Usporedba obilježavanja N-glikana 2-aminobenzamidom i prokainamidom u analizi tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti temeljenoj na hidrofilnim interakcijama

Zolić, Isabella

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:163:512617

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Isabella Zolić

Usporedba obilježavanja N-glikana 2-aminobenzamidom i prokainamidom u analizi tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti temeljenoj na hidrofilnim interakcijama

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Veliko hvala mojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Olgi Gornik na savjetima i pomoći. Također, hvala dr. sc. Tomi Keseru na strpljenju i vodstvu pri izradi i interpretaciji eksperimentalnog dijela rada. Nadalje, zahvaljujem se svojim roditeljima na velikoj podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. GLIKOZILACIJA 1

1.2. GLIKANI 1

1.2.1. N-vezani glikani 3

1.3. IMUNOGLOBULINI 5

1.3.1. IgG 6

1.3.2.Vezanje Fc IgG za FcγR 7

1.4. ANALIZA GLIKANA 8

1.4.1. Analiza N-glikana 10

1.4.2. HILIC UPLC - Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama 11

2. OBRAZLOŽENJE TEME 14

3. MATERIJALI I METODE 15

3.1. MATERIJALI 15

3.1.1. Anorganske kemikalije 15

3.1.2.Organske kemikalije 15

3.1.3. Biološke kemikalije 15

3.1.4. Otopine i puferi 16

3.1.5 Laboratorijska oprema i pribor 17

3.2. UZORAK 17

3.3. PROTOKOL PRIPREME UZORKA 18

3.3.1. Izolacija N-glikana s imunoglobulina G 18

3.3.2. Označavanje, pročišćavanje i eluacija N-glikana 18

3.4. ANALIZA UZORAKA 20

4. REZULTATI I RASPRAVA 22

4.1. OSJETLJIVOST I LINEARNO PODRUČJE 24

4.2. OPTIMALNI RASPON RELATIVNE KVANTIFIKACIJE I PRECIZNOST 26

5. ZAKLJUČAK 28

6. LITERATURA 29

7. SAŽETAK/ SUMMARY 31

8. PRILOZI 33

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. GLIKOZILACIJA

Glikozilacija je složena kotranslacijska i posttranslacijska reakcija modifikacije u kojoj dolazi do kovalentnog vezanja šećernih struktura na proteine i lipide. Posredovana je enzimima, a odvija se u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. S obzirom da glikozilacija doprinosi funkciji proteina i lipida važno je razumjeti povezanost između strukture vezanog glikana te funkcije glikozilirane molekule.

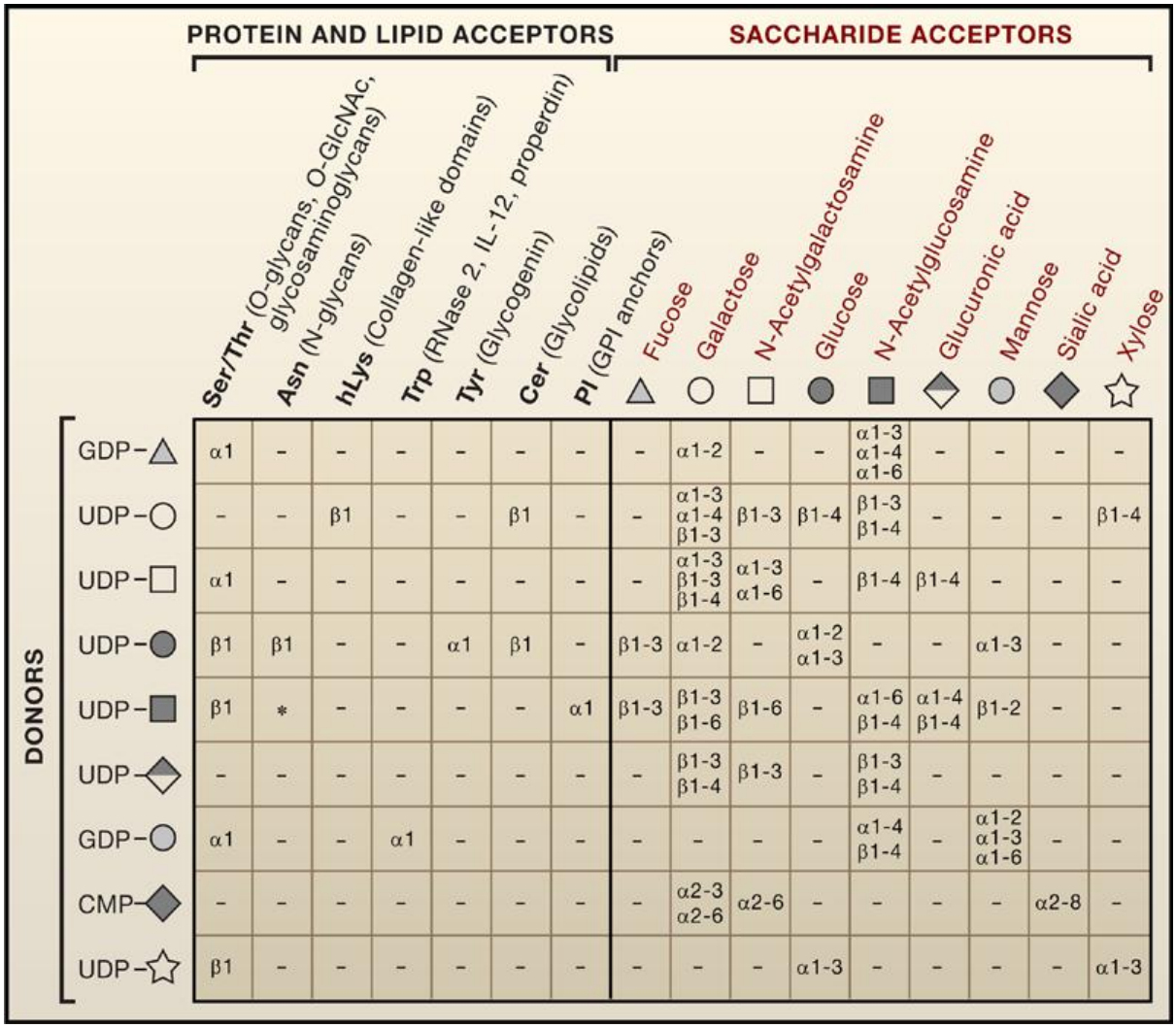
Iako su većim dijelom zastupljeni na staničnoj površini ili se izlučuju iz stanice, glikozilirane proteine također nalazimo u jezgri i citosolu (Cooper i Hausman, 2004). Za razliku od nukleinske kiseline i proteina, glikani su produkt kompleksnog, evolucijski očuvanog biosintetskog puta na koji utječu brojni genetski i okolišni čimbenici. O iznimnoj važnosti glikozilacije govori činjenica da se većina proteina višestaničnih organizama nalazi u formi glikokonjugata (Lauc i sur., 2014).

Glikani imaju ulogu u mnogim ključnim biološkim procesima. Unutar stanice sudjeluju u procesu regulacije proteinskog smatanja novosintetiziranih proteina u endoplazmatskom retikulumu te u transportiranju istih u odgovarajuće stanične odjeljke. Kao dijelovi stanične membrane služe međustaničnoj komunikaciji, njihovoj adheziji, prepoznavanju vlastitih i stranih stanica te patogenih mikroorganizama. Jedan od primjera adhezije, vrlo važne u imunosnom odgovoru, jest visoko regulirana interakcija lektina i selektina koji se nalaze na vaskularnom endotelu i većini leukocita. Osim prepoznavanja vlastitog, stanice pomoću *Toll-like* receptora mogu prepoznati i glikane bakterija te na taj način pokrenuti imunosni odgovor (Ohtsubo i Marth, 2006). Glikani su također glavne komponente izvanstaničnog matriksa koji omogućuje staničnu komunikaciju (Lauc i sur., 2014).

1.2. GLIKANI

U procesu nastajanja glikokonjugata sudjeluju dvije vrste enzima; glikozil-transferaza i glikozidaza koje stvaraju, odnosno hidroliziraju glikozidnu vezu. Većina navedenih enzima veoma je osjetljiva na fiziološko i biokemijsko stanje stanice unutar koje se nalazi, što se odražava na sastav šećera vezanih na glikozilirane asparaginske ostatke u zrelom glikokonjugatu (Varki i sur., 2009). Monosaharidi koji se javljaju kao dio glikanske strukture

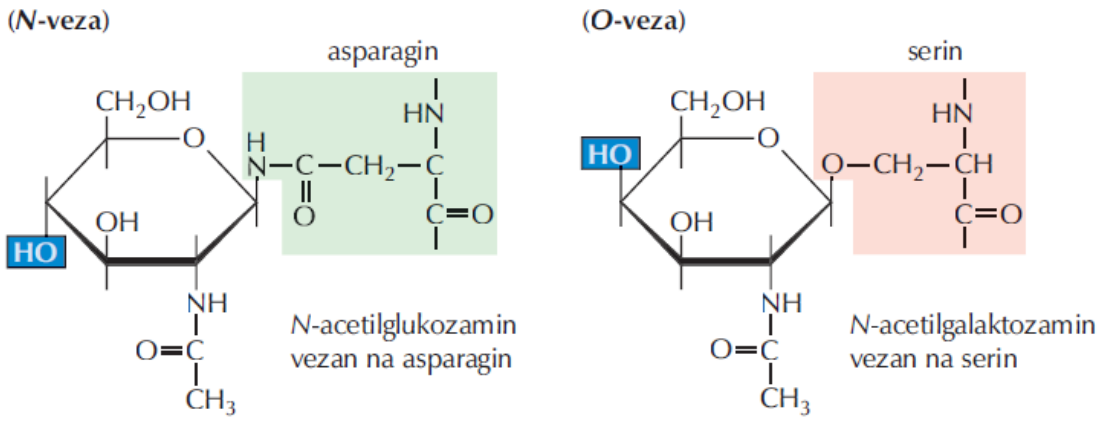
su fukoza, galaktoza, N-acetilgalaktozamin, glukoza, N-acetilglukozamin, glukuronska kiselina, manoza, sijalinska kiselina i ksiloza. Jednom vezani, monosaharidi mogu postati saharidni akceptori u jednoj od 49 mogućih glikozil-transferaznih reakcija prikazanih na Slici 1. Šećeri su međusobno vezani različitim alfa i beta glikozidnim vezama što dodatno povećava heterogenost ovih molekula (Ohtsubo i Marth, 2006).



Slika 1. *Prikaz mogućih glikozil-transferaznih reakcija* (preuzeto iz Ohtsubo i Marth, 2006).

Postoje dvije glavne reakcije modifikacije proteina: O- i N- glikozilacija, ovisno o aminokiselini na koju se veže šećerna struktura. N-vezani glikani nastaju vezanjem osnovnog oligosaharida, kojeg sačinjavaju dvije molekule N-acetilglukozamina, tri glukoze i devet manoza, na dušikov atom postraničnog lanca asparagina unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr, gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina. Reakcija završava daljnjom modifikacijom glikana u endoplazmatskom retikulumu, a potom i u Golgijevom aparatu (Lodish i sur.,

2004). O-vezani glikani nastaju vezanjem N-acetilgalaktozamina na kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Prilikom O-glikozilacije dodaje se jedan po jedan monosaharid, a nastali glikokonjugat obično ima kratke oligosaharidne lance, koji često sadrže između jednog i četiri šećerna ostatka (Lodish i sur., 2004).

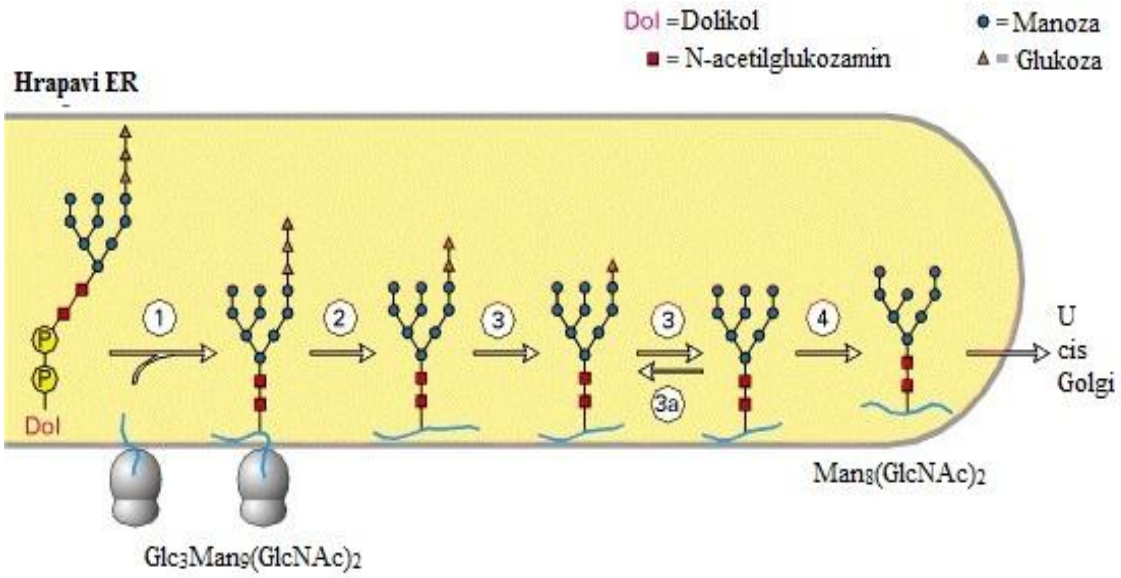


Slika 2. *Vrste glikoproteina: N-vezani i O-vezani* (preuzeto i modificirano iz Cooper i Hausman, 2004)

1.2.1. N-vezani glikani

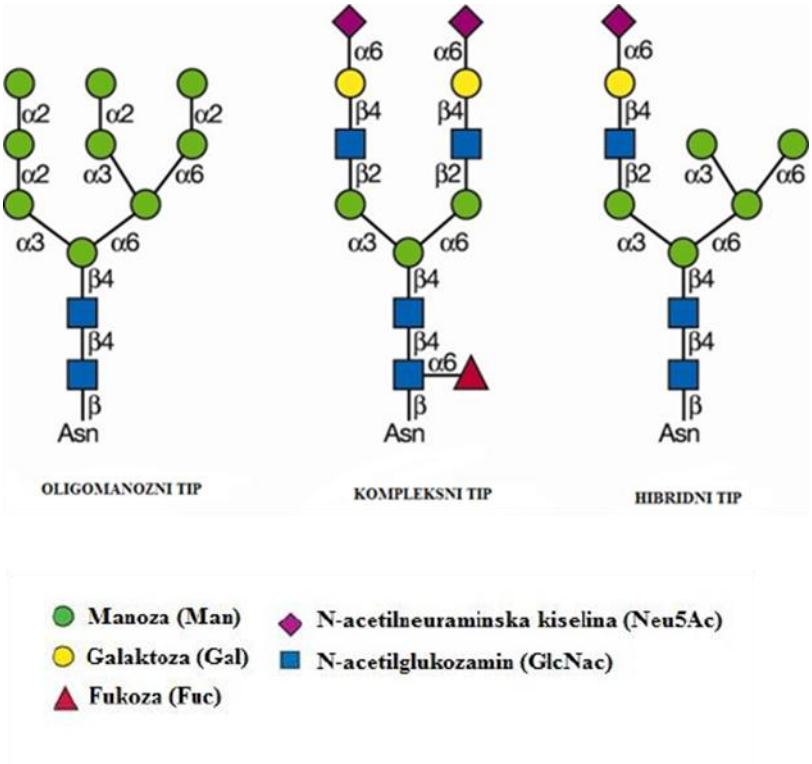
Biosinteza N-vezanih glikana započinje u lumenu hrapavog endoplazmatskog retikuluma kotranslacijskim dodavanjem velikog oligosaharidnog prekursora $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ na asparagin unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr. Ovaj oligosaharidni prekursor vezan je putem dva fosfata za lipidni nosač dolikol usidren u membranu endoplazmatskog retikuluma. Reakcija prijenosa oligosaharida katalizirana je oligosaharil-transferazom. Odvija se cijepanjem visokoenergetske esterske veze između fosfata i C-atoma šećera nakon čega slijedi vezanje GlcNAc za N-atom asparagina. Nakon N-glikozilacije proteina, slijedi daljnja modifikacija oligosaharidnog lanca u endoplazmatskom retikulumu, a potom i u Golgijevom aparatu. Modifikacija se odvija uz pomoć enzima, glukozil transferaze i glukozidaze, smještenih na membrani. U endoplazmatskom retikulumu dolazi do reakcija uklanjanja tri glukoze i jedne manoze, te re-glukozilacije koja ima važnu ulogu u pravilnom smatanju proteina. Samo proteini pravilne konformacije prelaze iz endoplazmatskog retikuluma u Golgijev aparat te dalje do stanične površine ili drugih destinacija sekrecijskim putem (Lodish i sur., 2004.). Ne događaju se na svim N-glikanima jednake modifikacije, no

svi membranski i sekretorni proteini sadrže istu oligosahardinu srž koju čine dva N-acetil glukozamina te tri manoze vezane na njih: Manα1–6(Manα1–3)Manβ1–4GlcNAcβ1–4GlcNAcβ1-Asn-X-Ser/Thr (Varki i sur., 2009).



Slika 3. *Vezanje oligosaharidnog prekursora za protein i njegove prve modifikacije u hrapavom endoplazmatskom retikulumu* (preuzeto i modificirano iz Lodish i sur., 2000)

Daljnjom modifikacijom oligosaharidnog lanca u Golgiju nastaju tri vrste N-vezanih glikana prikazanih na Slici 4; visoko-manozni, hibridni i kompleksni glikan. Kod visoko-manoznih glikana na oligosaharidnu vezano je između dvije i šest manoza. Hibridni glikani imaju dvije grane, jednu granu visoko-manoznog tipa koja sadrži isključivo manoze i drugu granu kompleksnoga tipa. Kompleksni glikani sadrže antene sastavljene od sijalinske kiseline, galaktoze i N-acetilglukozamina (Sun i sur., 2011).



Slika 4. *Tipovi N-vezanih glikana: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip* (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2009)

1.3. IMUNOGLOBULINI

Imunoglobulini, također poznati pod nazivom protutijela, su glikoproteini koje proizvode plazma stanice. Zbog specifičnog prepoznavanja i vezanja određenih antigena poput bakterija i virusa imaju vrlo važnu ulogu u imunosnom odgovoru. Imunoglobuline dijelimo u pet klasa (IgM, IgG, IgD, IgA i IgE) i subklase koje se međusobno razlikuju u veličini, naboju i aminokiselinskom slijedu konstantne regije teškog lanca te sadržaju glikana (Male i sur., 2009).

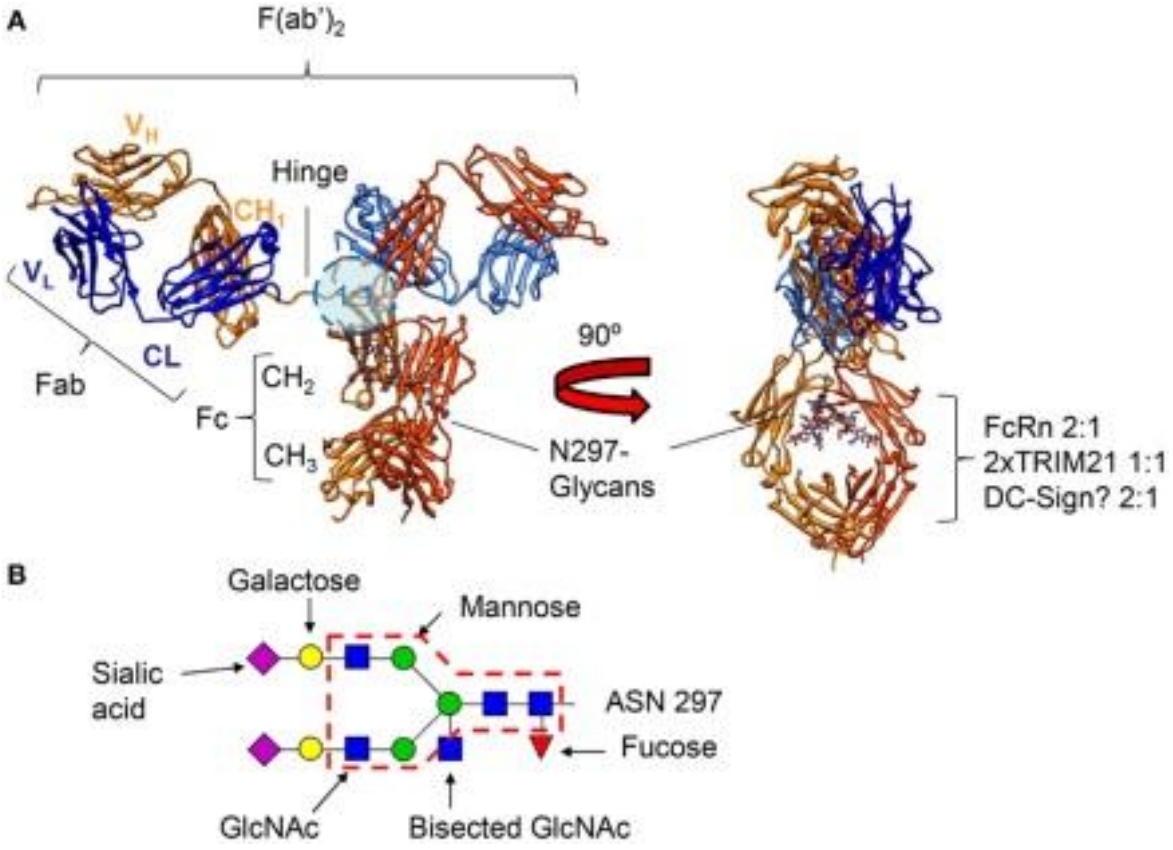
Imunoglobulini predstavljaju znatnu raznolikost u lokaciji i broju evolucijski očuvanih N-glikozilacijskih mjesta koji se nalaze u Fc i Fab regijama. Oligosaharidi vezani za imunoglobuline su multifunkcionalni i približne veličine 2 kDA. Oni omogućuju vezanje imunoglobulina za serumske lektine poput lektina MBL - *mannose binding lectin.* Navedeni oligosaharidi održavaju topljivost, konformaciju i efektorske funkcije imunoglobulina, tako što osiguravaju optimalno vezanje Fc regije za Fc receptore (Arnold i sur., 2007).

.

1.3.1. IgG

Od pet izotipa imunoglobulina, IgG je najzastupljeniji u ljudskom serumu čineći između 10 i 20% svih plazmatskih proteina. Četiri podrazreda imunoglobulina G (IgG_1, IgG_2, IgG_3, i IgG_4) međusobno se razlikuju u konstantnim regijama, naročito u zglobnoj i CH2 domeni, koje se vežu za Fc receptore te C1q. Zglobna regija predstavlja fleksibilnu vezu između Fab i Fc regije. Duljina i fleksibilnost regije utječu na moguće konformacijske odnose Fab i Fc regije. Upravo se takva strukturna različitost odražava na različite efektorske funkcije kod aktiviranja stanica sa Fcδ receptorima i sustava komplementa. Kao i svaki imumoglobulin, IgG je građen od dva laka (L) i dva teška (H) polipeptidna lanca, međusobno povezana disulfidnim vezama u zglobnoj regiji i nekovalentnim interakcijama između CH3 domena. Teški lanci sadrže N-terminalnu varijabilnu domenu (VH) i tri konstantne domene (CH1, CH2, CH3) od kojih su CH1 i CH2 međusobno povezane zglobnom regijom. Na sličan su način građeni i laki lanci. Oni se sastoje od jedne N-terminalne varijabilne (VL) i jedne konstantne (CL) domene. Ova četiri lanca tvore tri funkcionalne regije; dvije Fab regije i jednu Fc regiju, povezane zglobnom regijom. Fab regije čine laki lanci povezani s VH i CH1 domenama. Od tih domena samo se varijabilne domene vežu za antigen, pa za njih kažemo da su antigen specifične. Preostale CH2 i CH3 domene čine Fc regiju, koja se veže za Fc receptore na stanicama imunosnog sustava (Vidarsson i sur., 2014).

Svaki je imunoglobulin G glikoziliran na poziciji N297 unutar CH2 domene na teškom lancu, a srž vezanog glikana obuhvaća monosaharide N-acetilglukozamin i manozu. Fc N-glikani imaju dva ogranka koji mogu sadržavati dodanu galaktozu, sijalinska kiselinu, fukozu i račvajući N-acetilglukozamin. Visoko očuvani N297, prikazan na Slici 5, nalazi se između dviju CH2/CH3 domena formirajući Fc regiju IgG molekule. Ovaj je glikan odgovoran za male, ali značajne promjene kvarterne strukture Fc regije koje čine domenu vezanja FcγR dostupnijom. Također, ovi glikani direktno sudjeluju u vezanju FcγR te zbog toga mogu promijeniti navedene interkacije visoko specifičnim modifikacijama. Istraživanja sugeriraju da do ovih promjena dolazi tijekom specifičnog imunosnog odgovora kod ljudi. Uz gore navedeno mjesto N-glikozilacije, V regija 10-15% svih protutijela također je glikozilirana, što utječe na karakteristike vezanja antigena (Vidarsson i sur., 2014).



Slika 5. **A** - *Kristalna struktura humanog IgG$_1$ iz dva različita kuta. Mjesto vezanja FcγR označeno je svijetlo plavim krugom (donji dio zglobne regije i gornji dio CH2).* **B** - *Prikaz moguće strukture N-vezanog glikana* (preuzeto i modificirano iz Vidarsson i sur., 2014).

1.3.2.Vezanje Fc IgG za FcγR

Vezanje Fc regije IgG-a jedan je od primjera kako sastav glikana može utjecati na funkciju glikokonjugata. Glikani Fc regije potrebni su za optimalno vezanje protutijela za FcγR te za efektorske funkcije čija je zadaća eliminacija patogena. Vezanjem određenih monosaharida za glikansku strukturu IgG-a određuje se hoće li imunoglobulin biti proupalni ili protuupalni. Iz tog je razloga važno razumjeti povezanost strukture glikana i njene funkcije. Naročito zato što je taj proces jedan od segmenata regulacije primjerenog imunosnog odgovora (Dashivets i sur., 2015).

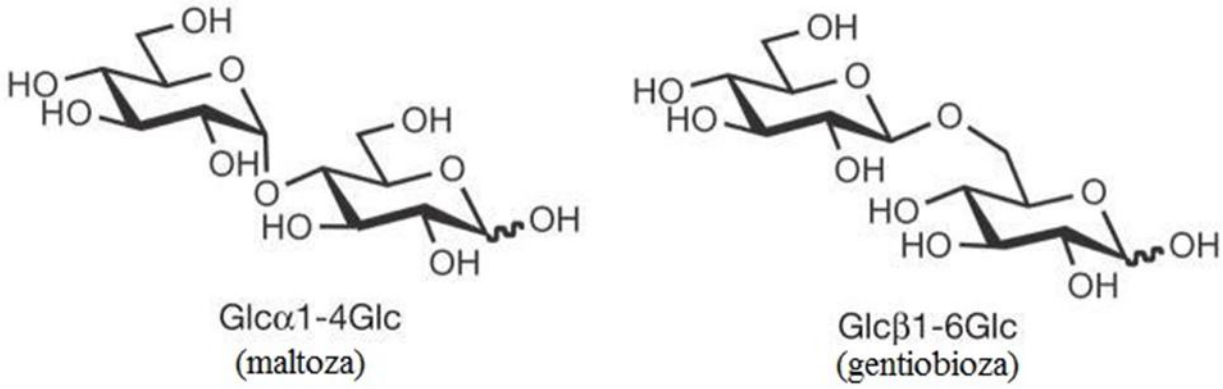
FcγR dijelimo u tri glavne grupe (I,II,III), od kojih se grupa II dijeli dalje na IIa, IIb i IIc, a grupa III na IIIa, IIIb. Navedeni receptori eksprimirani su na leukocitima, uključujući makrofage, eozinofile, *Natural Killer* stanice (nadalje NK stanice) i limfocite (Arnold i sur., 2007). Svi FcγR su aktivirajući, osim FcγRIIb. Vezanjem IgG-a ili Ig-Ag kompleksa za

aktivirajući receptor dolazi do induciranja aktivacije citotoksičnosti ovisne o protutijelu (u tekstu nadalje ADCC), fagocitoze, endocitoze, prezentiranja antigena i otpuštanja proupalnih medijatora. Suprotno, vezanjem za FcγRIIb dolazi do inhibicije aktivacije ostalih aktivirajućih receptora što dovodi do inhibicije aktiviranja efektorskih stanica. Upravo struktura glikana određuje afinitet protutijela za pojedini FcγR, a time i vezanje za različite FcγR razrede: aktivirajuće ili inhibirajuće. Na ovaj se način regulira ravnoteža između aktivirajućih i inhibitornih funkcija FcγR (Dashivets i sur., 2015).

Reakcija fukozilacije glikanske srži ima najveći utjecaj na vezanje protutijela za FcγR te je najvažniji parametar u slučaju povećane ADCC aktivacije (Dashivets i sur., 2015). Dodavanjem sržne fukoze dolazi do promijene konformacije Fc regije koja uvelike smanjuje mogućnost njenog vezanja za FcγRIIIa na NK stanicama. Vezanjem za FcγRIIIa, IgG uzrokuje aktivaciju citotoksičnosti ovisne o protijelu i uništavanje ciljne stanice. U prosjeku, 95% imunoglobulina G ima vezanu fukozu za N-acetilglukozamin, što sprječava pretjeranu i opasnu aktivaciju citotoksičnosti ovisne o protutijelu. Nedostatak regulacije ovog procesa može dovesti do autoimunih bolesti uzrokovane pretjeranom aktivacijom ADCC-a ili do karcinoma uzrokovanog nedovoljnom aktivacijom ADCC-a (Lauc i sur., 2014). Drugi takav primjer utjecaja strukture oligosaharida na funkciju protutijela jest dodavanje sijalinske kiseline na krajeve glikana. Vezanjem sijalinske kiseline proupalni imunoglobulin G postaje protuupalni medijator (Lauc i sur., 2014).

1.4. ANALIZA GLIKANA

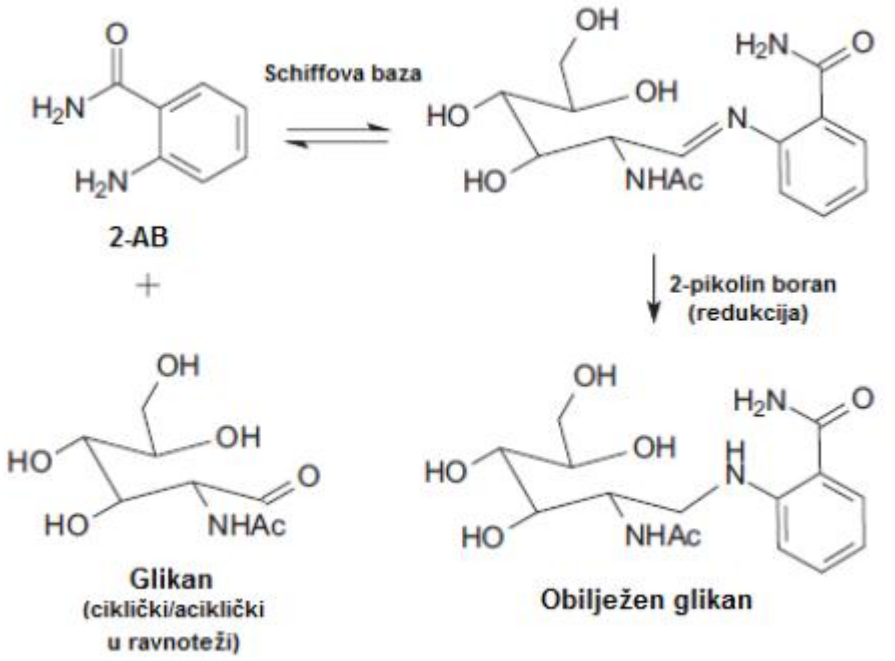
Značajnost analize glikana i potreba za njom očituje se u mikroheterogenosti glikoproteina. U nekim slučajevima glikani su jedini izvor različitosti između inače identičnih glikoproteina nastalih unutar iste stanice (Ohtsubo i Marth, 2006). Različitost karakteristika glikana uzrokovana je mogućnošću različitog međusobnog vezanja monosaharida koja dovodi do nastanka različitih izomera. Obzirom na konfiguraciju anomernog C-atoma monosaharida, poziciju te broj glikozidnih veza postoje brojne kombinacije međusobnog vezanja monosaharida. Ovisno o konfiguraciji asimetričnog ugljikovog atoma mogu nastati dva stereoizomera, alfa ili beta. Nadalje, postojanje više hidroksilnih grupa na jednom šećeru omogućuje stvaranje nekoliko regioizomera. Na primjer, dvije glukoze mogu biti vezane međusobno na nekoliko načina, što prikazuje Slika 6. Navedeni izomeri imaju veoma različite trodimenzionalne strukture i biološke aktivnosti. Također, monosaharid može stvarati više od jedne glikozidne veze te postati mjesto grananja strukture (Varki i sur., 2009).



Slika 6. *Izomeri maltoza i gentiobioza* (preuzeto i modificirano Varki i sur., 2009)

Hidrofilnost, složena struktura te mala količina analita otežavaju ispitivanje molekula stoga su za analizu ovih molekula potrebne vrlo osjetljive metode ispitivanja. Često treba kombinirati više tehnika ili modificirati već postojeće te napraviti pretpripremu uzorka koristeći enzime (Varki i sur., 2009). Zahvaljujući saznanju da varijacije u strukturi glikana imaju važnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji, analize glikana postaju prioritet današnjih istraživanja. Najčešće primjenjivane metode u analizi glikana su tekućinska kromatografija, kapilarna elektroforeza te masena spektrometrija (Huffman i sur., 2014).

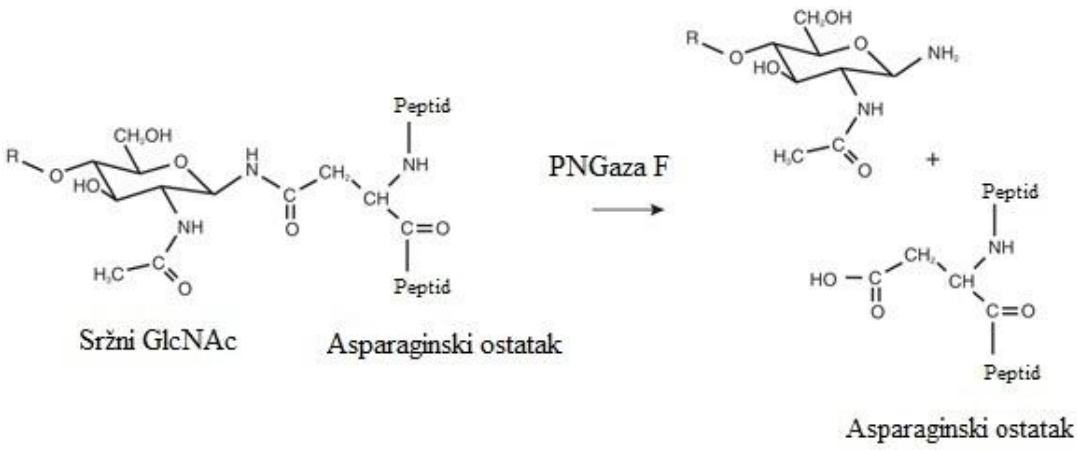
Kako bi se omogućila detekcija, glikani se obilježavaju fluoroforom ili kromoforom. U tekućinskoj kromatografiji u tu se svrhu najčešće upotrebljavaju 2-aminobenzamid i 2-aminobenzojeva kiselina. Vezanje spomenutih boja odvija se reakcijom reduktivne aminacije prikazane na Slici 7. Ova se reakcija odvija u dva koraka. U prvom, primarna amino skupina 2-aminobenzamida stupa u reakciju s aldehidnom skupinom glikana te nastaje nestabilna Shiffova baza. U drugom koraku nastala Shiffova baza reducira se reducirajućim agensom te nastaje stabilni sekundarni amin. Prednost ovakvog glikanskog obilježavanja jest stehiometrijski odnos u kojem se jedna molekula 2-aminobenzamida veže za jednu molekulu izoliranog glikana. Na taj način omogućuje se direktna kvantifikacija temeljena na intenzitetu fluorescencije (Ruhaak i sur., 2010).



Slika 7. *Prikaz reakcije reduktivne aminacije* (www.sigmaaldrich.com)

1.4.1. Analiza N-glikana

Za odvajanje šećerne strukture od proteina koristi se enzim PNGaza F, najučinkovitiji enzim za izoliranje gotovo svih N-vezanih oligosaharida. PNGaza djeluje na vezu između dušikovog atoma asparagina te ugljikovog atoma GlcNAc. Kako bi se uklonile steričke smetnje, odnosno povećala dostupnost enzima vezi, prethodno se protein denaturira uz pomoć natrijevog dodecil sulfata (nadalje SDS). Proces je prikazan na Slici 8 (www.neb.com).



Slika 8. *Prikaz produkata nastalih djelovanjem enzima PNGaza F* (preuzeto i modificirano www.sigmaaldrich.com)

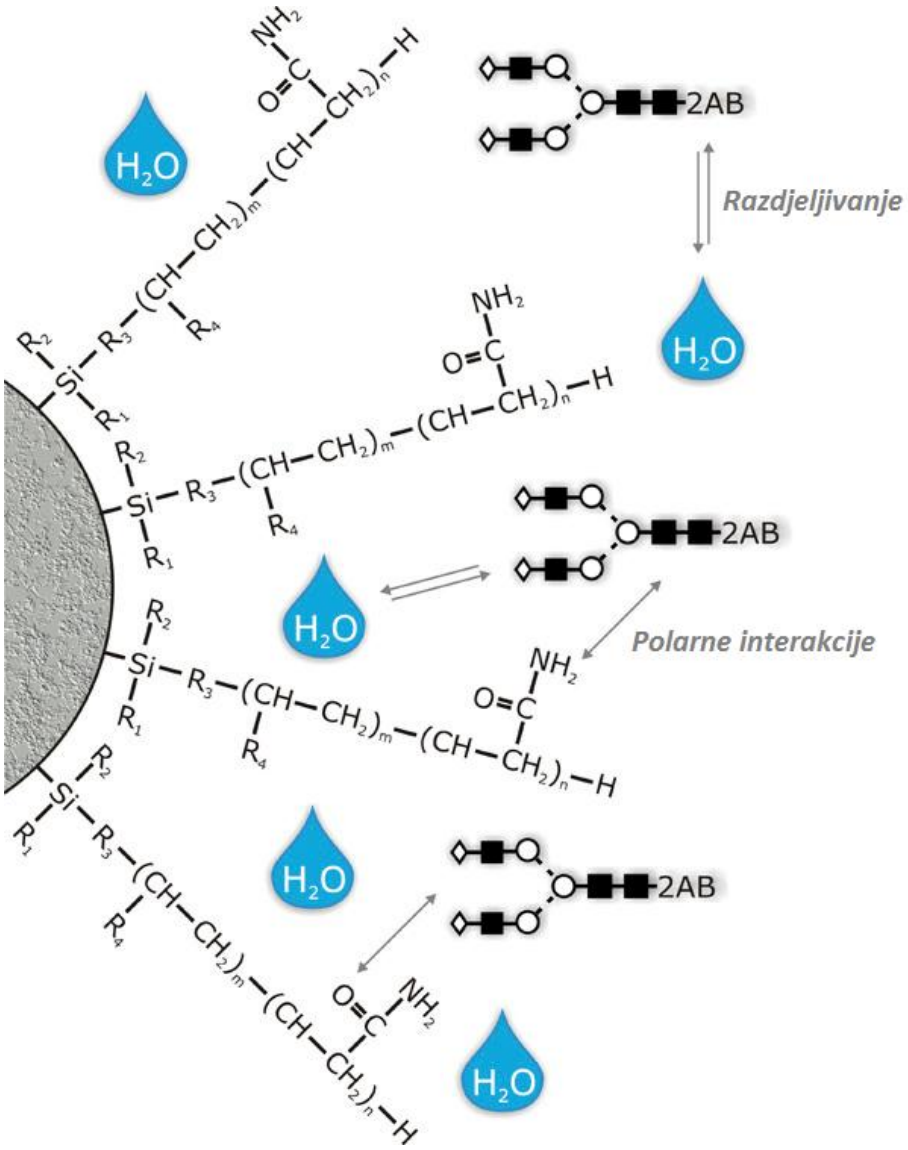
1.4.2. HILIC UPLC - Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama

HILIC-UPLC je razdjelna kromatografija koja se može opisati kao varijacija kromatografije normalnih faza. Stacionarna faza u HILIC kromatografiji je polarna, dok je mobilna faza organska s različitim udjelom hidrofilnog otapala u obliku vode. Ova metoda smatra se vrlo pogodnom za razdjeljivanje hidrofilnih analita jer ima poboljšanu sposobnost njihova razdvajanja zahvaljujući produljenom vremenu retencije (Appelblad i sur., 2008). Trenutna teorija predlaže da je zadržavanje u HILIC kromatografiji uzrokovano razdjeljivanjem polarnih analita između mobilne faze bogate organskim otapalom i vodom-bogatog sloja koji je adsorbiran na hidrofilnu stacionarnu fazu (Buszewski i Noga, 2011). Pritom su vodikove i dipol-dipol interakcije dominantni retencijski mehanizmi (Muller i sur., 2010). Što je analit hidrofilniji, njegova će ravnoteža biti više pomaknuta prema vodenom sloju, a analit će se dulje zadržavati (Buszewski i Noga, 2011).

Kada govorimo o analizi polarnih analita, HILIC kromatografija ima mnoge prednosti u odnosu na konvencionalne tekućinske kromatografije normalnih i obrnutih faza. Iako je kromatografija obrnutih faza vrlo česta tehnika razdvajanja analita, određeni analiti, naročito hidrofilni i polarni, nemaju dovoljno dugo vrijeme zadržavanja. U takvim slučajevima kao zamjena koristila se tekućinska kromatografija normalnih faza. Nedostatak ove metode jest sastav mobilne faze koju čine organska otapala koja su skupa, toksična i štetna za okoliš, a topljivost hidrofilnih analita u takvim otapalima je loša. Navedeni problemi kod

konvencionalnih kromatografija u HILIC kromatografiji riješeni su sastavom mobilne faze. Obično se kao mobilna faza u HILIC kromatografiji uzima otopina acetonitrila u vodi (Appelblad i sur., 2008). Zbog regulacije ionske jakosti i pH mobilne faze, u nju se najčešće dodaje amonij acetat ili amonij formijat (Buszewski i Noga, 2011).

U ovoj metodi, prikazanoj na Slici 9, dio mobilne faze u obliku vode postaje sastavni dio stacionarne faze. Iz tog je razloga potrebno minimalno 3% vode kako bi rezultati bili što bolji, odnosno kako bi se stacionarna faza dovoljno hidrirala (Appelblad i sur., 2008). Kao stacionarna faza u HILIC metodi može se koristiti bilo koja polarna stacionarna faza. Obično je to ili čisti silika gel, ili silika gel modificiran polarnim funkcionalnim skupinama. Na primjer amidne i amino skupine (Buszewski i Noga, 2011). Eluacija glikana s kolone postiže se gradijentnim povećanjem udjela vode u mobilnoj fazi čime se postiže njena veća hidrofilnost (Boersema i sur., 2008).



Slika 9. *Retencijski mehanizmi u HILIC kromatografiji* (preuzeto i modificirano iz Muller i sur., 2010)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Danas se sve veći broj istraživanja provodi u području glikobiologije. Glikani, kao strukturni dio glikoproteina, pokazali su se od iznimne važnosti za njihovu funkciju i pravilnu strukturu. Na taj način postali su vrlo važan segment fiziologije i patofiziologije. Istraživanja su pokazala uključenost glikana u razna područja popout ontogeneze, imunologije, neurobiologije, hematologije i metabolizma te njihovu povezanost s genetskim bolestima (Ohtsubo i Marth, 2006). Saznanja o povezanosti glikana i bolesti sve su veća, a time raste i potreba za novim istraživanjima. Može se pretpostaviti da se neki glikani u tijelu javljaju u manjim količinama, ali obavljaju važne biološke funkcije.

U posljednje je vrijeme razvijeno nekoliko metoda visokoprotočne analize glikana. Kao jedna od metoda analize glikana vrlo često se primjenjuje HILIC-UPLC. S obzirom na to da glikani nisu vidljivi u UV-VIS području, njihova analiza zahtijeva fluorescentno obilježavanje kako bi se omogućila detekcija. Stoga je važan dio razvoja metoda za analizu glikana i njihovo obilježavanje kako bi se omogućila što osjetljivija identifikacija i što reproducibilnija kvantifikacija. Zbog toga smo u ovom radu ispitivali prokainamid kao potencijalnu boju za fluorescentno obilježavanje glikana u odnosu na najčešće korišteni 2-aminobenzamid.

Specifični ciljevi ovog rada su :

-uzorke izoliranih N-glikana IgG-a obilježiti fluorescentnom bojom 2-aminobenzamidom

-uzorke izoliranih N-glikana IgG-a obilježiti fluorescentnom bojom prokainamidom

-obilježene uzorke glikana analizirati pomoću HILIC-UPLCa

-usporediti glikanske profile, reproducibilnost i osjetljivost metoda

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Anorganske kemikalije

Tablica 1. Anorganske kemikalije

Kemikalija	**Proizvođač**
Dinatrij hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Kalij-klorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Klorovodična kiselina (HCl)	Kemika
Natrij klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Amonij bikarbonat (NH_4HCO_3)	Sigma-Aldrich

3.1.2.Organske kemikalije

Tablica 2. Organske kemikalije

Kemikalija	**Proizvođač**
Acetonitril (ACN)	Fluka
2-aminobenzamid (2AB)	Sigma-Aldrich
2-pikolin boran (2PB)	Sigma-Aldrich
Etanol (C_2H_5OH)	Sigma Aldrich
Ledena octena kiselina (CH_3COOH)	Merck
DMSO (dimetilsulfoksid)	Fluka
SDS (natrij-dodecil sulfat) detergent	Sigma
NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol) detergent	Sigma
Prokainamid (ProA)	Sigma Aldrich

3.1.3. Biološke kemikalije

Tablica 3. Biološke kemikalije

Kemikalija	**Proizvođač**
PNGazaF (peptid-N-glikozidaza)	Prozyme

3.1.4. Otopine i puferi

Tablica 4. Otopine i puferi

Kemikalija	**Proizvođač**
1,33% SDS	1,33 g SDS-a (Natrijevog dodecil sulfata) otopiti u 100 ml vode
30% octena kiselina u DMSO	Za 10 ml otopine: u 3 ml octene kiseline doda se 7 ml dimetilsulfoksida (DMSO)
96% acetonitril	Za 250 ml otopine: dodaje se 240 ml ACN-a i 10 ml H_2O, voda se dodaje zbog hidrofilnosti kolone u daljnjoj analizi glikana (HILIC)
otopina za označavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 µl 30% octene kiseline u DMSO dodaje se 0,48 mg 2 aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana
5xPBS	Za 200 ml pufera: 8,00 g NaCl, 1,38 g Na_2HPO_4, 0,29 g KH_2PO_4, 0,19 g KCl → sve otopiti u 200 ml ultračiste vode (miliQ H_2O) (nakon miješanja otopinu filtrirati i podesiti pH s NaOH)

3.1.5 Laboratorijska oprema i pribor

Tablica 5. Oprema i pribor

Oprema i pribor	Proizvođač
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 2 ml zapremnine, za 96 uzoraka	Waters
Pločice za pročišćavanje glikana	Orochem
AcroPrep 96 GHP 0,2 μm filter pločica od 1 ml	Pall
PCR pločice	Frame Star
Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Ranin
Vacuum manifold – vakumska pumpa	Pall Corporation
Tresilica	IKA - Schüttler MTS 4
Bio Vortex V1	Biosan
Centrifuga	Centifuge 5804 Eppendorf
Vaga	Metller Toledo
Waters Acquity UPLC kromatograf	Waters, Milford
NanoAcquity UPLC analizator	Waters, Milford

3.2. UZORAK

Kao uzorak za ovu analizu koristio se komercijalni Sigma-Aldrich IgG, ≥95% liofilizirani prašak. Količina IgG-a u otopljenom prašku dodatno je potvrđena UV-VIS spektrometrijom. Otapanjem praška u vodi priređuje se ishodna otopina, koja se potom koristi za daljnje priređivanje otopina IgG-a različitih koncentracija (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 i 500 μg). Ovih se 11 otopina različitih koncentracija izrađuje u triplikatu. Iz ovih se otopina odpipetira volumen u kojem se nalazi potrebna masa IgG-a u mikrotitarsku pločicu, a voda se ukloni sušenjem.

3.3. PROTOKOL PRIPREME UZORKA

3.3.1. Izolacija N-glikana s imunoglobulina G

Prvi korak u analizi N-glikana je deglikozilacija imunoglobulina G. Kako bi izolirali N-glikane od IgG-a prethodno je potrebno denaturirati protein. Upravo time uklanjaju se steričke smetnje koje bi mogle ometati pristup enzimu PNG-aza F koji specifično kida vezu između N-glikana i proteina.

3.3.1.1. Priprema uzorka

Obzirom da uzorak nije bio plazma niti serum, nije trebalo raditi nikakve pretpripreme uzorka već je pločicu s prethodno nanesenim uzorcima IgG-a samo trebalo izvaditi iz zamrzivača.

3.3.1.2. Denaturacija proteina

U svaku se jažicu dodaje 30 µL 1,33% SDS-a te se uzorak promiješa uvlačenjem u nastavak pipete. Potom slijedi inkubacija. Pločice se zatvore adhezivnom folijom i ostave inkubirati 10 min pri 65 °C, nakon čega slijedi hlađenje pri sobnoj temperaturi 30 minuta. Kada su se uzorci ohladili dodaje se 10 µL 4%-tnog Igepala uz ponovno miješanje uzorka uvlačenjem u nastavak pipete. Pločice se zatim stavljaju na tresilicu 15 minuta.

3.3.1.3. Deglikozilacija

Prije no što je uzorak spreman za dodavanje enzima, enzimska se smjesa priprema miješanjem 10 µL 5xPBS s 0,12 µL PNGaze F za svaki uzorak. Kako bi se osigurala točnost mjerenja prije pipetiranja PNGaza F se promiješa u centrifugi te se u smjesu enzima dodaje dodatnih 30 µL 5xPBS-a. U svaki se uzorak dodaje 10 µL pripravljene smjese enzima te resuspendira uvlačenjem u nastavak pipete. Pločice se prekriju adhezivnom folijom te inkubiraju na 37 °C 18 sati.

3.3.2. Označavanje, pročišćavanje i eluacija N-glikana

Kako bi pripremili uzorak za analizu, potrebno je pročistiti deglikozilirane N-glikane od proteina i drugih molekula te ih označiti fluorescentnim bojama. U ovom slučaju koristile su se boje 2-aminobenzamid i prokainamid. Vezanje boje na izolirani N-glikan odvija se

reakcijom reduktivne aminacije u kiselim uvjetima s reducirajućim agensom 2-pikolinboran uz DMSO.

3.3.2.1. Priprema otopine 2-AB i ProA za označavanje

Otopina za fluorescentno označavanje priprema se u digestoru dodavanjem 25 µL 30%-tne octene kiseline u DMSO, 0,48 mg 2-aminobenzamida te 1,12 mg 2-pikolinborana po uzorku. Prilikom dodavanja krutih sastojaka, važno je smjesu miješati na Vortexu kako bi osigurali njihovo otapanje.

Otopina prokainamida za fluorescentno označavanje priprema se na jednak način kao i otopina 2-aminobenzamida. Masa prokainamida dodana octenoj kiselini u DMSO i 2-pikolinboranu iznosi 1,08 mg po uzorku.

3.3.2.2. Označavanje N-glikana

U svaki se uzorak dodaje 25 µL otopine za označavanje i zatim se uzorak promiješa uvlačenjem u nastavak pipete. Pločice se prekriju adhezivnom folijom te ostave na treskalici 10 minuta. Nakon što su se zagrijavale 2 sata na 65 °C , pločice hlade 30 minuta pri sobnoj temperaturi kako bi uzorak bio spreman za nanošenje na prethodno pripremljene GHP pločice. GHP pločice sadrže 96 jažica s hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,2 µm, na koju se vežu glikani (1 ml AcroPrep GHP 0,2 µL filtarske pločice).

3.3.2.3. Prekondicioniranje GHP pločica

Prekondicioniranje GHP pločica podrazumijeva njihovo ispiranje uz pomoć vakuum pumpe. Prvo se propušta 200 µL svježe pripravljenog 70%-tnog etanola kroz svaku jažicu, zatim 200 µL ultra čiste vode te 200 µL svježe pripremljenog 96%-tnog acetonitrila prethodno ohlađenog na 4 °C. Pritom treba paziti da tlak pumpe ne prelazi 2 inHg kako se ne bi oštetila membrana. Nakon što je GHP pločica pripremljena slijedi nanošenje uzoraka.

3.3.2.4. Nanošenje i pročišćavanje označenih N-glikana

Svakom se uzorku dodaje 700 µL hladnog 100%-tnog acetonitrila pomoću multikanalne pipete. Potom se uzorak miješa pipetiranjem te koristeći iste nastavke prenose se ukupni volumeni uzoraka (oko 800 µL) u pripadajuće jažice na GHP pločici. Slijedi inkubacija u trajanju 2 minute te uklanjanje preostale tekućine uz pomoć vakumske pumpe.

Kod nanošenja uzorka važno je promijeniti nastavak za svaki uzorak kako ne bi došlo do kroskontaminacije.

Pročišćavanje se provodi uzastopnim dodavanjem 200µL svježe pripravljenog 96%-tnog acetonitrila prethodno ohlađenog na 4°C. Pritom je pločica priključena na vakumsku pumpu kako bi se ubrzalo uklanjanje agensa. Postupak se ponavlja četiri puta. Nakon zadnjeg ispiranja pločica se postavi na 2 ml pločicu za sakupljanje uzoraka te ponovno nanese 200 µl 96%-tnog acetonitrila u svaku jažicu. Kada se uklonio 96%-tni ACN, GHP pločica se stavi na centrifugiranje 5 min na 1000 okretaja/min.

3.3.2.5. Eluiranje N-glikana s GHP pločice

Prvo se GHP pločica postavi na čistu ABgene PCR pločicu za sakupljanje uzoraka. Potom se doda 90 µL ultra čiste vode u svaki uzorak te miješa na tresilici 15min. Nakon toga slijedi centrifugiranje GHP pločice, zajedno s PCR pločicom 5 min na 1000 okretaja/min kako bi se sakupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Postupak se ponovi još jednom, nakon čega se provjerava je li sadržaj eluirao, pritom pazeći da nema zaostalih kapljica na GHP pločici te da je volumen sakupljenog eluata u svakoj jažici 180 µl. Provjerene PCR jažice dobro zatvorimo PCR čepićima te pločicu stavimo u zamrzivač.

3.4. ANALIZA UZORAKA

Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvojeni su kromatografijom hidrofilnih interakcija na Waters Acquity UPLC instrumentu (Milford, MA, USA), koji se sastoji od kvaternarne jedinice za pripravu mobilne faze, automatskog injektora uzoraka i fluorescentnog detektora, koji je namješten na valnu duljinu od 250 nm za ekscitaciju i valnu duljinu od 428 nm za emisiju za glikane obilježene 2-aminobenzamidom te na 310 nm za ekscitaciju i valnu duljinu od 370 nm za emisiju za glikane obilježene prokainamidom . Uređaj je bio kontroliran programom Empower 2, 2145 verzija (Waters, Milford, MA, USA). Obilježeni N-glikani razdvojeni su na Waters BEH koloni za kromatografiju glikana, dimenzija 100 x 2.1 mm, koja je punjena česticama veličine 1.7 µm (karakteristično za UPLC analizu), sa 100 mM formijatne kiseline podešene na pH 4.4, koja je upotrijebljena kao otapalo A, te s acetonitrilom, upotrijebljenim kao otapalo B. Uvjeti analize su bili sljedeći: linearni gradijent acetonitrila od 75-62 % s brzinom protoka 0.4 ml/min, tijekom 25 min. Uzorci su se prije injektiranja držali na 10ºC, a temperatura na kojoj se analiza odvijala bila je

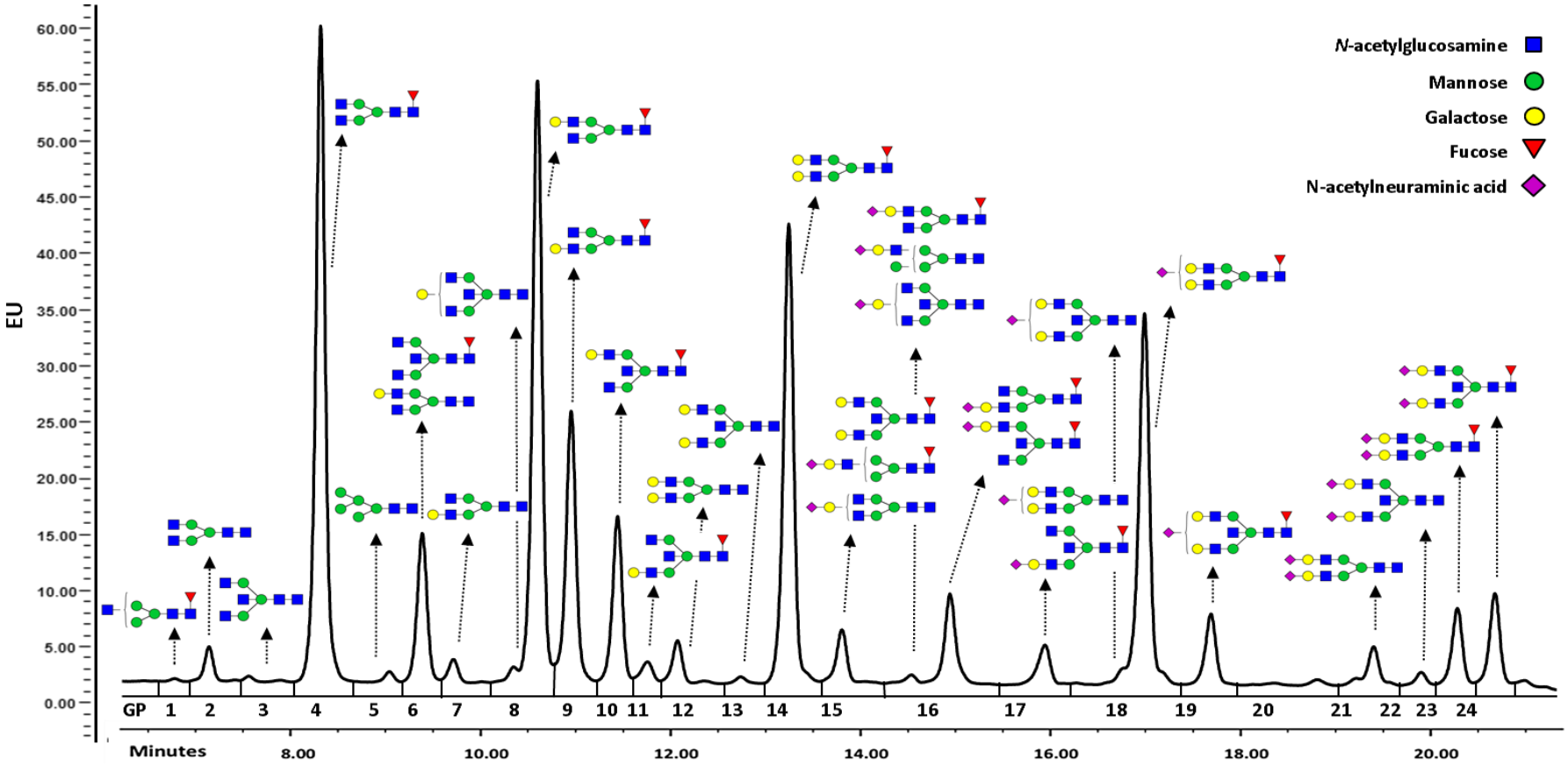
60 ºC. Sustav je kalibriran upotrebom vanjskog standarda plasma pool-a te hidroliziranih i s 2-AB obilježenih oligomera glukoze (dekstrana), prema kojima se vremena zadržavanja pojedinih glikana prevode u glukozne jedinice. Glikani su analizirani na temelju njihovih mjesta ispiranja i mjereni u jedinicama glukoze.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Validacija analitičkog postupka provodi se pri razvoju i uvođenju nove metode ili pri promjeni bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode. U ovom slučaju razlog validacije jest promjena fluorescentnog obilježivača u svrhu poboljšanja već postojeće metode. Analitički parametri određeni u ovoj analizi su preciznost, osjetljivost i područje kvantifikacije N-glikana obilježenih 2-aminobenzamidom i prokainamidom. Uvjeti analize glikana pri kojima se metoda validirala opisani su u poglavlju 3.4. U svrhu procjenjivanja rezultata analize glikana obilježenih prokainamidom, za usporedbu se koristi vrlo često primjenjivani fluorofor; 2-aminobenzamid.

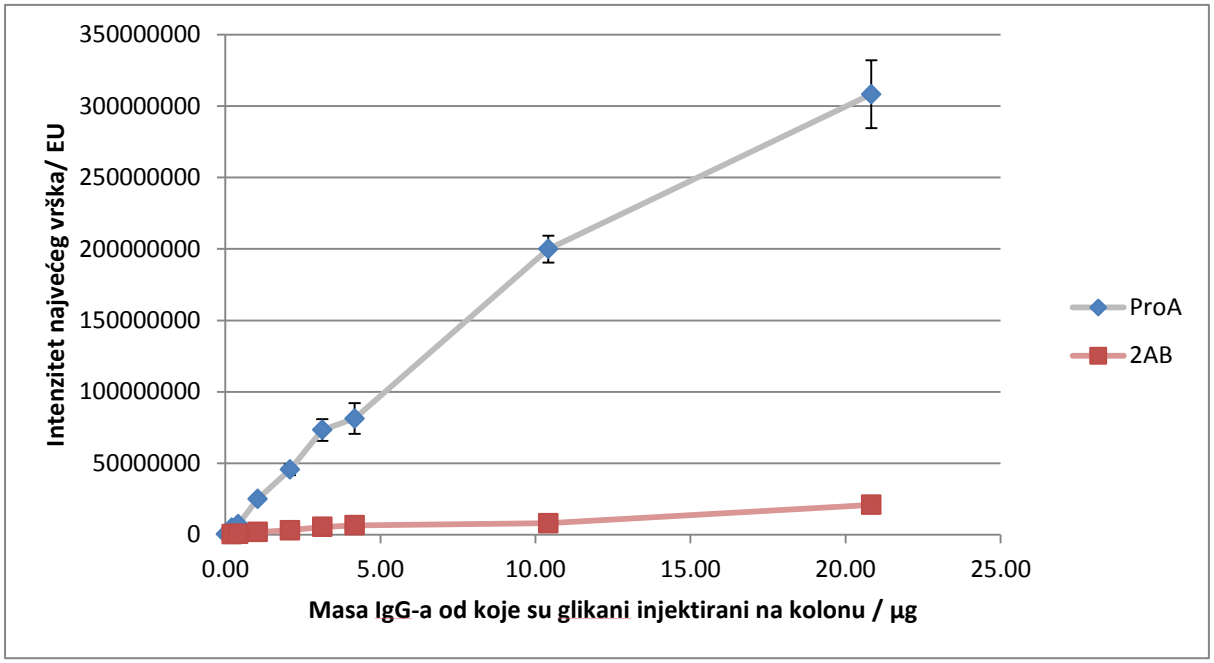
Početne otopine standardnog IgG-a izrađene su u triplikatu kako bi se ispitala preciznost. Iz uzorka standardnog IgG-a izolirani su N-glikani te potom obilježeni fluorescentnim bojama. Obilježeni N-glikani razdvojeni su HILIC-UPLC metodom. Dobiveni kromatogram podijeljen je u 24 glikanska kromatografska vrška (GP1-GP24), pri čemu svaki vršak predstavlja jedan ili više glikana čija je struktura prethodno određena masenom spektrometrijom kao što prikazuje Slika 10. Obje boje dale su vrlo sličan profil glikana s 24 vrška što dokazuje dosljednost glikanskog profila. Glikani su eluirali u različitim vremenima, ovisno o polarnosti strukture. Prvo eluiraju manje, a zatim više hidrofilne molekule. Glikani koji sadrže sijalinsku kiselinu su nabijeni te eluiraju posljednji.

Nakon analize integrirane su površine ispod vršaka kromatograma. Dobivene apsolutne površine su se zbrojile i iz njih su izračunate relativne površine. Ovi podaci potrebni su u daljnjoj analizi rezultata ispitivanja kako bi se usporedilo linearno područje, osjetljivost i preciznost određivanja glikana ovim bojama te kako bi se procijenila primjenjivost ovih boja u relativnoj kvantifikaciji.



Slika 10. *Profil N-glikana nakon analize HILIC-UPLC-om. Kromatogram je podijeljen na 24 vrška te prikazuje strukture zastupljenje u svakom od njih.*

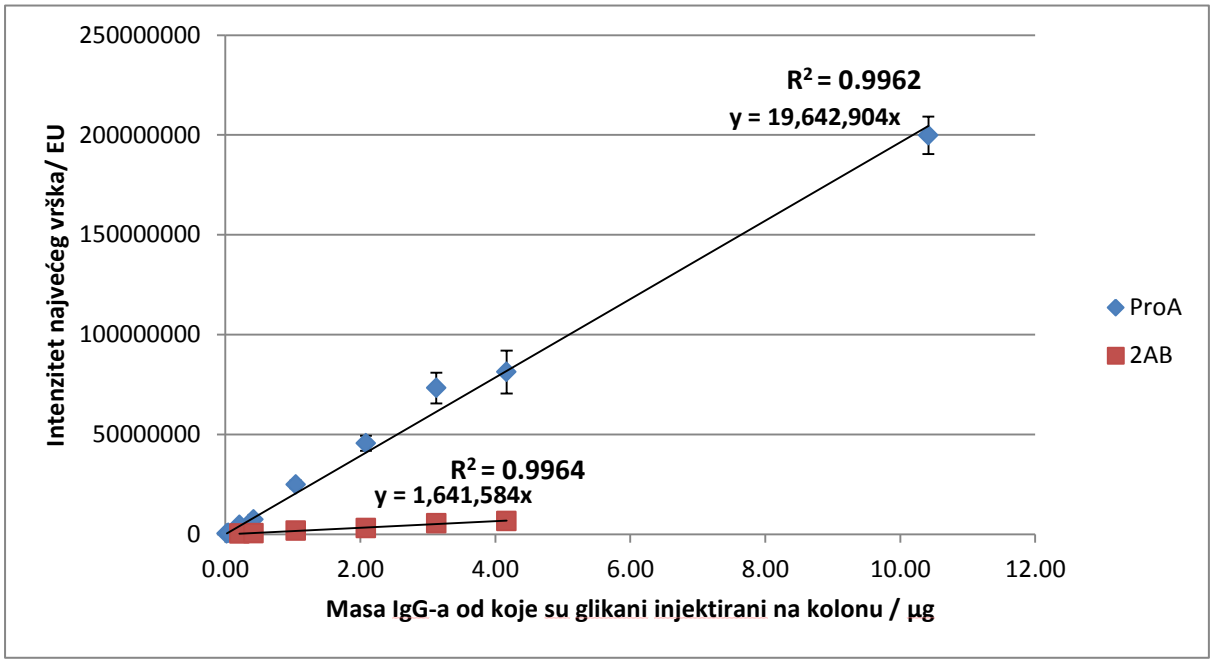
4.1. OSJETLJIVOST I LINEARNO PODRUČJE



Graf 1. *Intetnzitet fluorescencije najvećeg vrška GP4 koji predstavlja biantenarni glikan sa sržnom fukozom u ovisnosti o masi IgG-a od koje su glikani injektirani na kolonu*

Kako bi se ispitala osjetljivost analize obilježenih glikana, promatra se koja je najmanja količina glikana kod koje će se javiti zadovoljavajući signal. Obilježavanjem glikana s prokainamidom mogu se detektirati niže razine glikana - već kod 0,5 µg početne mase IgG-a. Graf 1 prikazuje intenzitet najvećeg vrška u odnosu na masu IgG-a od koje su glikani injektirani na kolonu. Plava linija predstavlja rezultate dobivene analizom N-glikana obilježenih prokainamidom, a crvena rezultate dobivene analizom N-glikana obilježenih 2-aminobenzamidom. Iz grafa je vidljivo kako je intenzitet najvećeg vrška kod svake vrijednosti mase IgG-a obilježenih prokainamidom veći u odnosu na one obilježene 2-aminobenzamidom. Kako bi dobili točan omjer intenziteta fluorescencije dvaju fluorofora potrebno je odrediti linearno područje koje predstavlja područje unutar kojeg će intenzitet rasti proporcionalno količini glikana. Upravo je to područje – područje pouzdane kvantifikacije. Kod 2-aminobenzamida ono se kreće od 5 do 100 µg početne mase IgG-a, odnosno 0,02 – 10,42 µg mase IgG-a od koje su glikani injektirani na kolonu. Kod prokainamida područje pouzdane kvantifikacije je veće i kreće se od 0,5 do 250 µg početne mase IgG-a, odnosno 0,21 – 4,17 µg mase IgG-a od koje su glikani injektirani na kolonu. Iz Grafa 2 proizlazi da prokainamid ima veće linearno područje od 2-aminobenzaimda, odnosno

veći raspon pouzdane kvantifikacije N-glikana. Stavljanjem u omjer nagibe pravaca proizlazi kako prokainamid ima i 12x veći intenzitet fluorescencije u odnosu na 2-aminobenzamid.



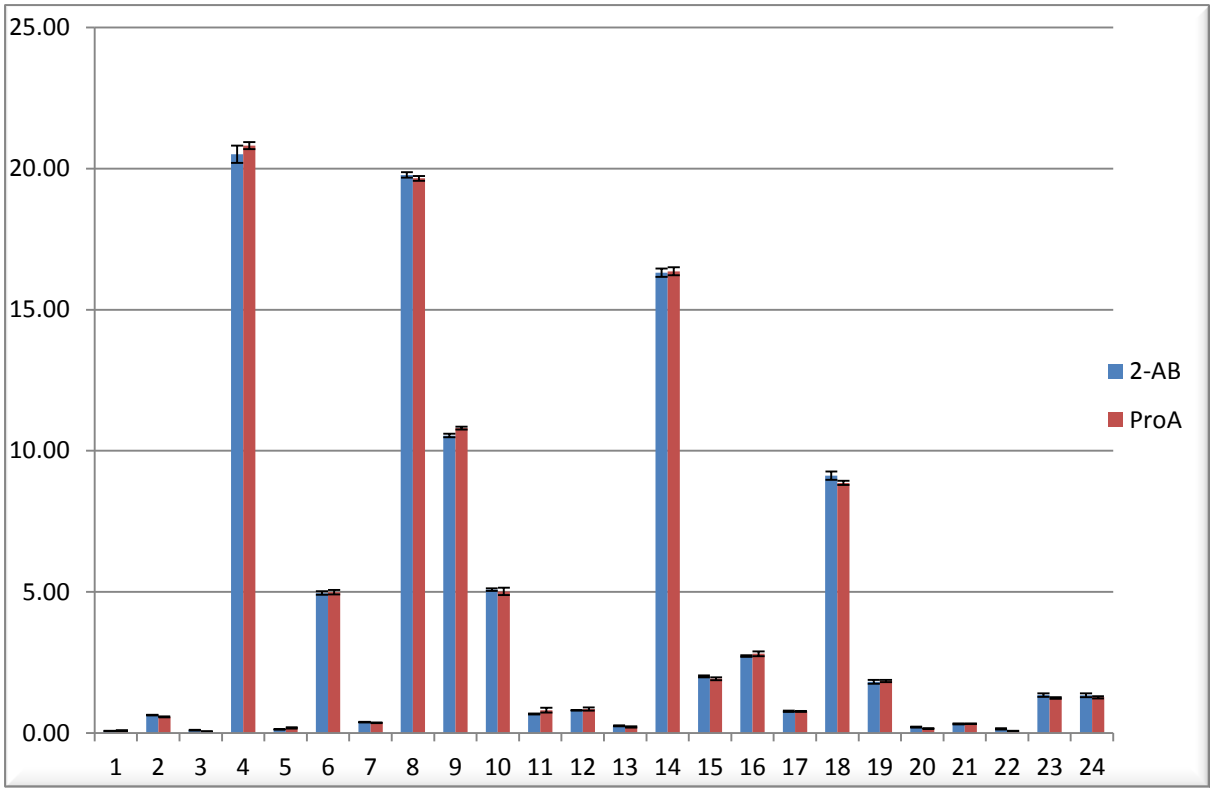
Graf 2. *Prikaz linearnog područja*

4.2. OPTIMALNI RASPON RELATIVNE KVANTIFIKACIJE I PRECIZNOST

Tablica 6. Prikaz vrijednosti relativne standardne devijacije za svaki pojedini vršak glikana označenih fluoroforima. Za svaku je boju prikazna relativna standardna devijacija optimalnih raspona početnih masa IgG-a: 2-AB (25-500 µg) i ProA (5-500 µg). AVG predstavlja prosječnu standardnu devijaciju za svaku boju.

CV	2-AB (25-500µg)	ProA (5-500µg)
GP1	7.9%	21.2%
GP2	2.4%	3.3%
GP3	9.9%	45.1%
GP4	1.5%	0.6%
GP5	4.9%	12.1%
GP6	1.3%	1.5%
GP7	3.2%	2.7%
GP8	0.5%	0.4%
GP9	0.6%	0.5%
GP10	0.9%	2.6%
GP11	2.0%	10.7%
GP12	1.7%	7.1%
GP13	6.3%	10.8%
GP14	0.9%	0.9%
GP15	1.7%	2.7%
GP16	1.0%	3.0%
GP17	3.1%	2.0%
GP18	1.6%	0.8%
GP19	3.7%	2.1%
GP20	6.9%	5.3%
GP21	5.6%	2.7%
GP22	14.2%	11.8%
GP23	4.5%	2.6%
GP24	5.1%	3.3%
AVG	**3.8%**	**6.5%**

Zbog gubitaka glikana koji nisu uvijek jednaki prilikom izvođenja analize, ovom se metodom ne može provoditi pouzdana apsolutna kvantifikacija, ali je metoda dovoljno pouzdana za relativnu kvantifikaciju. Iako je optimalno područje detekcije glikana označenih prokainamidom veće, prosjek relativnih standardnih devijacija 2-aminobenzamida (AVG=3,8%) je manji što znači da su rezultati dobiveni označavanjem N-glikana 2-aminobenzamidom preciziniji.



Graf 3. *Visina stupca predstavlja srednju vrijednost relativnih površina pikova, a barovi predstavljaju njihove standardne devijacije.*

Graf 3 prikazuje odnose relativnih površina vršaka i njihove relativne standardne devijacije čijom se interpretacijom može zaključiti o relativnoj kvantifikaciji ovih boja. S obje boje dobili su se usporedivi glikanski profili. Za svaki se vršak dobila slična vrijednost relativnih površina i standardnih devijacija što znači da je prokainamid, kao i 2-aminobenzamid, primjenjiv u relativnoj kvantifikaciji.

Iako ima veću osjetljivost, niži limit kvantifikacije i veće optimalno područje preciznosti, prokainamid ima nešto veći prosjek relativne standardne devijacije (6,5%) u odnosu na 2-aminobenzamid (3,8%), no to ne ometa pouzdanost kvantifikacije.

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je relativna kvantifikacija pouzdana i reproducibilna pri profiliranju glikana izoliranih iz 1 µg IgG-a (potrebna početna masa za metodu je 25 µg), ako su obilježeni 2-aminobenzamidom. U slučaju kada su obilježeni prokainamidom, kvantifikacija je pouzdana i reproducibilna pri profiliranju glikana izoliranih iz 0,2 µg IgG-a (potrebna početna masa za metodu je 5 µg). Zahvaljujući većoj osjetljivosti, prokainamid omogućuje detekciju i relativnu kvantifikaciju manjih količina glikana. Usprkos nešto manjoj preciznosti, prokainamid se može primjenjivati u relativnoj kvantifikaciji N-glikana. Zbog nedovoljne istraženosti mogućih problema i dosadašnjih pozitivnih rezultata, korištenje prokainamida kao fluorescentnog obilježivača zahtjeva daljnje istraživanje.

6. LITERATURA

Appelblad P, Jonsson T, Pontén E, Viklund C, Jiang W. A practical guide to HILIC. Umeå, Merck SeQuant AB, 2014, str. 3-13.

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

Boersema JP, Mohammed S, Heck AJR. Hydrophilic interaction liquid chromatography in proteomics. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391, 151-159.

Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402, 231-247.

Cooper G, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. Zagreb,Medicinska naklada, 2004, str. 305-307.

Dashivets T, Thomann M, Rueger P, Knaupp A, Buchner J i sur. Multi-Angle Effector Function Analysis of Human Monoclonal IgG Glycovariants. *PLoS One*, 2015, 10.

Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MH i sur. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13, 1598-1610.

Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans – the third revolution in evolution. *Front Genet*, 2014, 5, 145.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A. Molecular Cell Biology. New York, W. H. Freeman, 2004, str. 594-596.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D i sur. Molecular Cell Biology. New York, W. H. Freeman, 2000.

Male D., Brostoff J, Roth D, Roitt I. Immunology, Canada, Elsevier, 2006, str. 59

Muller Y, Darsow K, Bartel S, Lange H. Glycosylation Analysis by Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)-N-Glyco Mapping of The ZP-Domain of Murine TGFR-3. 2010, http://www.chromatographyonline.com pristupljeno 2.5.2017.

Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126, 855-867.

Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM i sur. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 3457-3481.

Structure, function and importance of carbohydrates. https://www.neb.com/ pristupljeno 20.04.2017.

Sun Q, Zhao L, Song Q, Wang Z, Qiu X i sur. Hybrid- and complex-type N-glycans are not essential for Newcastle disease virus infection and fusion of host cells. *Glycobiology*, 2012, 22, 369-378.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P i sur. Essentials of Glycobiology. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2009.

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immun*, 2014, 5, 520.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

Ovaj se rad bavi validacijom HILIC-UPLC metode u svrhu analize N-glikana. Glikozilacija je modifikacija proteina od esencijalne važnosti za njihovu strukturu i funkciju. Zahvaljujući ovom saznanju te shvaćanjem da glikozilacija ima veoma važnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji, analiza glikana se sve više uključuje u biološka istraživanja, kliničke analize te u farmaceutskoj proizvodnji. Brojne analitičke metode su se razvile u svrhu ispitivanja glikana. Jedna od metoda jest HILIC-UPLC analiza izoliranih i fluorescentno obilježenih glikana, koja omogućuje relativnu kvantifikaciju različitih glikana na temelju intenziteta fluorescencije. U tu se svrhu često koristi 2-aminobenzamid. Velika primjenjivost ove tehnike u analizi glikana sugerira validaciju metode u svrhu poboljšanja analize. Stoga su u ovom istraživanju ispitana svojstva prokainamida kao potencijalnog fluorescentnog obilježivača.

Rezultati ovog rada pokazuju da se fluorofor prokainamid može koristiti u analizi glikana. Obilježavanjem N-glikana s 2-aminobenzamidom i prokainamidom dobivena su dva usporediva glikanska profila s 24 vrška što ukazuje na dosljednost i primjenjivost prokainamida. Prednost prokainamida u odnosu na 2-aminobenzamid je veća osjetljivost i niži limit kvantifikacije koje će nam uz gotovo jednaku preciznost omogućiti relativnu kvantifikaciju glikana nižih masa od onih obilježenih 2-aminobenzamidom.

SUMMARY

This Master thesis deals with the validation of the HILIC-UPLC method of N-glycan analysis. Glycosylation is the process of protein modification essential to their structure and function. Due to advances in the research of glycans, glycosylation has been recognized as an important part of physiology and pathophysiology. Glycan analysis is becoming more important in biological research, clinical analysis and pharmacy. Numerous analytical methods have been developed for glycan research. One such method is the HILIC-UPLC analysis of isolated and fluorescently marked glycans, which makes relative quantification of different glycans based on fluorescence intensity possible. 2-aminobenzamide is often used label glycans. The broad use of this technique in glycan analysis calls for validation of the method, which has the potential to improve analyses. Therefore, this paper researches the qualities of procainamide as a potential fluorescent label.

The results show that fluorophore procainamide can be used in glycan anaylsis. Labelling N-glycans with 2-aminobenzamide and procainamide resulted in two comparable glycan profiles with 24 peaks, which proves the consistency and applicability of procainamide. The advantage of procainamide, when compared to 2-aminobenzamide, lies in its greater sensitivity and lower quantification limits. These qualities allow for precision almost equal to 2-aminobenzamide in the relative quantification of lower glycan concentrations

8. PRILOZI

Tablica 7. Prikaz početnih masa IgG-a i masa IgG-a od koje su glikani injektirani na kolonu

Početne mase IgG-a (µg)	**% injektirano na kolonu**	**Masa IgG-a od koje su glikani injektirani na kolonu (µg)**
0.1	4.17%	0.004
0.5	4.17%	0.021
1	4.17%	0.042
5	4.17%	0.208
10	4.17%	0.417
25	4.17%	1.042
50	4.17%	2.083
75	4.17%	3.125
100	4.17%	4.167
250	4.17%	10.417
500	4.17%	20.833

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

USPOREDBA OBILJEŽAVANJA N-GLIKANA 2-AMINOBENZAMIDOM I PROKAINAMIDOM U ANALIZI TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI TEMELJENOJ NA HIDROFILNIM INTERAKCIJAMA

Isabella Zolić

SAŽETAK

Ovaj se rad bavi validacijom HILIC-UPLC metode u svrhu analize N-glikana. Glikozilacija je modifikacija proteina od esencijalne važnosti za njihovu strukturu i funkciju. Zahvaljujući ovom saznanju te shvaćanjem da glikozilacija ima veoma važnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji, analiza glikana se sve više uključuje u biološka istraživanja, kliničke analize te u farmaceutskoj proizvodnji. Brojne analitičke metode su se razvile u svrhu ispitivanja glikana. Jedna od metoda jest HILIC-UPLC analiza izoliranih i fluorescentno obilježenih glikana, koja omogućuje relativnu kvantifikaciju različitih glikana na temelju intenziteta fluorescencije. U tu se svrhu često koristi 2-aminobenzamid. Velika primjenjivost ove tehnike u analizi glikana sugerira validaciju metode u svrhu poboljšanja analize. Stoga su u ovom istraživanju ispitana svojstva prokainamida kao potencijalnog fluorescentnog obilježivača.

Rezultati ovog rada pokazuju da se fluorofor prokainamid može koristiti u analizi glikana. Obilježavanjem N-glikana s 2-aminobenzamidom i prokainamidom dobivena su dva usporediva glikanska profila s 24 vrška što ukazuje na dosljednost i primjenjivost prokainamida. Prednost prokainamida u odnosu na 2-aminobenzamid je veća osjetljivost i niži limit kvantifikacije koje će nam uz gotovo jednaku preciznost omogućiti relativnu kvantifikaciju glikana nižih masa od onih obilježenih 2-aminobenzamidom.

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

Rad sadrži: 33 stranice, 13 grafičkih prikaza, 7 tablica i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikani, imunoglobulin G, HILIC-UPLC, 2-aminobenzamid, prokainamid

Mentor: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Toma Keser, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana Mornar Turk, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

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

COMPARISON OF PROCAINAMIDE AND 2-AMINOBENZAMIDE LABELING FOR ANALYSIS OF N-GLYCANS USING HLIC-UPLC

Isabella Zolić

SUMMARY

This Master thesis deals with the validation of the HILIC-UPLC method of N-glycan analysis. Glycosylation is the process of protein modification essential to their structure and function. Due to advances in the research of glycans, glycosylation has been recognized as an important part of physiology and pathophysiology. Glycan analysis is becoming more important in biological research, clinical analysis and pharmacy. Numerous analytical methods have been developed for glycan research. One such method is the HILIC-UPLC analysis of isolated and fluorescently marked glycans, which makes relative quantification of different glycans based on fluorescence intensity possible. 2-aminobenzamide is often used label glycans. The broad use of this technique in glycan analysis calls for validation of the method, which has the potential to improve analyses. Therefore, this paper researches the qualities of procainamide as a potential fluorescent label.

The results show that fluorophore procainamide can be used in glycan anaylsis. Labelling N-glycans with 2-aminobenzamide and procainamide resulted in two comparable glycan profiles with 24 peaks, which proves the consistency and applicability of procainamide. The advantage of procainamide, when compared to 2-aminobenzamide, lies in its greater sensitivity and lower quantification limits. These qualities allow for precision almost equal to 2-aminobenzamide in the relative quantification of lower glycan concentrations

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

Thesis includes: 33 pages, 13 figures, 7 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycans, Immunoglobulin G, Prokainamide, 2-aminobenzamide, HILIC-UPLC

Mentor: **Olga Gornik**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Olga Gornik**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Toma Keser, **Ph.D.** *Assistant 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: May 2017.