišten PBS s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M). Žutom bojom su označeni koeficijenti varijacije veći od 5. Zelenom bojom su označeni kromatografski pikovi prosječnih postotaka površine veće od 5%.

	EXP03		EXP04		EXP05_1		EXP05_2	
PIK	Stdev	CV/%	Stdev	CV/%	Stdev	CV/%	Stdev	CV/%
1	0,002	1,958	0,008	9,147	0,010	11,460	0,011	13,199
2	0,014	1,734	0,033	4,063	0,126	14,786	0,093	11,128
3	0,009	8,570	0,032	17,548	0,033	18,941	0,123	61,280
4	0,372	1,400	0,629	2,376	1,450	5,517	1,523	5,783
5	0,017	8,200	0,024	9,467	0,024	9,978	0,048	20,010
6	0,176	2,225	0,085	1,088	0,378	4,667	0,343	4,200
7	0,013	2,454	0,010	1,920	0,050	9,130	0,027	4,837
8	0,303	1,748	0,098	0,558	0,405	2,371	0,272	1,569
9	0,164	1,377	0,060	0,498	0,170	1,476	0,157	1,326
10	0,117	1,758	0,075	1,140	0,138	2,035	0,047	0,687
11	0,017	1,672	0,020	1,917	0,014	1,280	0,021	1,946
12	0,019	2,946	0,028	4,238	0,021	3,021	0,034	5,127
13	0,007	2,628	0,008	2,843	0,024	8,155	0,017	5,824
14	0,254	2,561	0,131	1,298	0,349	3,550	0,569	5,666
15	0,025	1,465	0,075	4,208	0,124	6,441	0,155	8,340
16	0,065	1,981	0,045	1,422	0,290	9,115	0,257	8,052
17	0,177	21,557	0,054	6,679	0,096	11,602	0,086	11,719
18	0,128	2,149	0,180	3,113	0,802	13,366	0,625	10,788
19	0,111	7,440	0,089	5,765	0,284	16,429	0,196	12,423
20	0,071	27,953	0,028	10,890	0,069	23,495	0,046	19,814
21	0,598	96,979	0,135	28,989	0,076	21,549	0,039	13,435
22	0,022	24,004	0,009	8,736	0,028	25,648	0,013	14,398
23	0,082	11,979	0,038	5,842	0,225	32,503	0,063	11,003
24	0,148	12,583	0,098	8,996	0,467	35,408	0,126	11,417

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- IgG iz uzoraka humane sinovijalne tekućine moguće je uspješno izolirati imunoprecipitacijom uz protein G zrna
- PBS je primjeren pufer za postupak pročišćavanja IgG-a iz uzoraka humane sinovijalne tekućine
- Korištenje PBS-a s povećanim udjelom NaCl-a (0,25 M) pri pročišćavanju IgG-a iz uzoraka humane sinovijalne tekućine daje nešto bolje rezultate pročišćavanja i bolje intenzitete glikanskih pikova
- Potrebna je obrada uzoraka humane sinovijalne tekućine hijaluronidazom (koja uspješno smanjuje njenu viskoznost) prije bilo kakvih postupaka s istom zbog problema s manipulacijom uzorcima i samim provođenjem metode koje stvara njena viskoznost
- Iako su prisutna neka onečišćenja nakon pročišćavanja IgG-a iz uzoraka humane sinovijalne tekućine, ta onečišćenja su najvjerojatnije neglikozilirani proteini koji ne smetaju analizi glikanskog profila IgG-a
- Hijaluronidaza korištena ovdje je glikozilirana i daje pikove vrlo slabog intenziteta pri UPLC analizi, što bi se u manjoj mjeri moglo odraziti na rezultate analize

Smanjenje količine korištene hijaluronidaze i produljenje vremena inkubacije bi moglo dodatno umanjiti intenzitet pikova koje hijaluronidaza daje, kao i korištenje hijaluronidaze veće čistoće od drugog proizvođača. Nakon dodatnog smanjenja ili uklanjanja ovog utjecaja hijaluronidaze na rezultate analize, ova metoda bi se mogla koristiti na analizu glikanskog profila IgG-a izoliranog iz humane sinovijalne tekućine.

6. LITERATURA

1. Ahmed AA, Giddens J, Pincetic A, Lomino JV, Ravetch JV, Wang LX, Bjorkman PJ. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(18), 3166-3179.

2. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 72, 73, 949.

3. Björck L, Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology*, 133(2), 969–974.

4. Cox TM, Sinclair J. Molekularna biologija u medicini. Zagreb, Medicinska naklada, 2000, str. 191, 221.

5. Fletcher CM, Coyne MJ, Villa OF, Chatzidaki-Livanis M, Comstock LE. A General O-Glycosylation System Important to the Physiology of a Major Human Intestinal Symbiont. *Cell*, 2009, 137(2), 321-331.

6. Freidin MB, Keser T, Gudelj I, Štambuk J, Vučenović D, Allegri M, Pavić T, Šimurina M, Fabiane SM, Lauc G, Williams FMK. The Association Between Low Back Pain and Composition of IgG Glycome. *Scientific reports*, 2016, 6, 26815.

7. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1820(9), 1318-1326.

8. Gulácsi L, Brodszky V, Baji P, Kim H, Kim SY, Cho YY, Péntek M. Biosimilars for the management of rheumatoid arthritis: economic considerations. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2015, 11(1), 43-52.

9. Hart GW, Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell*, 2010, 143(5), 672-676.

10. Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2012, 4(1), 15-37.

11. Janeway Jr. CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: The Immune System In Health And Disease. New York, Garland Publishing, 2001, str. 112-114.

12. Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods in molecular biology*, 2008, 424, 349-364.

13. Kellokumpu S, Hassinen A, Glumoff T. Glycosyltransferase complexes in eukaryotes: Long-known, prevalent but still unrecognized. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(2), 305-325.

14. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Krištić J, Keser T, Vitart V, Scheijen B, Uh HW, Molokhia M, Patrick AL, McKeigue P, Kolčić I, Lukić IK, Swann O, van Leeuwen FN, Ruhaak LR, Houwing-Duistermaat JJ, Slagboom PE, Beekman M, de Craen AJM, Deelder AM, Zeng Q, Wang W, Hastie ND, Gyllensten U, Wilson JF, Wuhrer M, Wright AF, Rudd PM, Hayward C, Aulchenko Y, Campbell H, Rudan I. Loci Associated with N-Glycosylation of Human

Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLoS Genetics*, 2013, 9(1), 1003225.

15. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1860(8), 1574-1582.

16. Lin CW, Tsai MH, Li ST, Tsai TI, Chu KC, Liu YC, Lai MY, Wu CY, Tseng YC, Shivatare SS, Wang CH, Chao P, Wang SY, Shih HW, Zeng YF, You TH, Liao JY, Tu YC, Lin YS, Chuang HY, Chen CL, Tsai CS, Huang CC, Lin NH, Ma C, Wu CY, Wong CH. A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(22), 201513456.

17. Marek KW, Vijay IK, Marth JD. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*, 1999, 9(11), 1263-1271.

18. Meier FMP, Frerix M, Hermann W, Müller-Ladner U. Current immunotherapy in rheumatoid arthritis. *Immunotherapy*, 2013, 5(9), 955–74.

19. Menni C, Keser T, Mangino M, Bell JT, Erte I, Akmačić I, Vučković F, Pučić Baković M, Gornik O, McCarthy MI, Zoldoš V, Spector TD, Lauc G, Valdes AM. Glycosylation of immunoglobulin G: Role of genetic and epigenetic influences. *PLoS ONE*, 2013, 8(12), 6–13.

20. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2012, 13(7), 448-462.

21. Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu, 1930., https://www.nobelprize.org, pristupljeno 17.5.2017.

22. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Đurić Ž, Keser T, Rajšl K, Remondini D, Castellani G, Gašparović H, Gornik O, Lauc G. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Scientific Reports*, 2014, 4, 1–10.

23. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 2006, 126(5), 855–867.

24. Perry LM, Winthrop KL, Curtis JR. Vaccinations for Rheumatoid Arthritis. *Current rheumatology reports*, 2014, 16(8), 431.

25. 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 D, Lauc G. High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG-Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(10), 1074.

26. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2010, 125(2), 41-52.

27. de Sousa EB, Casado PL, Neto VM, Duarte MEL, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Research & Therapy*, 2014, 5(5), 112.

28.Subedi GP, Barb AW. The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure*, 2015, 23(9), 1573–1583.

29. Trbojević Akmačić I, Ugrina I, Štambuk J, Gudelj I, Vučković F, Lauc G, Pučić Baković M. High Throughput Glycomics : Optimization of Sample Preparation. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80(7), 934–942.

30. Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J, Nimmo ER, Kalla R, Drummond H, Štambuk J, Dunlop MG, Novokmet M, Aulchenko Y, Gornik O, Campbell H, Pučić Baković M, Satsangi J, Lauc G. Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflammatory bowel diseases*, 2015, 21(6), 1237–1247.

31. Varki A. Essentials of glycobiology. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

32. Varki A, Altheide TK. Comparing the human and chimpanzee genomes: Searching for needles in a haystack. *Genome Research*, 2005, 15(12), 1746–1758.

33. Weddeburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamejoints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2000, 43(4), 765–774.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Protutijela imaju središnju ulogu u molekulskim mehanizmima imunosnog odgovora. Glavno i najzastupljenije protutijelo u krvnoj plazmi je imunoglobulin G (IgG). IgG se sastoji od dvije vrste polipeptidnih lanaca: teškog (veličine oko 50 kDa) i lakog lanca (veličine oko 25 kDa). Svaka IgG molekula se sastoji od dva teška i dva laka lanca (ukupne veličine oko 150 kDa). Glikozilacija je od velike važnosti za pravilno funkcioniranje IgG-a. Svaki teški lanac nosi kovalentnu vezani bi-antenarni N-glikan na asparaginskom ostatku 297. Ovi oligosaharidi imaju strukturnu i funkcionalnu važnost za imunoglobulin G i njegove efektorske funkcije.

Normalni sinovijalni zglobovi sadrže šupljinu ispunjenu sinovijalnom tekućinom koju izlučuje sinovijalna membrana. Sinovijalna tekućina je viskozna tekućina koja ima podmazujuću i metaboličku funkciju unutar zgloba. Održavanje normalnog sastava sinovijalne tekućine je nužno za homeostazu zgloba. Reumatoidni artritis (RA), koji zahvaća otprilike 1% populacije, predstavlja autoimunosni napad primarno usmjeren na sinovijalne membrane pokretnih zglobova.

Svrha ovog rada je razvoj metode za analizu N-glikana IgG-a iz sinovijalne tekućine kao važnog biološkog uzorka u proučavanju reumatoidnog artritisa. IgG je izoliran iz sinovijalne tekućine imunoprecipitacijom uz korištenje protein G zrna, te su optimirani uvjeti pročišćavanja. Nakon izolacije IgG-a provedena je deglikozilacija, N-glikani su obilježeni i analizirani UPLC-om. Razvijena metoda će biti korištena u daljnjem istraživanju povezanosti reumatoidnog artritisa i N-glikana IgG-a, poželjno u obliku koji omogućuje visokoprotočnu analizu velikog broja uzoraka.

Antibodies play a central role in molecular mechanisms of immune response. The main and most common antibody in blood plasma is immunoglobulin G (IgG). IgG consists of two types of polypeptide chains: heavy (approximately 50 kDa) and light chain (approximately 25 kDa). Each IgG molecule consists of two heavy and two light chains (total molecular weight of approximately 150 kDa). Glycosylation is of great importance for proper functioning of IgG. Each heavy chain carries a covalently bonded bi-antenary N-glycan on the asparagine residue 297. These oligosaccharides have structural and functional importance for immunoglobulin G and its effector functions.

Normal synovial joints contain a cavity filled with synovial fluid secreted by the synovial membrane. Synovial fluid is a viscous liquid that has a lubricating and metabolic function within a joint. Maintaining normal composition of synovial fluid is necessary for homeostasis of a joint. Rheumatoid arthritis (RA), which affects approximately 1% of the population, represents an autoimmune attack primarily directed to synovial membranes of synovial joints.

The purpose of this paper is to develop a method for IgG N-glycan analysis from synovial fluid as an important biological sample in the study of rheumatoid arthritis. IgG was isolated from synovial fluid by immunoprecipitation using protein G beads, and purification conditions were optimized. N-glycans were released from IgG, labeled and analyzed by UPLC. The developed method will be used in further research of the association of rheumatoid arthritis and IgG N-glycans, preferably in a form that allows high-throughput analysis of a large number of samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

RAZVOJ METODE ZA ANALIZU GLIKANSKOG PROFILA IgG-a IZOLIRANOG IZ SINOVIJALNE TEKUĆINE

Bernard Krešić

SAŽETAK

Protutijela imaju središnju ulogu u molekulskim mehanizmima imunosnog odgovora. Glavno i najzastupljenije protutijelo u krvnoj plazmi je imunoglobulin G (IgG). IgG se sastoji od dvije vrste polipeptidnih lanaca: teškog (veličine oko 50 kDa) i lakog lanca (veličine oko 25 kDa). Svaka IgG molekula se sastoji od dva teška i dva laka lanca (ukupne veličine oko 150 kDa). Glikozilacija je od velike važnosti za pravilno funkcioniranje IgG-a. Svaki teški lanac nosi kovalentnu vezani bi-antenarni N-glikan na asparaginskom ostatku 297. Ovi oligosaharidi imaju strukturnu i funkcionalnu važnost za imunoglobulin G i njegove efektorske funkcije. Normalni sinovijalni zglobovi sadrže šupljinu ispunjenu sinovijalnom tekućinom koju izlučuje sinovijalna membrana. Sinovijalna tekućina je viskozna tekućina koja ima podmazujuću i metaboličku funkciju unutar zgloba. Održavanje normalnog sastava sinovijalne tekućine je nužno za homeostazu zgloba. Reumatoidni artritis (RA), koji zahvaća otprilike 1% populacije, predstavlja autoimunosni napad primarno usmjeren na sinovijalne membrane pokretnih zglobova. Svrha ovog rada je razvoj metode za analizu N-glikana IgG-a iz sinovijalne tekućine kao važnog biološkog uzorka u proučavanju reumatoidnog artritisa. IgG je izoliran iz sinovijalne tekućine imunoprecipitacijom uz korištenje protein G zrna, te su optimirani uvjeti pročišćavanja. Nakon izolacije IgG-a provedena je deglikozilacija, N-glikani su obilježeni i analizirani UPLC-om. Razvijena metoda će biti korištena u daljnjem istraživanju povezanosti reumatoidnog artritisa i N-glikana IgG-a, poželjno u obliku koji omogućuje visokoprotočnu analizu velikog broja uzoraka.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 26 grafičkih prikaza, 2 tablice i 33 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: imunoglobulin G, sinovijalna tekućina, imuoprecipitacija, analiza N-glikana, UPLC

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. Sanja Dabelić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana Mornar Turk, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen:

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF METHOD FOR ANALYSIS OF IgG GLYCAN PROFILE ISOLATED FROM SYNOVIAL FLUID

Bernard Krešić

SUMMARY

Antibodies play a central role in molecular mechanisms of immune response. The main and most common antibody in blood plasma is immunoglobulin G (IgG). IgG consists of two types of polypeptide chains: heavy (approximately 50 kDa) and light chain (approximately 25 kDa). Each IgG molecule consists of two heavy and two light chains (total molecular weight of approximately 150 kDa). Glycosylation is of great importance for proper functioning of IgG. Each heavy chain carries a covalently bonded bi-antenary N-glycan on the asparagine residue 297. These oligosaccharides have structural and functional importance for immunoglobulin G and its effector functions. Normal synovial joints contain a cavity filled with synovial fluid secreted by the synovial membrane. Synovial fluid is a viscous liquid that has a lubricating and metabolic function within a joint. Maintaining normal composition of synovial fluid is necessary for homeostasis of a joint. Rheumatoid arthritis (RA), which affects approximately 1% of the population, represents an autoimmune attack primarily directed to synovial membranes of synovial joints. The purpose of this paper is to develop a method for IgG N-glycan analysis from synovial fluid as an important biological sample in the study of rheumatoid arthritis. IgG was isolated from synovial fluid by immunoprecipitation using protein G beads, and purification conditions were optimized. N-glycans were released from IgG, labeled and analyzed by UPLC. The developed method will be used in further research of the association of rheumatoid arthritis and IgG N-glycans, preferably in a form that allows high-throughput analysis of a large number of samples.

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

Thesis includes: 49 pages, 26 figures, 2 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: immunoglobulin G, synovial fluid, immunoprecipitation, N-glycan analysis, UPLC

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

Sanja Dabelić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: