

Usporedba mikrokristalične celuloze, C18 te HILIC adsorbensa u svrhu pročišćavanja glikopeptida ljudskog imunoglobulina G za visokoprotlačnu glikoproteomiku

Gnjilac, Dario

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:468557>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Dario Gnjilac

**Usporedba mikrokristalične celuloze, C18 te
HILIC adsorbensa u svrhu pročišćavanja
glikopeptida ljudskog imunoglobulina G za
visokoprotlačnu glikoproteomiku**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca.

Želio bih zahvaliti svojoj obitelji, prvenstveno svojim roditeljima što su me podržali u svakoj mojoj odluci od početka studiranja pa sve do samog kraja, što su mi bili emocionalna i financijska podrška te iskusni savjetnici kada je to bilo potrebno.

Hvala svim prijateljima na svakom spontanom izlasku, svakoj kavi i svakoj uzajamnoj podršci u veljači, lipnju i rujnu, ali i svim mjesecima između.

Hvala prof.dr.sc. Gordanu Laucu što mi je pristao biti mentor i omogućio mi izradu ovog rada te isto tako veliko hvala Siniši Habazinu za sav uloženi trud i suradnju od prvog pipetiranja pa do zadnje rečenice.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GLIKANI	1
1.1.1. VRSTE GLIKANA	3
1.1.2. ULOGA GLIKANA	6
1.2. GLIKOZILACIJA PROTEINA	7
1.2.1. N-GLIKOZILACIJA	9
1.2.2. GLIKOZILACIJA LJUDSKOG IMUNOGLOBULINA G U ZDRAVLJU I BOLESTI... 11	
1.3. ANALIZA GLIKANA	14
1.3.1. IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE	16
1.3.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA (LC)	21
1.3.3. HPLC-ESI-MS (spektrometrija masa uz elektroraspršenje uparena s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti)	22
2. OBRAZLOŽENJE TEME	24
3. MATERIJALI I METODE	25
3.1. UZORAK IgG-a	25
3.2. MATERIJALI	25
3.2.1. KEMIKALIJE I ENZIMI	25
3.2.2. INSTRUMENTI	26
3.2.3. OTOPINE I PUFERI	27
3.3. TRIPSINIZACIJA UZORKA	27
3.4. PRIPREMA ADSORBENSA	29
3.5. RAZRJEĐIVANJE I NANOŠENJE UZORAKA	29
3.6. PROČIŠĆAVANJE	30
3.7. ELUIRANJE GLIKOPEPTIDA	30
3.8. NANO-LC-ESI-QqTOF ANALIZA GLIKOPEPTIDA	30
3.9. ODREĐIVANJE GRAVY VRIJEDNOSTI PEPTIDA	31
3.10. OBRADA PODATAKA	32
3.11. ANALIZA TROŠKOVA	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
5. ZAKLJUČAK	51
6. LITERATURA	52
7. SAŽETAK	56
8. SUMMARY	57
9. PRILOZI	58
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	

1. UVOD

1.1. GLIKANI

Definirani kao sinonimi polisaharida od strane Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC), glikani su strukture građene od monosaharida povezanih glikozidnim vezama (<http://goldbook.iupac.org>). Pod pojmom glikani se, osim samostalnih molekula, podrazumijevaju i ugljikohidratne strukture koje su u prirodi vezane za druge molekule, npr. proteine ili lipide.

Uz proteine, lipide i nukleinske kiseline, glikani su jedna od glavnih i najraznovrsnijih skupina makromolekula. Variraju građom od jednostavnih monosaharida do složenih i višestruko razgranatih polisaharida. Osim veličine same molekule, odnosno broja monosaharidnih sastavnica, glikanskoj raznolikosti pridonosi i širok spektar različitih šećera kao osnovnih građevnih jedinica samog glikana. Kod sisavaca taj spektar čini 10 monosaharida: fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), glukuronska kiselina (GlcA), iduronska kiselina (IdoA), manoza (Man), sijalinska kiselina (SA) i ksiloza (Xyl) (Moremen i sur., 2012.). Šećeri koji čine glikane mogu biti modificirani na nekim od položaja u njihovoj strukturi dodatkom jednog ili više supstituenata, kao što su hidroksilna, metilna, amino i acetilna skupina te mnoge druge. Nadalje, redosljed šećera u samom glikanu, mjesta na šećerima koja sudjeluju u stvaranju glikozidne veze te sve moguće permutacije navedenog dodatno povećavaju raznolikost glikana. Uključi li se u priču i stereokemija, odnosno konfiguracija na anomernom centru, dobiva se kao rezultat jedna izuzetno raznolika skupina makromolekula, kako po strukturi tako i po funkciji (Eichler, 2019).

Glukoza je monosaharid koji služi kao glavni izvor energije ljudskom tijelu. Ta ista molekula glukoze se može modificirati na način da se dobije 2-acetamino-2-deoksi- β -D-glukoza, šećer poznatiji pod nazivom N-acetilglukozamin. Povezivanjem velikog broja monomera N-acetilglukozamina (1,4)- β -glikozidnom vezom stvara se polimer poznat pod nazivom hitin, drugi po redu najzastupljeniji ugljikohidrat nakon celuloze. Nalazi se u staničnoj stijenci većine gljiva, egzoskeletonu kukaca, ljusci rakova te paucima i drugim beskralježnjacima. Ukoliko se pak N-acetilglukozamin poveže s D-glukuronskom kiselinom (1,3)- β -glikozidnom vezom te se nastali disaharidi nanižu jedan na drugi stvaranjem (1,4)- β -glikozidne veze, nastati će heteropolimer poznat pod nazivom hijaluronska kiselina, jedan od

glavnih elemenata izvanstaničnog matriksa, sinovijalne tekućine te epitelnog i vezivnog tkiva. Ovaj primjer pokazuje koliko su glikani raznovrsni i široko rasprostranjeni u živom svijetu, ali i koliko su važni u pogledu raznolikosti funkcija koje imaju (Chen i sur., 2010).

Glikane često nalazimo vezane za proteine ili lipide u obliku glikokonjugata. Stvaranjem kovalentne veze s proteinima ili lipidima, glikani povećavaju njihovu masu te značajno doprinose strukturnoj i funkcionalnoj raznolikosti. Štoviše, glikani su često ti koji osiguravaju pravilnu funkciju nekog proteina (Ohtsubo i Marth, 2006).

Na važnost glikana ukazuje i činjenica da su prisutni u svim stanicama svih živih organizama u nekom svom obliku, bilo kao monosaharidi ili polisaharidi, kao samostalne molekule ili pak vezani za neku drugu strukturu. Njihov nedostatak je letalan već za embrij (Lauc i sur., 2015). Svaki organizam je evolucijom razvio širok i jedinstven repertoar različitih glikanskih struktura i taj repertoar se naziva ukupni glikom nekog organizma. Pretpostavlja se da u glikomu sisavaca postoje tisuće različitih glikana, da je glikom veći od proteoma (ukupnih proteina nekog organizma) te da ujedno sadrži i veću varijabilnost. Uzme li se hipotetska situacija u kojoj šećeri i aminokiseline kao monomeri tvore glikane i peptide, broj mogućih kombinacija šećera je daleko veći od onog mogućih kombinacija aminokiselina (**Tablica 1.**) (Ohtsubo i Marth, 2006; Lauc i Zoldoš, 2010).

Tablica 1. Broj mogućih izomera glikana i peptida sastavljenih od dva, tri, četiri ili pet (istih ili različitih) monosaharida ili aminokiselina (preuzeto i modificirano iz Lauc i Zoldoš, 2010.).

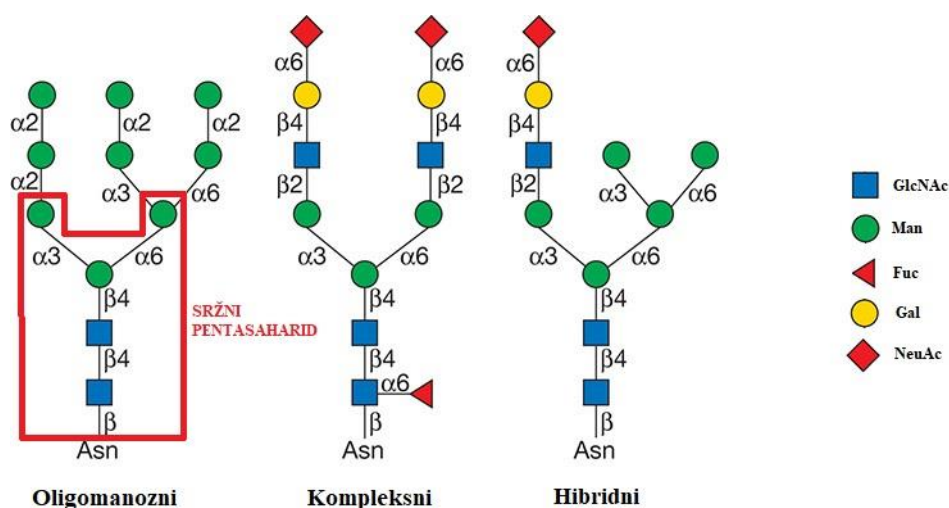
Struktura oligomera	Glikan	Peptid
dimer AA	11	1
dimer AB	20	2
trimer AAA	120	1
trimer ABC	720	6
tetramer AAAA	1424	1
tetramer ABCD	34 560	24
pentamer AAAAA	17 872	1
pentamer ABCDE	2 144 640	120

Za razliku od proteina i RNA, glikani nisu linearni i ne nastaju kao produkt nekog predloška, već su rezultat složenog procesa dodavanja, kidanja i modifikacije različitih šećernih podjedinica posredovanog mnoštvom različitih enzima, ionskih kanala, transkripcijskih faktora, ali i intrinzičnih faktora (npr. bolesti) te čimbenika iz okoliša (npr. prehrana, pušenje). Upravo ta ovisnost o unutarnjim i vanjskim čimbenicima dovodi do razlika u glikanskim profilima dvije osobe, odnosno razlika u sastavu i zastupljenosti pojedinih glikana (Springer i Gagneux, 2015). Ta činjenica sve više stavlja glikane u centar pozornosti dijagnostike, forenzike i sličnih grana zanosti.

1.1.1. VRSTE GLIKANA

Raznolikost glikana u strukturi i funkciji ujedno uvjetuje i složenost njihove podjele. Osim kao samostalne molekule, mogu postojati kao konjugati s proteinima ili lipidima. Ako su vezani za proteine, glikane najčešće dijelimo na temelju veze koju stvaraju. U tom slučaju razlikujemo N-vezane i O-vezane glikane, odnosno N- i O-glikane. Karakterizira ih atom na aminokiselinskom ostatku preko kojeg su vezani za protein, tj. atom koji sudjeluje u stvaranju glikozidne veze.

U slučaju N-glikana radi se o atomu dušika te je tako aminokiselinski bočni ogranak koji sudjeluje u stvaranju takvih glikana onaj od asparagina (Asn) ili rjeđe onaj od arginina (Arg). Iako u jednom proteinu potencijalno postoji velik broj asparaginskih bočnih ograna, glikozidna veza sa glikanom se ne može stvoriti na bilo kojem od njih. Istraživanjima na ovalbuminu, glavnom proteinu iz jajeta, ustanovljeno je da u stvaranju glikozidnih veza s glikanima sudjeluju samo oni asparaginski bočni ogranci koji su dio sekvona Asn-X-Ser/Thr pri čemu X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro). Također, utvrđeno je da kod eukariota glikozidnu vezu s asparaginskim bočnim ogranakom najčešće stvara N-acetilglukozamin (GlcNAc) te da je ta veza β -konfiguracije (GlcNAc β 1-Asn). Taj prvi GlcNAc uz još jedan i tri manoze čini sržni pentasaharid koji je zajednički svim N-glikanima (Man₃GlcNAc₂Asn). Na srž glikana mogu biti vezani ogranci na temelju kojih N-glikane dalje svrstavamo u jednu od tri podskupine: oligomanozni, kompleksni ili hibridni. Kod oligomanoznog tipa su ogranci sastavljeni od šećera manoze. Kompleksni tip ima ogranke koji počinju sa GlcNAc-om, tj. za sržne manoze su vezani preko GlcNAc-a. Hibridni tip ima karakteristike oba prethodna tipa pri čemu manozni ogranci izlaze iz Man α 1-6 ruke, a iz Man α 1-3 ruke izlazi jedan ili više GlcNAc ograna (Slika 1.) (Varki i sur. 2015-2017).



Slika 1. Tipovi N-glikana (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2015-2017).

Ukoliko se pak radi o O-vezanim glikanima, kisikov atom u glikozidnoj vezi potječe od bočnog ogranka serina (Ser), nešto rjeđe treonina (Thr) ili tirozina (Tyr), a izravno vezan na taj kisikov atom je *N*-acetilgalaktozamin (GalNAc) kao početni šećer u strukturi ove vrste glikana. Kod O-glikana se najčešće pojavljuju *N*-acetilgalaktozamin (GalNAc), galaktoza (Gal), *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), fukoza (Fuc) i sijalinska kiselina (SA). Najpoznatiji predstavnici O-glikana su mucini; visokoglikozilirani proteini sa stotinama O-glikana vezanih za proteinsku okosnicu. Mucini oblažu epitelne površine u i na ljudskom tijelu te služe kao svojevrsna zaštitna barijera. Posreduju u oplodnji, imunološkom odgovoru, adheziji stanica te mogu imati i signalne uloge. Koju točno funkciju će mucin imati ovisi o vrsti i količini glikana u njegovoj strukturi (Varki i sur., 2015-2017).

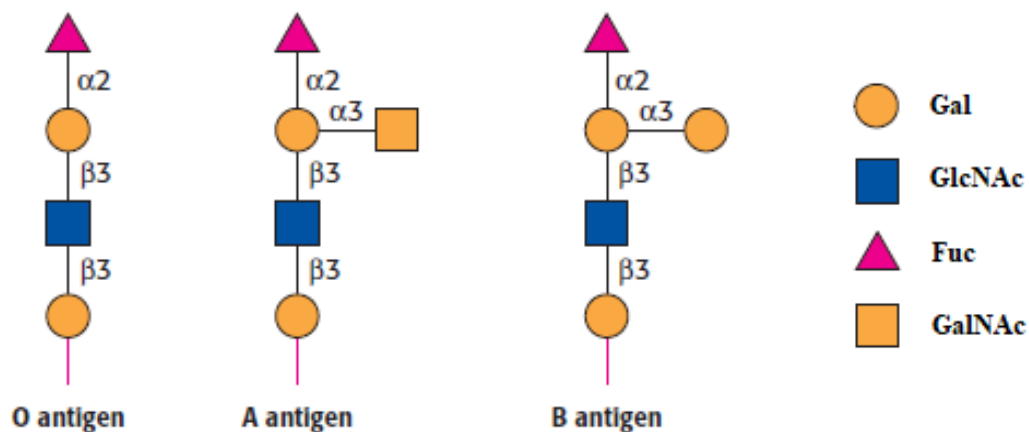
Iako su N- i O-glikani najčešći, u vezi proteina i glikana mogu sudjelovati i neki drugi atomi te tako razlikujemo i C-glikane, S-glikane te P-glikane. Oni su mnogo rjeđi, dok se P-glikani pojavljuju samo kod nižih eukariota (Eichler, 2019).

Osim kao konjugati s proteinima, glikani mogu postojati i vezani za lipide pri čemu čine skupinu spojeva zvanih glikolipidi. Javljaju se kao komponente lipidnih membrana i prisutni su u svim živim organizmima, od jednostaničnih do višestaničnih. Igraju važnu ulogu u mnoštvu bioloških procesa, uključujući održavanje integriteta same membrane te veza između stanica, sudjeluju i u međustaničnoj signalizaciji, regulaciji staničnog ciklusa te imunom odgovoru organizma.

Opća struktura glikolipida se sastoji od lipidnog dijela s nepolarnim repom i polarnom glavom na koju je vezan šećer, odnosno glikan. Najzastupljeniji glikolipidi kod životinja, uključujući čovjeka, su glikosfingolipidi. To je skupina glikolipida koji u strukturi imaju sfingozin na čiju je amino skupinu vezana jedna masna kiselina što čini ceramid, a na terminalnu (primarnu) hidroksilnu skupinu takvog ceramida je zatim vezan šećer (Varki i sur., 2015-2017; Ando i sur. 2007).

Primjer strukture koja u sebi sadrži i protein i lipid i glikan je glikozilfosfatidilinozitolno (GPI) sidro s vezanim proteinom. U takvoj strukturi je protein „usidren“ u membranu tako da je vezan za lipidnu komponentu membrane (fosfatidilinozitol) preko šećernog mosta (etanolamin-PO₄-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN) (Varki i sur. 2015-2017).

Jedan od najboljih primjera signalizacije koja ovisi o strukturi glikana jesu krvne grupe. Ljudsko tijelo na temelju glikanskih epitopa, odnosno antigena na eritrocitima prepoznaje stanice kao vlastite ili tuđe. Radi se o glikanima koji mogu biti prisutni kao glikoproteini ili glikolipidi na vanjskoj strani stanične membrane te se razlikuju među pojedincima. Najpoznatiji takav sustav krvnih grupa je sustav ABO koji se temelji na tri različita antigena, gdje je onaj krvne grupe O osnovni, a oni krvnih grupa A i B imaju dodan GalNAc (grupa A) ili galaktozu (grupa B) (*Slika 2.*) (Varki i sur., 2015-2017).



Slika 2. Strukture A, B i O oligosaharidnih antigena (preuzeto i modificirano iz Stryer i sur., 2010).

1.1.2. ULOGA GLIKANA

Više od tri milijarde godina evolucije je neprestano stvaralo različite organizme i svi oni dijele neke zajedničke značajke, a jedna od njih je i glikozilacija. Prisutnost glikana na svim stanicama svih živih bića ukazuje na širok spektar njihovih uloga, od onih životno važnih do onih ne toliko. Klasifikacija tih uloga je provedena na način da su glikani svrstani u četiri glavne skupine koje nisu uvijek oštro odijeljene, već dolazi i do nekih preklapanja. Prva skupina su strukturne i modulatorne uloge, zatim ekstrinzično prepoznavanje (između vrsta) te intrinzično prepoznavanje (unutar vrste) i četvrtu skupinu čini molekularna mimikrija. (Varki, 2016). Uz ove četiri glavne uloge, poduloga ima mnogo više te će u nastavku biti spomenute samo neke.

Glikani se nalaze u svim staničnim odjeljcima i izvanstaničnim prostorima te imaju mnogo uloga koje ovise primarno o njihovim strukturnim svojstvima ili o modulaciji funkcija proteina i lipida s kojima su konjugirani. Najosnovnija strukturna funkcija je ona koja daje oblik i čvrstoću, a primjer glikana s takvom ulogom je već spomenut ranije u ovom radu i naziva se hitin, homopolimer *N*-acetilglukozamina. Čest je u gljiva i životinja, dok u carstvu biljaka prevladava sličan homopolimer – onaj sastavljen od glukoznih monomera poznat kao celuloza. Glikani osim čvrstoće mogu pružati i elastičnost (Varki, 2016). Primjer takvih glikana su glikozaminoglikani hondroitin sulfat i keratan sulfat koji vezani za proteinsku okosnicu čine agrekan; proteoglikan kojeg najčešće nalazimo u hrskavicama i koji osigurava elastičnost hrskavica te njihovu pravilnu funkciju u tijelu (Gandhi i Mancera, 2008). Uz čvrstoću i elastičnost, glikani pružaju različite oblike zaštite stanicama jer na vanjskoj površini stanične membrane tvore bogati ugljikohidratni sloj koji se naziva glikokaliks. Može imati različite barijerne uloge među koje spadaju mehanička zaštita, zaštita od trenja, kemijskih agensa, različitih proteaza i patogena, difuzijska barijera i sl. Osim posve strukturnih uloga, glikani utječu i na funkcije proteina i lipida kad su s njima konjugirani te također sudjeluju u pravilnom slaganju proteina pri sintezi. S obzirom na hidrofilan karakter glikana, povećavaju topljivost molekule za koju su vezani pa ih u velikim količinama nalazimo na proteinima krvne plazme. Uključeni su u strukturu stanične membrane i njenu organizaciju kao i u organizaciju izvanstaničnog matriksa.

Postojanje širokog spektra različitih glikana je velik broj patogena i simbionata iskoristio za prepoznavanje pogodnog domaćina i njegovih stanica. Ovaj proces se odvija pomoću proteina koji prepoznaju i vežu glikane. Bilo da se radi o bakterijama, virusima, gljivicama ili parazitima, moguće je pronaći barem jedan primjer takve interakcije kod svakog

od navedenih. *Escherichia coli* je bakterija koja kolonizira probavni sustav, pretežito crijeva, te je dio normalne mikroflore čovjeka. Na svojoj površini posjeduje strukture koje se nazivaju fimbrije ili pili. Nađe li se bakterija u urogenitalnom traktu, može doći do interakcije tih fimbrija s glikanskim strukturama na epitelu, npr. prepoznaju li specifične fimbrije manozilirane glikoproteine, vezat će se za njih čime će olakšati kolonizaciju urinarnog trakta bakterijom *E. coli* što će u konačnici rezultirati upalom (Kline i sur., 2009). Interakcije ove vrste ne idu u korist samo patogenima, već i domaćinima koje ti patogeni napadaju. Naime, mikroorganizmi također eksprimiraju glikane na svojoj površini i stanice imunološkog sustava čovjeka mogu prepoznati te glikane pomoću proteina koji vežu glikane te tako olakšati i ubrzati uklanjanje patogena (Varki, 2017).

Glikani sudjeluju u prepoznavanju između dvije različite vrste, ali isto tako sudjeluju u prepoznavanju unutar iste vrste. Između ostalih, jedan od procesa u kojima sudjeluje intrinzično prepoznavanje glikana je onaj za vrijeme oplodnje. Prilikom spajanja spermija sa jajnom stanicom, proteini koji vežu jajnu stanicu (EBP; egg-binding protein) eksprimirani na površini spermija prepoznaju šećerne sekvence glikoproteina ovojnice jajne stanice (Pang i sur., 2011).

Osim između dva organizma iste vrste, prepoznavanje glikana je važno i unutar istog organizma. Glikani su često ti koje protutijela i stanice imunološkog sustava prepoznaju kao antigene, bilo strane ili vlastite. Upravo takvo prepoznavanje u zdravom organizmu omogućuje imunološki odgovor na patogen, ali ne i na vlastite stanice. Međutim, patogeni su razvili mehanizme molekularne mimikrije kojima to iskorištavaju. Tako bakterija može na svojoj površini eksprimirati glikanske strukture koje su iste ili vrlo slične onima u ljudskom tijelu što će uvelike otežati prepoznavanje bakterije kao organizmu strane čestice od strane imunološkog sustava (Varki, 2017).

1.2. GLIKOZILACIJA PROTEINA

Glikoproteini nastaju kao produkt složenog procesa koji se naziva glikozilacija i definirana je kao kovalentno dodavanje jednog ili više šećera na određene aminokiselinske ostatke u proteinu. Glikozilacija je kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija koja utječe na strukturu i funkciju proteina. Isključivo translacijom genskog koda, stanica može proizvesti određeni broj različitih proteina.

Međutim, naknadnom modifikacijom takvih proteina dodatkom šećera se uvelike povećava njihova raznolikost u vidu strukture i funkcije izvan okvira definiranih genomom što čini glikoproteom nekoliko redova veličine kompleksnijim od samog proteoma. Gotovo svi membranski i izvanstanični proteini su glikozilirani te upravo glikozilacija osigurava njihovo pravilno smatanje, staničnu lokalizaciju, stabilnost, odgovarajuću topljivost i u konačnici pravilnu funkciju (Eichler, 2019).

U glikozilaciji sudjeluje velik broj enzima koji zajedno s transkripcijskim faktorima i okolišem, koji utječu na ekspresiju tih enzima, čine glikozilaciju jednim vrlo složenim i reguliranim procesom čiji rezultat je širok spektar različitih glikanskih struktura. Smatra se da trenutno poznatih 600 proteina koji sudjeluju u glikozilaciji čine samo mali dio od ukupnog broja uključenih proteina i enzima, među kojima prevladavaju glikozidaze i glikoziltransferaze. Pretpostavlja se da je između 5% i 10% ljudskog genoma uključeno u glikozilaciju što ju čini najsloženijim poznatim biosintetskim putem (Gornik i sur., 2012).

Gledano na razini stanice, glikozilacija se odvija kao ko- i posttranslacijska modifikacija proteina u njihovom sekretornom putu. Započinje na endoplazmatskom retikulumu (ER) i nastavlja se do Golgijevog aparata (GA) gdje najčešće završava i odakle se protein usmjerava na vanjsku površinu stanične membrane kao membranski vezani protein, u izvanstanični prostor kao nevezani topljivi protein ili pak u neki stanični odjeljak kao što je lizosom (Eichler, 2019).

Bez obzira na lokalizaciju, dodavanje šećernih monomera u procesu glikozilacije zahtijeva da ti šećeri budu u aktiviranom obliku. Najčešće je to u obliku nukleotidnih šećera (*Slika 3.*) ili šećera vezanih za lipidne molekule preko fosfata (npr. dolikol-fosfat manoza). Takve aktivirane molekule šećera nastaju u citosolu ili jezgri stanice, a potrebni su u lumenu ER i GA što znači da se u trenutku sinteze nalaze na „krivoj“ strani membrane. Budući da su negativno nabijene molekule, ne mogu samostalno prijeći membranu. Taj problem rješavaju o ATP-u neovisni transporteri nukleotidnih šećera. Oni su zapravo antiporter koji u lumen ER i GA prebacuju nukleotidni šećer, a istovremeno iz lumena u citosol nukleozid monofosfat. Iako ti transporteri nisu ovisni o energetske stanice, kompetitivno su inhibirani s odgovarajućim nukleozid mono- i difosfatima iz citosola (Varki i sur., 2015-2017).

Šećer	Aktivirani oblik
Glc	UDP-šećer
Gal	
GlcNAc	
GalNAc	
GlcA	
Xyl	GDP-šećer
Man	
Fuc	CMP-Sia
Sia	

Slika 3. Donori aktiviranih šećera u životinjskim stanicama (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2015-2017).

Kao što im ime govori, glikoziltransferaze kataliziraju prijenos molekule šećera, i to upravo s aktivirane molekule na nastajući glikan. S druge strane, glikozidaze kataliziraju uklanjanje šećernih monomera s glikana hidrolizom glikozidne veze. Međusobnom suradnjom tih enzima nastaju različite manje ili više složene glikanske strukture, kod viših eukariota najčešće glikani kompleksnog tipa, dok su kod nižih eukariota to nešto jednostavniji oligomanozni glikani.

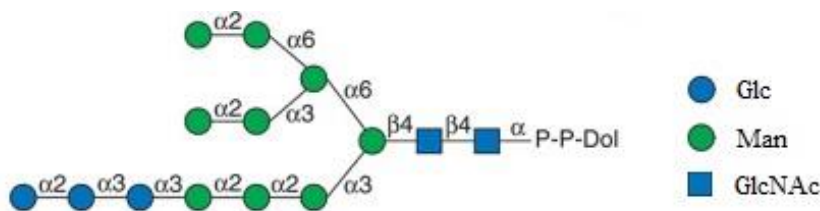
S obzirom na vrstu glikoproteina, glikozilaciju također dijelimo na N-glikozilaciju i O-glikozilaciju. N-glikozilacija je najviše proučavana i razjašnjena vrsta proteinske glikozilacije, što ne čudi s obzirom da je prisutna kod čak 90% glikoproteina, dok je samo oko 10% isključivo O-glikozilirano (Apweiler i sur., 1999).

1.2.1. N-GLIKOZILACIJA

Kod eukariota, N-glikozilacija se odvija u nekoliko faza. Započinje na membrani endoplazmatskog retikuluma sintezom glikanske preteče, polisaharidne jezgre sastavljene od 14 šećernih jedinica na lipidnom nosašu dolikol fosfatu: $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (**Slika 4.**). Prvi korak je prijenos GlcNAc-1-P s molekule UDP-GlcNAc na dolikol fosfat uz pomoć enzima GlcNAc-1-fosfotransferaze na citoplazmatskoj strani membrane ER. Na početni GlcNAc se zatim dodaje još jedan GlcNAc s UDP-GlcNAc te pet manozna s GDP-Man.

Nastali kompleks se zatim translocira na luminalnu stranu membrane ER uz pomoć enzima flipaze. Nakon prebacivanja, na nastali kompleks se dodaju još četiri manoze i tri glukoze s Dol-Man i Dol-Glc molekula koje predstavljaju aktivirane šećere. U tom trenutku nastaje 14-saharidna jezgra N-glikana koja se u sljedećoj fazi prebacuje s molekule dolikola na odgovarajući Asn u aminokiselinskom sekvencu Asn-X-Ser/Thr proteina uz pomoć enzima oligosahariltransferaze (OST) (Varki i sur., 2015-2017).

OST je membranski proteinski kompleks koji ima visok afinitet za potpuni oligosaharid, u većine eukariota je to 14-saharidna jezgra (*Slika 4.*), dok je afinitet za nedovršene oligosaharide manji (Varki i sur., 2015-2017).



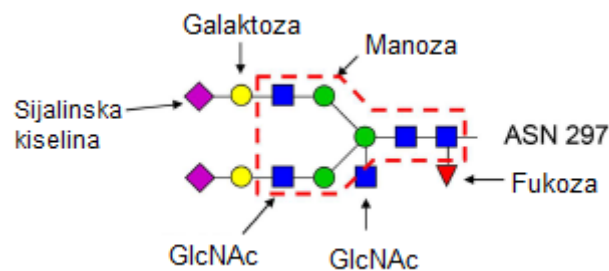
Slika 4. 14-saharidna jezgra N-glikana vezana na dolikol-fosfat (Dol-P) (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2015.-2017.).

Prijenos oligosaharida na peptid je proces koji se odvija prije nego što je translacija završena te osigurava pravilno smatanje proteina. Odmah po završetku prijenosa dolazi do uklanjanja nekih šećera iz strukture uz pomoć ER glikozidaza. Prvo glikozidaza I uklanja terminalnu molekulu glukoze, zatim glikozidaza II uklanja sljedeće dvije glukoze, a nakon toga se uklanja jedna molekula manoze katalizirano manozidazom. Ukoliko su uklonjene sve tri glukoze, jedna manosa i protein je pravilno smotan, proces glikozilacije se dalje nastavlja u Golgijevom aparatu. Kod većine glikoproteina, u cis-odjeljku GA se uklanjaju još tri manoze pri čemu preostaje oligosaharid $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Nastanak kompleksnih i hibridnih glikana je uvjetovan korakom koji katalizira N-acetilglukozaminiltransferaza u medijalnom odjeljku GA. U spomenutoj reakciji se GlcNAc dodaje na $\text{Man}\alpha 1-3$ ruku u položaj C2. Nakon dodatka GlcNAc-a, manozidaze uklanjaju dodatne dvije manoze pri čemu glikan dobiva pentasaharidnu srž karakterističnu za N-glikane (*Slika 1.*). Tek u sljedećim koracima kataliziranim različitim glikoziltransferazama i glikozidazama dolazi do stvaranja raznolikosti po kojoj su glikani toliko specifični.

1.2.2. GLIKOZILACIJA LJUDSKOG IMUNOGLOBULINA G U ZDRAVLJU I BOLESTI

Glikozilacija je najčešća posttranslacijska modifikacija proteina te je prisutna i kod svih pet skupina (izotipova) ljudskih imunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Najzastupljeniji od njih je imunoglobulin G (IgG) sa udjelom od 10-20% u ukupnim proteinima plazme te je ujedno i jedna od glavnih komponenti humoralne imunosti (Arnold i sur., 2007; Jefferis, 2009; Vidarsson i sur., 2014). Sve četiri podklase ljudskog IgG-a (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4) su glikoproteini sastavljeni od dva teška i dva laka lanca međusobno povezanih disulfidnim vezama (Baković, 2013). Unutar istog IgG-a su oba teška lanca identična i sastoje se od jedne varijabilne domene (V_H) i tri konstantne domene (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), dok su laki lanci također međusobno identični, ali ih čini samo jedna varijabilna (V_L) i jedna konstantna domena (C_L). Laki lanci zajedno s dijelom teških lanaca (V_H i C_{H1}) tvore dva takozvana Fab fragmenta (engl. antigen-binding fragment) preko kojih imunoglobulin prepoznaje antigen. Nadalje, kako bi izvršio svoju efektorsku funkciju, imunoglobulinu je potreban Fc fragment (engl. fragment crystallizable) kojeg čine preostali dijelovi teških lanaca (C_{H2} i C_{H3}) i koji je povezan s Fab fragmentima preko zglobne regije (engl. hinge region) bogate disulfidnim vezama čija struktura je karakteristična za svaku podklasu IgG-a. Imunoglobulini pokazuju značajnu raznolikost po pitanju položaja i broja N-glikozilacijskih mjesta koja se nalaze i na Fab i na Fc fragmentu kao i na zglobnoj regiji koja je također podložna glikozilaciji te ovisno o vrsti imunoglobulina može sadržavati različite omjere N- i O-vezanih glikana (Arnold i sur. 2007). Iako se glikozilacija razlikuje među skupinama imunoglobulina, unutar iste vrste se javljaju karakteristična visokoočuvana glikozilacijska mjesta, posebice na Fc fragmentu pa je tako kod IgG-a karakteristična glikozilacija Asn-297 na oba teška lanca i najčešće se radi o biantennarnim kompleksnim glikanima (Reusch i Tejada, 2015). Kristalografska istraživanja upućuju na to da na istoj molekuli IgG-a oba Asn-297 ne moraju nužno biti identično glikozilirana pa govorimo o asimetričnoj glikozilaciji. Bez obzira na razlike između ta dva mjesta, uloga njihove glikozilacije ostaje ista: stabilizacija kvarterne strukture te osiguravanje adekvatne topljivosti i optimalne efektorske funkcije (Arnold i sur., 2007; Jefferis, 2009). Prisutnost jedne od ukupno 32 moguće jedinstvene glikanske strukture na svakom od dva teška lanca Fc fragmenta imunoglobulina je esencijalna za njegovu efektorsku funkciju, dok efikasnost varira ovisno o samom glikanu (Jefferis, 2009). Na važnost glikozilacije IgG-a ukazuje i činjenica da različiti glikani na Fc fragmentu različito utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku monoklonskih protutijela, dok neki izazivaju i štetne imunološke reakcije (Reusch i Tejada, 2015). Iako se Asn-297 često smatra jedinim glikozilacijskim mjestom IgG-a, i varijabilna regija 10-15% svih protutijela ipak

sadrži neke glikanske strukture (Vidarsson i sur. 2014). Dakle, Fab fragmenti također mogu biti glikozilirani pri čemu njihova glikozilacija ima pozitivan, negativan ili neutralan utjecaj na prepoznavanje i interakciju s antigenom (Jefferis, 2009). Budući da se većinom nalaze na izloženim petljama Fab regije i pristupačniji su enzimima, takvi glikani su najčešće jako sijalinizirani i galaktozilirani s visokom prisutnošću rasijecajućeg (engl. bisecting) GlcNAc-a u strukturi, za razliku od onih na Fc fragmentu koji s druge strane imaju nešto veći udio fukoze (Arnold i sur., 2007; Jefferis, 2009; Vidarsson i sur., 2014). Općenito, sržna struktura glikana IgG-a je pentasaharid karakterističan za N-glikane (GlcNAc₂Man₃) koji se može dodatno modificirati dodatkom galaktoze, sijalinske kiseline (*N*-acetilneuraminska kiselina, Neu5Ac), sržne fukoze i rasijecajućeg GlcNAc-a (**Slika 5.**) (Vidarsson i sur., 2014).



Slika 5. Srž *N*-vezanog glikana imunoglobulina *G* s potencijalnim modifikacijama (preuzeto i modificirano iz Vidarsson i sur., 2014).

Iako su se i ukupni glikom plazme i glikom samog IgG-a pokazali kao dosta stabilni u homeostatskim uvjetima, mijenjaju se značajno ali sporo s godinama te su se u stanju drastično promijeniti u situacijama narušene homeostaze (Lauc i sur., 2015). Budući da je glikozilacija složen proces na kojeg utječu i unutarnji i vanjski čimbenici, u različitim fiziološkim stanjima te bolestima zabilježeni su pomaci prema višim ili nižim udjelima određenih glikoformi imunoglobulina *G*. Moguće je da taj pomak nastaje kao rezultat promjene ekspresije različitih glikoziltransferaza, no točan mehanizam još nije potpuno utvrđen (Vidarsson i sur., 2014). Bez obzira na uzrok, dolazi do promjene u glikozilaciji čime se često mijenja i funkcija samog IgG-a, odnosno njegova pro- i protuupalna svojstva.

Sržna fukoza je naziv za molekulu fukoze vezanu za prvi GlcNAc u strukturi N-glikana i uočena je kao neobična karakteristika IgG-a s obzirom da jako visok udio cirkulirajućeg protutijela (~95%) sadrži tu modifikaciju, za razliku od ostalih proteina plazme koji su relativno slabo fukozilirani (Lauc i sur., 2015). Također je uočeno da prisutnost upravo takve fukoze značajno smanjuje vezanje za Fc receptore, točnije za FcγRIIIa receptore, jer je u njenoj odsutnosti puno veća površina proteinskog dijela Fc regije dostupna za vezanje i interakciju s receptorom (Lauc i sur., 2015; Arnold i sur., 2007). Činjenica da IgG izaziva jači imunološki odgovor kada ne sadrži sržnu fukožu je iskorištena u medicini te se mehanizam monoklonskih protutijela u terapiji tumora uglavnom temelji na o protutijelu ovisnoj staničnoj citotoksičnosti (engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) pojačane nedostatkom sržne fukoze (Lauc i sur., 2015).

Osim dodatka sržne fukoze, još jedna važna modifikacija N-glikana IgG-a je galaktozilacija. Na temelju broja jedinica galaktoze u strukturi Asn-297 glikana, molekule IgG-a dijelimo na agalaktozilirane (IgG-G0), monogalaktozilirane (IgG-G1) i digalaktozilirane (IgG-G2). Razine navedenih glikoformi s obzirom na stupanj galaktozilacije su individualne za svakog pojedinca, ali su pokazale ovisnost o starosti pri čemu IgG-G0 pokazuje trend rasta, IgG-G2 pada, a IgG-G1 ostaje stalan. Značajan utjecaj spola nije primijećen, osim u dvadesetim godinama života kada je razina agalaktoziliranog IgG-a nešto veća kod muškaraca (Baković, 2013; Yamada i sur., 1997). Smanjenje stupnja galaktozilacije i povećanje udjela agalaktozilirane glikoforme je također zamijećeno i povezano s velikim brojem autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, Crohnova bolest, sistemski eritemski lupus i dr.), infekcija (hepatitis C, HIV, tuberkuloza) te tumora (primjerice tumor jajnika) (Arnold i sur., 2007; Baković, 2013; Lauc i sur., 2015). Pretpostavlja se da nedostatak galaktoze smanjuje imunosupresivni potencijal IgG-a te povećava njegovu sposobnost da aktivira komplement preko lektinskog puta, odnosno preko lektina koji vežu manozu (engl. mannose-binding lectin, MBL) i pridruženih serinskih proteaza (engl. MBL-associated serine proteases, MASP) (Arnold i sur., 2007; Lauc i sur., 2015). Takav proupalni oblik IgG-a može biti ili faktor razvoja bolesti kao što je reumatoidni artritis ili važna funkcionalna promjena koja pridonosi napredovanju same bolesti, no bila ona uzrok ili posljedica, svakako je prisutna (Lauc i sur., 2015). Slična ovisnost imunomodulatornih svojstava IgG-a je prisutna i kad je u pitanju sijalinska kiselina gdje prisutnost iste potiče protuupalno djelovanje, dok njen nedostatak promovira proupalna svojstva IgG-a (Lauc i sur., 2015).

Promjene fiziološkog stanja organizma uključujući i razvoj bolesti svakako dovode do promjena u glikozilaciji IgG-a, kao što su pokazala brojna istraživanja, te upravo ta spoznaja otvara vrata razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa kojima su meta glikani i glikozilacija.

1.3. ANALIZA GLIKANA

Složenost i raznolikost glikana i glikokonjugata je biološki gledano njihova velika prednost, ali je istovremeno i velika prepreka kad je u pitanju njihova analiza. Za razliku od DNA i proteina, glikani nisu nužno linearne molekule te je uz to njihova sinteza veoma kompleksan proces uvjetovan mnoštvom čimbenika koji mogu biti i vanjski i unutarnji. Upravo složenost glikana, u kombinaciji s malom količinom analita u uzorku, zahtijeva jednako tako složene i napredne analitičke tehnike.

Struktura glikana je određena šećernim monomerima: vrstom i brojem šećernih jedinica, njihovim položajem u strukturi, vrstom i pozicijom veze između njih te načinu na koji su vezani za aglikon. Također, u intaktnoj strukturi glikoproteina najčešće postoji veći broj glikana vezanih na različita mjesta na peptidnom lancu i upravo zato ne čudi činjenica što ne postoji univerzalna metoda za analizu glikana. S obzirom na svojstva uzorka i samih glikana koji se analiziraju, metode su spoj složene pripreme uzorka i naprednih tehnika separacije i detekcije, bilo kvalitativne ili kvantitativne.

Priprema uvelike ovisi o samoj prirodi uzorka, ali i o razini na kojoj se žele analizirati glikani: analiza cijelih tj. netaknutih glikoproteina, analiza glikopeptida dobivenih enzimatskim cijepanjem (digestijom) glikoproteina, analiza glikana dobivenih enzimatskim ili kemijskim odcjepljivanjem (deglikozilacijom) s peptida te analiza monosaharida. Najšire korištena je analiza oslobođenih cijelih glikana jer daje najbolji uvid u njihovu vrstu i zastupljenost (Keser, 2016).

Kod svih analiza glikana, osim kod analize cijelih netaknutih glikoproteina, potrebna je neka vrsta enzimske obrade uzorka koja obuhvaća razgradnju proteina na manje peptidne dijelove ili pak potpuno oslobađanje glikana s proteina. U tu svrhu postoji cijeli niz enzima koje karakterizira cijepanje veze na točno određenim mjestima. Za cijepanje glikoproteina na manje peptide se najčešće koristi tripsin koji je serinska endopeptidaza, tj. kida peptidnu vezu između aminokiselina u unutrašnjosti lanca i to na C-terminalnoj strani lizina i arginina.

Ukoliko je cilj osloboditi glikan s proteina i/ili ga pocijepati na manje oligosaharide/monosaharide, koriste se endo- i egzoglikozidaze. Najčešće u upotrebi su endoglikozidaze koje kidaju vezu između dva sržna GlcNAc (endoglikozidaza H ili Endo H i endoglikozidaza F ili Endo F) te endoglikozidaza koja kida vezu početnog GlcNAc glikana s asparaginom (peptidna-N-glikozidaza F ili PNGaza F) oslobađajući tako cijelu glikansku strukturu od proteina.

Uzorci koji se uzimaju za analizu često sadrže male količine glikana pa je potrebno provesti ukoncentriravanje kojim se osigurava da uzorak koji ide dalje u analizu sadrži glikane u odgovarajućim koncentracijama. Isto tako, potrebno je ukloniti sve ostale sastavnice smjese koje mogu potencijalno interferirati u nekom od koraka analize, kao što su različiti peptidi, soli i sl.

Oslobađanje glikana s proteina ili kidanje glikoproteina na glikopeptide rezultira nastankom kompleksne glikanske smjese čak i kad je samo jedno mjesto na proteinu glikozilirano jer individualni proteini mogu nositi različite glikanske strukture (Varki i sur., 2015-2017). Taj problem se rješava različitim separacijskim tehnikama koje uključuju tekućinsku kromatografiju (engl. liquid chromatography, LC) ili kapilarnu elektroforezu (capillary electrophoresis, CE). Najčešće korištene su tekućinska kromatografija visoke (HPLC) i ultra-visoke djelotvornosti (UPLC). Bez obzira na tehniku separacije, ona je rijetko kad potpuna i dobiveni su kromatografski pikovi na kraju analize često preklapljeni signali više različitih glikanskih struktura (Keser, 2016).

Separirani glikani se mogu detektirati detektorima koji mjere apsorpciju elektromagnetskoga zračenja od ultraljubičastoga do vidljivoga područja (UV-Vis) ili fluorescenciju (FLR) te spektrometrijom masa (MS). Nedostatak kromofornih i fluorofornih skupina u molekuli glikana te njihova slaba ionizacijska svojstva zahtijevaju neki oblik derivatizacije ovisan o samoj tehnici detekcije. Kromatografska analiza glikana se danas najčešće provodi s fluorescencijskim detektorom pa je potrebno obilježiti glikane s fluorescirajućom bojom: 2-aminobenzamidom (2-AB), 2-aminobenzojevom kiselinom (2-AA), 2-aminopiridijom (2-AP), 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonskom kiselinom (ANTS), 1-aminopiren-3,6,8,-trisulfonskom kiselinom (APTS) ili prokainamidom (ProA). One se vežu za glikan u reakciji reduktivne aminacije u kojoj primarna amino-skupina u molekuli boje reagira s aldehidnom skupinom na reducirajućem kraju glikana dajući Schiffovu bazu (imin) koja se zatim redukcijom pomoću natrijevog cijanoborhidrida (NaBH_3CN) ili 2-pikolin

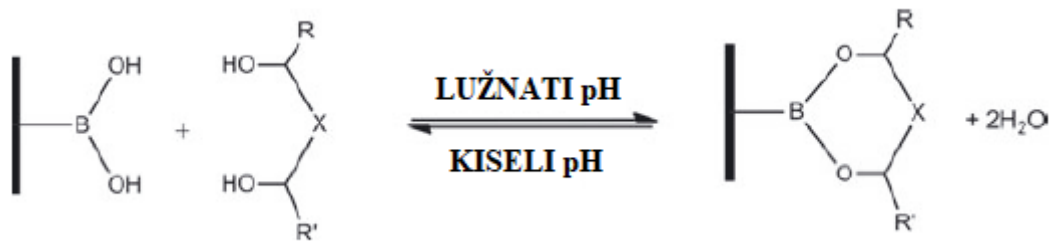
borana prevodi u sekundarni amin. Prednost ovakvog načina obilježavanja je činjenica da glikan i boja reagiraju u stehiometrijskom omjeru 1:1 što znači da je koncentracija glikana proporcionalna izmjerenom intenzitetu fluorescencije pod uvjetom da je reakcija obilježavanja potpuna (Ruhaak i sur. 2010). Za razliku od detekcije s UV-Vis ili FLR detektorom, spektrometrija masa je nešto manje pogodna za kvantitativnu analizu zbog nedostupnosti i visoke cijene glikanskih standarda – osobito onih izotopno obilježenih. Stoga je još uvijek u MS analizi glikana pretežno zastupljena relativna kvantifikacija. S druge strane, spektrometrija masa zato daje najviše informacija o strukturi jer omogućuje korištenje raznih tehnika fragmentacije iona u plinskoj fazi (Keser, 2016).

1.3.1. IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE

Analiza glikana uobičajeno počinje s ekstrakcijom glikoproteina iz biološkog materijala kao što su tkiva, stanice ili tjelesne tekućine, zatim najčešće slijedi izolacija glikana te njihovo pročišćavanje prije daljnje analize (Yang i Zhang, 2012). Tehnike izolacije glikana ovise o razini na kojoj se glikani analiziraju. Ukoliko se radi o glikopeptidima, izolacija će prvo uključivati digestiju uzorka tripsinom ili nekom drugom pogodnom proteazom, ali neće uključivati npr. endo- ili egzoglikozidaze koje se koriste kod pripreme uzorka za analizu oslobođenih glikana. Nakon što su glikani ili glikopeptidi oslobođeni, potrebno je provesti njihovo pročišćavanje, odnosno izolaciju željenih analita od ostatka smjese – matrice – koja sadrži interferirajuće tvari. Ukoliko se za detekciju glikana koristi MS, pročišćavanje glikana od ostalih sastavnica smjese je neizostavan korak jer glikani sami po sebi pokazuju slabu ionizaciju, a ako se u smjesi nalaze proteini i peptidi te različite soli, ionizacija glikana je dodatno suprimirana (Peng i sur., 2018). U slučaju fluorescentnog obilježavanja, pročišćavanje ima za cilj ukloniti suvišak boje, reducensa i otapala. Također, neglikozilirani peptidi daju jače signale u spektrometriji masa od onih glikoziliranih čime dodatno otežavaju analizu (Ongay i sur., 2012). Stoga su razvijene različite tehnike pročišćavanja glikana: glikan-specifično vezanje za lektine, tehnike temeljene na boronatnoj i hidrazinskoj kemiji, tehnike temeljene na keliranju, kromatografija na poroznom grafitiziranom ugljiku (PGC), C18 stacionarnoj fazi te HILIC (Peng i sur., 2018; Ongay i sur., 2012).

Lektini su vrlo raznolika skupina proteina koji prepoznaju glikanske strukture i vežu ih na temelju vodikovih veza te van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija (Ongay i sur., 2012). To njihovo svojstvo je iskorišteno u glikomici i glikoproteomici jer omogućava odjeljivanje glikanskih struktura od ostalih sastavnica smjese. Lektini u svojoj strukturi imaju ugljikohidrat-prepoznavajuće domene (engl. carbohydrate-recognition domain, CRD) koje sadrže različite hidrofobne i hidrofilne skupine u „džepovima“ koji odgovaraju različitim terminalnim šećerima glikana (Varki i sur., 2015-2017; Ongay i sur., 2012). Vezanje glikana je karakterizirano manjom ili većom specifičnošću (ovisno o strukturi CRD) i niskim afinitetom. Upravo zbog tih činjenica je upotreba ovakvog načina pročišćavanja ograničena te u slučajevima kada je cilj izolirati širok spektar glikanskih struktura, prevladavaju ostale navedene tehnike (Peng i sur., 2018).

Mehanizmi separacija i izolacija se uglavnom temelje na nekovalentnim interakcijama, međutim, postoje i one tehnike u kojima dolazi do stvaranja kovalentne veze između analita od interesa i stacionarne faze. Takve tehnike se dijele u dvije skupine: one temeljene na boronatnoj i one temeljene na hidrazinskoj kemiji (Ongay i sur., 2012). Boronska kiselina ima sposobnost stvaranja kovalentnih veza sa 1-2 i 1-3 *cis*-diolnim skupinama šećera i poliola u lužnatim i bezvodnim uvjetima pri čemu nastaju stabilni petero- ili šesteročlani ciklički esteri (**Slika 6.**). Budući da ovakav način vezanja ne zahtijeva kompleksno prepoznavanje složenih oligosaharidnih motiva kao kod lektina, boronatna kemija omogućava izolaciju puno šireg spektra glikanskih struktura, ali i struktura s monosaharidnim modifikacijama. Iako je prisutno kovalentno vezanje, boronatna kemija je lako reverzibilna promjenom pH pri čemu se kidaju esterske veze i nepromijenjeni glikan se oslobađa (Chen i sur., 2014; Ongay i sur., 2012). Hidrazinska kemija je nešto destruktivnija od boronatne jer je prvi korak izolacije oksidacija *cis*-diolnih skupina do dialdehida. U sljedećem koraku aldehidne skupine reagiraju s hidrazidnim skupinama na nosaču stvarajući kovalentne veze što omogućuje pročišćavanje imobiliziranih glikoproteina/glikopeptida. Oslobođanje vezanih struktura se temelji na reakciji deglikozilacije enzimom, najčešće PNGazom F, pri čemu oslobađa peptidni dio glikopeptida i omogućuje njegova daljnja analiza (Ongay i sur., 2012). Iako omogućuju izolaciju širokog spektra glikopeptida te su osjetljive i selektivne za glikozilirane strukture, tehnike temeljene na boronatnoj i hidrazinskoj kemiji zahtijevaju skupe materijale i reagense što zasada uvelike otežava njihovu komercijalnu primjenu (Peng i sur., 2018).



Slika 6. Stvaranje kovalentnih veza kod izolacije temeljene na boronatnoj kemiji te nastanak peteročlanih ($X=\emptyset$) i šesteročlanih ($X=CH_2$) cikličkih estera (preuzeto i modificirano iz Ongay i sur., 2012)

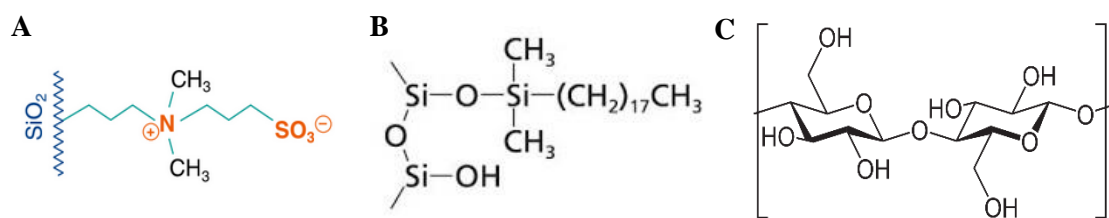
Izolacijske tehnike temeljene na keliranju uvjetovane su prisutnošću atoma koji mogu stvarati koordinativne veze s metalnim ionima primjerice titanija, cirkonija i srebra. U strukturi glikana, kisikovi i dušikovi atomi sa svojim slobodnim elektronskim parom zadovoljavaju taj uvjet. Također, metalni ioni su pozitivno nabijeni što dodatno potpomaže izolaciju glikana koji sadrže negativno nabijene sijalinske kiseline. Budući da elektrostatske interakcije igraju važnu ulogu kod ovakvih tehnika, ne čudi činjenica da je glavna prepreka izolaciji glikopeptida prisutnost negativnije nabijenih fosfopeptida i nešto manje značajna prisutnost peptida s vrlo kiselim aminokiselinama kao što je asparaginska kiselina. Taj problem se vrlo uspješno rješava prethodnom obradom uzorka alkalnom fosfatazom (Chen i sur., 2014).

Hidrofilna i hidrofobna svojstva glikana i glikoproteina su također iskorištena za njihovu izolaciju tehnikom ekstrakcije na čvrstu fazu (engl. solid phase extraction, SPE) upotrebom različitih polarnih i nepolarnih stacionarnih faza. Budući da je peptidni dio onaj koji zapravo pridonosi hidrofobnosti, za izolaciju i pročišćavanje glikopeptida su pogodne i polarne i nepolarne stacionarne faze. S druge strane, slobodni glikani su vrlo hidrofilni pa je njihova izolacija ograničena samo na polarne stacionarne faze. Najkorištenije su HILIC (engl. hydrophilic interaction liquid chromatography) stacionarne faze srodne onima za normalno-faznu tekućinsku kromatografiju (Chen i sur., 2014). S obzirom da se temelje na hidrofilnim interakcijama, pogodne su i za glikopeptide i za slobodne glikane (Zauner i sur., 2011). Do danas je uspješno sintetiziran velik broj HILIC stacionarnih faza koje variraju od čiste ili derivatizirane silike (SiO_2) pa do raznih drugih materijala, a svima su im zajedničke primarno hidrofilne funkcionalne skupine: amidna, amino, diolna, hidroksilna, sulfonatna i mnoge druge (Chen i sur., 2014).

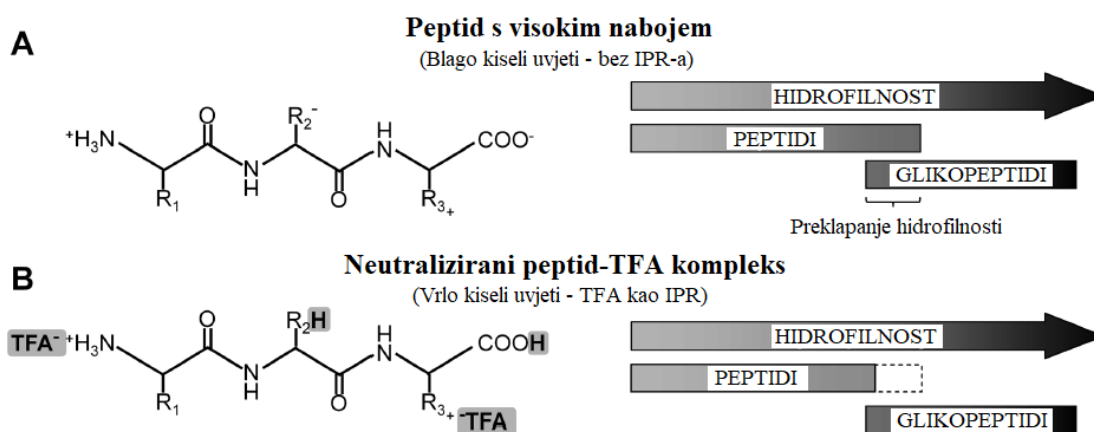
Najčešće korištena faza je ona s amidnim skupinama vezanim na silikagel, međutim, istražuju se različite stacionarne faze i materijali za HILIC koji bi bili selektivniji i optimalniji samo za glikobiološke analize. Među kandidatima su najviše potencijala zasad pokazali oni na ugljikohidratnoj bazi: monosaharidi, polisaharidi, celuloza i ciklodekstrini (Chen i sur., 2014). Celuloza je u prirodi široko rasprostranjen polisaharid građen od molekula D-glukoze linearno povezanih (1,4)- β -glikozidnom vezom. Budući da je građena od monosaharida glukoze, celuloza sadrži velik broj hidroksilnih skupina što u kombinaciji s njenom linearnošću rezultira jako hidrofilnim karakterom i hidracijskim kapacitetom. Upravo takva svojstva omogućuju korištenje celuloze kao HILIC stacionarne faze i njenu upotrebu u svrhu izolacije i separacije hidrofilnih analita kao što su glikani (Peng i sur., 2018). Osim standardnih izvedbi HILIC separacijske tehnike, postoji nekoliko drugih varijacija kao što je zwitterionski HILIC (ZIC-HILIC). Ovakva stacionarna faza nosi i pozitivan i negativan naboj kao što se vidi na primjeru sulfobetaina vezanog za nosač pri čemu dušikov atom (kvarterni amin) nosi pozitivan naboj dok sulfonska skupina nosi negativan (*Slika 7.*) (Ongay i sur., 2012; Qing i sur., 2019). Osim što zbog svoje ionske prirode posjeduju snažan hidracijski kapacitet i mogu održati gusti vodeni sloj uz svoju površinu, ovakve verzije HILIC stacionarnih faza svojim nabojem osiguravaju dodatan mehanizam separacije stvaranjem ionskih parova (Qing i sur., 2019; Chen i sur., 2014). Upravo iz navedenih razloga, upotreba ZIC-HILIC tehnika za izolaciju i pročišćavanje glikana i glikopeptida najčešće rezultira vrlo uspješnom separacijom analita od ostalih sastavnica smjese s pokojom iznimkom. Budući da smjesa iz koje se žele izolirati glikopeptidi može biti vrlo kompleksna, postoji mogućnost da će sadržavati vrlo hidrofilne neglikozilirane peptide. Oni se neće ukloniti, već će se izolirati zajedno s glikopeptidima od interesa zbog preklapanja hidrofilnosti što će u konačnici potencijalno izazvati interferencije prilikom MS detekcije. Uočeno je da se taj problem može učinkovito riješiti dodatkom hidrofobnog reagensa koji stvara ionske parove (engl. ion pairig reagent, IPR), najčešće kiseline kao što su mravlja kiselina (engl. formic acid, FA) ili trifluoroctena kiselina (engl. trifluoroacetic acid, TFA) (Mysling i sur., 2010). S obzirom da hidrofilnost peptida u velikoj mjeri potječe od ioniziranih skupina bočnih lanaca aminokiselina i terminalnih krajeva, dok su kod glikana za to zaslužne neionizirane hidroksilne skupine, dodatak IPR-a u mobilnu fazu će „prekrivanjem“ ioniziranih aminokiselinskih skupina imati veći učinak na neglikozilirane peptide nego na one glikozilirane. Anionski dio IPR-a će tada stvoriti ionski par s pozitivno nabijenim skupinama, dok će kationski dio (vodikov ion nastao disocijacijom kiseline) protonirati negativno nabijene skupine.

Rezultat je smanjenje hidrofilnosti neglikoziliranih peptida u većoj mjeri od onih glikoziliranih što omogućuje njihovo učinkovitije razdvajanje, odnosno uspješnije pročišćavanje glikopeptida (**Slika 8.**) (Mysling i sur. 2010).

Bez obzira na način izvedbe, izolacija i pročišćavanje su neizostavni koraci analize glikana i glikopeptida s obzirom da se nerijetko radi o kompleksim smjesama. Cilj ovog koraka analize je odvojiti glikane ili glikopeptide od ostalih sastavnica koje potencijalno interferiraju u daljnjem postupku, a nakon toga je potrebno razdvojiti glikanske strukture međusobno koristeći različite separacijske tehnike.



Slika 7. Strukture stacionarnih faza korištenih u ovom radu. Zwitterionski sulfobetain vezan za silikagel (A), silikagel funkcionaliziran C18 skupinama (B) i celuloza (C) (preuzeto iz Macherey-Nagel Chromatography, Columns and supplies, <https://www.pharmaguideline.com> i <https://upload.wikimedia.org>).



Slika 8. Predloženi utjecaj TFA na razliku u hidrofilnosti između peptida i glikopeptida. Bez TFA kao IPR-a je prisutno preklapanje u hidrofilnosti (slučaj A), dok je dodatkom TFA to preklapanje smanjeno (slučaj B) (preuzeto i modificirano iz Mysling i sur., 2010).

1.3.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA (LC)

Za separaciju glikana u procesu analize se najčešće koristi tekućinska kromatografija (LC). Ovisno o potrebama i uvjetima analize, ona može biti normalno-fazna ili obrnuto-fazna. Normalno-fazna tekućinska kromatografija (engl. normal-phase liquid chromatography, NP-LC) je karakterizirana polarnom stacionarnom fazom te je kod glikobioloških analiza to najčešće tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC) (Chen i sur., 2014). Iako je HILIC vrlo sličan NP-LC, postoje neke razlike. HILIC se koristi za učinkovito razdvajanje polarnih molekula koje se razdjeljuju između polarne stacionarne faze i u pravilu manje polarne mobilne faze. Koriste se stacionarne faze karakteristične za normalno-faznu LC: čisti silika gel ili silika gel modificiran polarnijim skupinama kao što su npr. amino i amidne. Mobilne faze su pak sličnije onima u obrnuto-faznoj LC gdje je mobilna faza mješavina organskog otapala koji se miješa s vodom, naješće acetonitrila, i vode ili pufera (Chen i sur., 2014; Buszewski i Noga, 2012.). Još jedna razlika normalno-fazne LC i HILIC-a je ta što, iako dolazi do stvaranja vodikovih veza, ionskih interakcija i dipol-dipol interakcija s polarnom stacionarnom fazom, glavni mehanizam separacije je zapravo temeljen na interakciji s molekulama vode koje su zadržane u taknom sloju na površini stacionarne faze pa se kod HILIC-a zapravo radi o razdjeljivanju između vodenog i organskog sloja, a ne adsorpciji na stacionarnu fazu kao što je to inače slučaj (Veillon, 2017; Chen i sur., 2014). Povećanjem udjela vode u mobilnoj fazi, tj. povećanjem polarosti mobilne faze, analiti se eluiraju s kolone redom od najmanje polarnog do najpolarnijeg.

Obrnuto-fazna LC koristi nepolarnu stacionarnu fazu koju čine ugljikovodični lanci različitih duljina vezani na silika gel. Najčešće korištene su C8 i C18 stacionarne faze u kojima su alkilni lanci od osam ili osamnaest ugljikovih atoma vezani na silika gel. Osim linearnih ugljikovodika, nepolarne stacionarne faze mogu činiti različite cikličke i razgranate ugljikovodične strukture ovisno o potrebama analize, dok je mobilna faza smjesa vode i nekog organskog otapala, najčešće acetonitrila ili metanola. Obrnuto-fazna LC se temelji na stvaranju hidrofobnih interakcija analita sa stacionarnom fazom, odnosno adsorpciji analita na stacionarnu fazu. Što je analit manje polaran, to će stvarati jače interakcije sa stacionarnom fazom i retencijsko vrijeme će mu biti veće te je ono uglavnom određeno peptidnim dijelom glikopeptida jer je on taj koji nosi hidrofobna svojstva (Zhu i Desaire, 2015). Separacija se postiže isto kao i kod normalno-fazne LC, mijenjanjem polarosti mobilne faze, ali s razlikom da se u ovom slučaju polarnost smanjuje za vrijeme analize pri čemu najmanje polaran analit eluira zadnji.

1.3.3. HPLC-ESI-MS (spektrometrija masa uz elektroraspršenje uparena s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti)

Nakon što su glikani separirani, moguće ih je zasebno detektirati nekom od metoda detekcije. Jedna od najčešćih u analizi glikana je spektrometrija masa. Analiti se prevode u ionizirano plinovito stanje pri atomsferskom tlaku, uvode pomoću ionske optike u prostor visokog vakuuma te se razdvajaju prema stabilnosti njihovih putanja u oscilirajućem električnom polju kvadrupola na temelju omjera njihove mase i naboja (m/z). Osim kvadrupola, kao analizatori se koriste i instrumenti s magnetnim sektorom, ionske stupice i dr. Spektrometar masa se pojednostavljeno sastoji od izvora iona, analizatora i detektora. Izvor iona je početni dio MS-a u kojem se odvija ionizacija analita i prevođenje u plinovito stanje. Razvijene su različite metode kojima se analit ionizira, a izbor najčešće ovisi o prirodi uzorka i svojstvima samog analita: djelovanje snopa elektrona (engl. electron impact, EI), kemijska ionizacija (engl. chemical ionisation, CI), ionizacija elektroraspršenjem (engl. electrospray ionisation, ESI), matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. matrix-assisted laser desorption ionisation, MALDI). Ionizacija elektroraspršenjem je vrlo česta u glikoproteomici i glikomici jer je pogodna za makromolekule te predstavlja vrlo jednostavan način povezivanja tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa s obzirom da se najčešće radi upravo o takvim kombinacijama separacije i detekcije. Ionizacija se događa *i*) prema modelu ispravanja iona (engl. ion evaporation model, IEM) ili *ii*) modelu nabijenog ostatka (engl. charged residue model, CRM) ovisno o tome jesu li analiti male molekule ili makromolekule te njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Nakon ionizacije, nabijena molekula analita i/ili njegovih fragmenata ulazi u maseni spektrometar koji se sastoji od kvadrupola kojeg čine četiri paralelne hiperbolične metalne šipke. Po dva nasuprotna para šipki su međusobno povezana te se naizmjeničnom primjenom radiofrekvencije (RF) i istosmjerne struje (DC) postiže transport iona niz kvadrupol. Pri datim RF i DC vrijednostima samo će ioni točno određene m/z vrijednosti proći kroz kvadrupol i doći do detektora dok će se ostali zbog nestabilnih putanja sudariti sa šipkama. To omogućuje izolaciju iona točno određene m/z vrijednosti ili pretraživanje (skeniranje) nekog m/z raspona. Izvedba masenog spektrometra koja se sastoji od dva kvadrupola (Q) odijeljena kolizijskom ćelijom (q) naziva se tandemski maseni spektrometar (QqQ). Kod takvog MS-a se ioni odabrani u prvom kvadrupolu sudaraju s inertnim plinom (He, Ar ili N₂) u kolizijskoj ćeliji i dodatno fragmentiraju dajući sekundarne fragmente koji se zatim odabiru i odjeljuju u drugom kvadrupolu. Krajnji cilj ioniziranog analita ili njegovog fragmenta je detektor koji mjeri promjenu napona te ju uzima kao signal dajući spektar masa.

Svaki od navedenih dijelova ima više varijanti koje se međusobno mogu kombinirati, no bez obzira na izvedbu, princip rada masenog spektrometra ostaje isti. U glikoanalitici se najčešće koristi spektrometar masa koji mjeri vrijeme preleta iona (engl. time-of-flight mass spectrometer, TOF-MS) sa ili bez kolizijske ćelije, tj. kao Q-TOF ili Qq-TOF izvedba, jer omogućuje vrlo visoko razlučivanje, točnost izmjerenih m/z vrijednosti i dinamički raspon. Dok Q-TOF omogućuje samo relativno nekontroliranu fragmentaciju u ionskom izvoru (engl. in-source fragmentation), Qq-TOF nudi različite napredne mogućnosti ručno podešene ili automatske fragmentacije željenih iona u kolizijskoj ćeliji.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikozilacija je vrlo kompleksan proces koji rezultira raznolikim repertoarom glikanskih struktura vezanih za proteine i lipide. Kovalentno vezanje glikana za protein ima značajan utjecaj na njegovu strukturu i stabilnost, a posljedično i na funkciju, dok priroda tog utjecaja ovisi o samom glikanu. Velik broj potencijalnih glikanskih struktura dovodi do pojave različitih glikoformi istog proteina pri čemu se one mogu razlikovati u funkcijama, a glikozilacija je zastupljena na više od pola svih eukariotskih proteina. Različite glikoforme ljudskog IgG-a su zastupljene u različitim omjerima ovisno o spolu, dobi, fiziološkom stanju i drugim čimbenicima iz okoliša te se razlikuju od pojedinca do pojedinca. Upravo iz tog razloga, analiza glikanskog profila Fc regije IgG-a može pružiti uvid u stanje organizma te poslužiti kao važan alat i biomarker u dijagnostici, terapiji i personaliziranoj medicini. Preduvjet za to su robusne i visokoprotodne glikomske i glikoproteomske metode.

Uzme li se uz to u obzir i činjenica da su biološki uzorci veoma kompleksni, analiza glikana i glikokonjugata je sukladno tome jako složen proces. Svaka takva analiza je niz koraka od kojih svaki treba biti optimiziran do te mjere da cjelokupna analiza pruža što točnije i pouzdanije podatke kako bi se oni uopće mogli iskoristiti u svrhe znanosti i personalizirane medicine, jer prvi korak do uspješne terapije je pravilna dijagnoza. Kod glikobioloških analiza je to korak izolacije i pročišćavanja glikana i glikopeptida što često uključuje njihovo selektivno vezanje za neki čvrsti nosač čime se omogućuje uklanjanje ostalih sastavnica smjese. Cilj ovog koraka je postići što je moguće selektivnije i kvantitativnije vezanje ciljanog glikana sa što manjim vezanjem drugih molekula. U ovom radu su u tu svrhu ispitane tri različite stacionarne faze te njihove sposobnosti vezanja glikopeptida IgG-a s ciljem njihovog pročišćavanja i naknadne MS analize glikozilacije pojedine podklase: mikrokristalična celuloza, C18 te HILIC stacionarna faza.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORAK IgG-a

Kao uzorak je korištena otopina ljudskog IgG-a (pool) sakupljenog u različitim analizama u glikobiološkom laboratoriju tvrtke Genos d.o.o. Koncentracija IgG-a je iznosila 0,74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. KEMIČALIJE I ENZIMI

Tablica 2. Anorganske i organske kemikalije te enzimi korišteni u ovom radu s navedenim proizvođačima.

Kemikalija	Proizvođač
2-propanol, čistoće za LC-MS	Honeywell
Acetonitril, čistoće za LC-MS	VMR Chemicals
C18 sorbent (CHROMABOND® Sorbent C18)	Macherey-Nagel GmbH & Co.
HILIC sorbent (CHROMABOND® Sorbent HILIC)	Macherey-Nagel GmbH & Co.
Mikrokristalična celuloza, 20-160 μm	Merck
Trifluoroctena kiselina (TFA), p.a.	Honeywell
Tripsin, čistoće za sekvenciranje, liofilizirani	Promega
Ultra-čista voda, $\geq 18 \text{ M}\Omega$	/

3.2.2. INSTRUMENTI

Tablica 3. Instrumenti i oprema korišteni u ovom radu s navedenim proizvođačima.

Instrument	Proizvođač
Vortex mješać	Scientific Industries Inc.
Mini-centrifuga	Labnet International Inc.
Uređaj za ultra-pročišćenu vodu (Direct-Q 3 UV)	Merck Millipore (Merck & Co. Inc.)
Filter pločica (engl. filter plate) i pločica za skupljanje eluata (engl. collection plate) s 96 jažica	Orochem Technologies Inc.
Vakuumski uređaj za pločice (engl. vacuum manifold) i vakuum pumpa	Pall Corporation
Centrifuga	Eppendorf
Magnetna miješalica (MR 3000 D)	Heidolph Instruments GmbH & Co.
Laboratorijska vaga	Mettler Toledo
Rotacijski vakuum koncentrator (miVac)	Genevac Ltd.
Vakuum pumpa za miVac	Thermo Fisher Scientific Inc.
PCR pločica s 96 jažica	STARLAB International GmbH
Ljepljiva folija za zatvaranje pločica	Mettler Toledo
Pipete (jednokanalne i multikanalne)	Rainin, Mettler Toledo
Nastavci za pipete	Rainin, Mettler Toledo
Termalna folija za zatvaranje pločica (Thermal Sealing Foil)	Porvair Sciences Ltd.
Zavarivač za termalne folije (microTS)	Vitl
Laboratorijski inkubator (37.0 °C)	M.R.C. Ltd.
ACQUITY UPLC (tekućinski kromatograf ultra-visoke djelotvornosti)	Waters Corporation
Compact TM Qq-TOF MS (spektrometar masa)	Bruker Daltonik GmbH
C18 Acclaim TM PepMap TM trap kolona	Thermo Fisher Scientific Inc.
HALO C18 kolona	Advanced Materials Technology Inc.
Indikatorski papir, pH 0-14	Merck

3.2.3. OTOPINE I PUFERI

Tablica 4. Otopine korištene u ovom radu i postupci njihove pripreme.

Otopina	Priprema
Otopina tripsina (18 ng μL^{-1})	Resuspendirati 100 μg tripsina u 1 mL pufera za resuspenziju te 200 μL alikvota razrijediti s 900 μL ultra-čiste vode.
80% ACN (acetonitril)	U staklenoj boci pomiješati 80 mL ACN i 20 mL ultra-čiste vode.
0,1% TFA (trifluoroctena kiselina)	U staklenoj boci pomiješati 100 mL ultra-čiste vode i 100 μL TFA.
20% ACN	U staklenoj boci pomiješati 20 mL ACN i 80 mL ultra-čiste vode.
90% ACN	U staklenoj boci pomiješati 90 mL ACN i 10 mL ultra-čiste vode.
90% ACN / 0,1% TFA	U staklenoj boci pomiješati 90 mL ACN, 10 mL ultra-čiste vode i 100 μL TFA.
100% ACN / 0,1% TFA	U staklenoj boci pomiješati 100 mL ACN i 100 μL TFA.
Suspenzija CHROMABOND® C18 adsorbensa (50 mg mL^{-1})	Izvagati 1,5 g CHROMABOND® C18 adsorbensa u staklenoj čaši i dodati 30 mL 80% ACN (izrada objašnjena u ovoj tablici).
Suspenzija CHROMABOND® HILIC adsorbensa (50 mg mL^{-1})	Izvagati 1,5 g CHROMABOND® HILIC adsorbensa u staklenoj čaši i dodati 30 mL 0,1% TFA (izrada objašnjena u ovoj tablici).
Suspenzija mikrokristalične celuloze (5 mg mL^{-1})	Izvagati 150 mg mikrokristalične celuloze i dodati 30 mL ultra-čiste vode.

3.3. TRIPSINIZACIJA UZORKA

U pločicu za prikupljanje s 96 jažica od 1 mL je pipetiran volumen uzorka koji odgovara 25 μg IgG-a. Uzorak korišten u ovom ispitivanju je imao početnu koncentraciju 0,74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ te je pipetirano 34 μL u svaku jažicu. Također su pipetirani slijepi uzorci (tzv. *blank*) kao što je vidljivo u **Tablici 5.** koja prikazuje raspored uzoraka na pločici.

Za slijepe uzorke je korištena ultra-čista voda umjesto IgG-a u istom volumenu, a uloga je kontrola cijelog postupka analize, odnosno provjera dolazi li do kontaminacije i ako da, kakve.

Nakon što su uzorci ispipetirani na pločicu, dodaje se otopina za tripsinizaciju u volumenu od 10 µL u svaku jažicu. Nakon dodatka tripsina, potrebno je provjeriti pH u jažicama pomoću indikatorskog papira i osigurati da je on ≥ 6 kako bi se postigli uvjeti za optimalnu aktivnost tripsina; najveća aktivnost se postiže u pH rasponu 7-9 pri 37 °C.

Nije potrebno provjeravati sve jažice, već je dovoljno nasumično provjeriti nekoliko njih s obzirom da se radi o istom uzorku i istoj otopini za tripsinizaciju u svim jažicama. Ukoliko pH odgovara, pločica se zatvara termalnom folijom, kratko centrifugira kako bi se sve kapljice zaostale na stijenjkama jažica spustile na dno te se pločica zatim stavlja u inkubator na 37 °C tijekom 18h.

Tablica 5. Raspored uzoraka na pločici s 96 jažica (sivo): uzorak IgG-a (prazna ćelija), slijepi uzorak (B), pročišćavanje na HILIC adsorbensu (kolone 1-4), pročišćavanje na celulozi (kolone 5-8), pročišćavanje na C18 adsorbensu (kolone 9-12).

	HILIC (10 mg)				CELULOZA (1 mg)				C18 (10 mg)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B				B				B			
B												
C												
D												
E			B				B				B	
F												
G												
H												

3.4. PRIPREMA ADSORBENSA

Pripremljena suspenzija adsorbensa (C18, HILIC ili celuloza) u čaši s magnetičem je stavljena na magnetnu miješalicu i miješana (~300 o/min) kako bi se postigla jednolična suspenzija tijekom pipetiranja. Postavljena je filter pločica na vakuumski uređaj za pločice te je pipetirano 200 μ L suspenzije pojedinog adsorbensa u svaku od jažica kao što je prikazano u **Tablici 5.**: suspenzija CHROMABOND[®] HILIC adsorbensa je pipetirana u kolone označene brojevima 1-4, suspenzija mikrokristalične celuloze u kolone 5-8, a suspenzija CHROMABOND[®] C18 adsorbensa u kolone 9-12. Preliminarnim pokusima i prema podacima iz literature odabrane su mase od 10 mg C18 i HILIC adsorbensa te 1 mg mikrokristalične celuloze po uzorku odnosno jažici.

Nakon što je u sve jažice dodan adsorbens, uključen je vakuum (1-2 inHg) te je pušteno da tekućina iz svih jažicama oteče. Zatim slijedi kondicioniranje i aktivacija adsorbensa. Jažice u kojima je C18 adsorbens su isprane tri puta s 200 μ L 80% ACN, a nakon toga tri puta s 200 μ L 0,1% TFA. Mikrokristalična celuloza je isprana prvo dva puta s 250 μ L ultra-čiste vode, a zatim tri puta s 250 μ L 90% ACN. Jažice s HILIC adsorbensom su isprane dva puta s 250 μ L 0,1% TFA i nakon toga tri puta s 250 μ L 90% ACN / 0,1% TFA. Nakon svakog nanošenja je tekućina odsisana pomoću vakuuma.

3.5. RAZRJEĐIVANJE I NANOŠENJE UZORAKA

Po završetku tripsinizacije, pločica s uzorcima se izvadi iz inkubatora, kratko zavrti na centrifugi i ukloni se termalna folija za zatvaranje. Tripsinizirani uzorak u jažicama je razrjeđen deset puta ovisno o adsorbensu na kojem će se pročišćavati: kolone 1-4 (HILIC) su razrjeđene s 100% ACN / 0,1% TFA (u konačnici se dobiva 90% ACN jer je razrjeđen s ono malo uzorka koji se već nalazi u jažici), kolone 5-8 (celuloza) s čistim ACN (također se dobiva 90% ACN kao i kod HILIC-a) i kolone 9-12 (C18) su razrjeđene s 0,1% TFA. Budući da se u jažicama nalazi 44 μ L tripsiniziranog uzorka (34 μ L uzorka + 10 μ L otopine za tripsinizaciju), u svaku jažicu je dodano 400 μ L otopine kojom se razrjeđuje kako je prethodno navedeno. Nakon što su uzorci razrjeđeni, nanoseni su u odgovarajuće jažice na filter pločici. Dvije minute su inkubirani s adsorbensom kako bi se postiglo što potpunije vezanje glikopeptida pa se ostatak smjese uzorka uklonio odsisavanjem.

3.6. PROČIŠĆAVANJE

U jažicama je zaostao adsorbens s vezanim glikopeptidima koji je zatim potrebno isprati kako bi se uklonile sve zaostale tvari iz smjese. Kao što je slučaj bio i u prethodnim koracima, ispiranje se provodi s različitim otopinama ovisno o adsorbensu. Cilj ovog koraka je ukloniti onečišćenja, a da se pritom ne eluira analit. To znači da se nepolarne stacionarne faze (C18) na koje su glikopeptidi vezani nepolarnim interakcijama ispiru s polarnom mobilnom fazom, odnosno tri puta s 200 μL 0,1% TFA u ovom slučaju. S druge strane, stacionarne faze koje glikopeptide vežu polarnim interakcijama (celuloza i HILIC) se ispiru s nepolarnim mobilnim fazama koje neće eluirati analit, u ovom slučaju je to dva puta s 250 μL 90% ACN kod celuloze i isto toliko s 90% ACN / 0,1% TFA kod HILIC adsorbensa.

3.7. ELUIRANJE GLIKOPEPTIDA

Analogno pročišćavanju, za eluiranje analita s nepolarne stacionarne faze se koristi nepolarna mobilna faza pa je tako za eluiranje s C18 korišteno 200 μL 20% ACN. S celuloze su se glikopeptidi eluirali s 200 μL ultra-čiste vode, a u slučaju HILIC-a se za to koristilo 200 μL 0,1% TFA. Nakon pipetiranja otopine za eluiranje je smjesa inkubirana 5 minuta kako bi došlo do maksimalnog oslobađanja glikopeptida s adsorbensa. Eluati su sakupljeni u PCR pločicu tako da je filter pločica postavljena na PCR pločicu te su zatim centrifugirane pet minuta pri čemu se brzina centrifuge povećavala od 300 do 800 rpm. U sljedećem koraku su eluati u PCR pločici osušeni u rotacijskom vakuum koncentratoru (miVac), pločica je zatvorena s termalnom folijom te spremljena u frižider na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

3.8. NANO-LC-ESI-QqTOF ANALIZA GLIKOPEPTIDA

Daljnja analiza, odnosno separacija i detekcija, provedene su na nano-LC sustavu ACQUITY UPLC M-class (Waters Corporation, Milford, MA, USA) povezanom s CompactTM QqTOF masenim spektrometrom preko CaptiveSprayTM ESI sučelja s nanoBoosterTM tehnologijom. Osušeni glikopeptidi su otopljeni u 40 μL ultra-čiste vode od čega je 15 μL injektirano na C18 AcclaimTM PepMapTM trap kolonu (5 x 0,3 mm, 5 μm , 100 Å, Thermo Fisher Scientific), odsoljavano pet minuta s protokom od 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 0,1% TFA (v/v) iz pomoćne pumpe i zatim preusmjereno na analitičku kolonu.

Separacija je postignuta na HALO C18 koloni (15 x 0,1 mm, 2,7 μm , Advanced Materials Technology Inc., Wilmington, USA) zagrijanoj na 30 °C. Prije i nakon injektiranja svakog uzorka, *trap* kolona je prvo isprana s 20 μL i-PrOH/ACN (25:75, v/v) a zatim s istim volumenom 95% ACN (v/v). Eluiranje je izvršeno koristeći eksponencijalni gradijent u trajanju od 5 min pri protoku od 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, počevši od 15% eluenta B (0,1% TFA / 80% ACN, v/v) i 85% eluenta A (0,1% TFA, v/v), a završivši na 25% eluenta B i 75% eluenta A. Nakon separacije, kolona je uravnotežena na početne uvjete sa 100% eluenta A kroz četiri minute.

Separirani glikopeptidi su ionizirani koristeći CaptiveSprayTM ESI izvor iona s nanoBoosterTM tehnologijom koja omogućava dovođenje dušika obogaćenog parama acetonitrila kao plina za raspršivanje u ionski izvor.

Time se znatno smanjuje supresija ionizacije uzrokovana trifluorocetenom kiselinom iz mobilne faze i pojačava efikasnost ionizacije glikopeptida što druge izvedbe ionskih izvora ne nude. Način rada je bio pozitivan ionski mod, a spektar je sniman na frekvenciji 2 x 0,5 Hz u rasponu m/z 600-3000. Dušik je dovođen u izvor pod tlakom od 0,2 bara te je isti korišten i kao plin za sušenje zagrijan na 150 °C s protokom 4 L/min i naponom kapilare 1,5 kV. Nano-LC-MS sustav je upravljan putem *otofControl*, *MassLynx* i *Compass HyStar* računalnih programa (v.4.1).

3.9. ODREĐIVANJE GRAVY VRIJEDNOSTI PEPTIDA

Svaki protein je sačinjen od niza aminokiselina koje se mogu razlikovati po svom bočnom lancu, a time i po svojstvima kao što je hidrofobnost. Ukoliko je poznat aminokiselinski slijed u nekom proteinu ili peptidu, moguće je izračunati njegovu prosječnu hidrofobnost (engl. grand average of hydropathy, GRAVY). Za takve izračune se često koriste različiti kalkulatori kao je *GRAVY score* kalkulator (<https://www.bioinformatics.org>) koji koristi vrijednosti definirane skalom koju su predložili Kyte i Doolittle (Kyte i Doolittle, 1982) pri čemu je pridružena ili izračunata vrijednost to pozitivnija što je aminokiselina ili peptid hidrofobniji (*Tablica 6.*).

Tablica 6. Kyte i Doolittle skala vrijednosti hidrofobnosti pridruženih aminokiselinama (vrijednosti preuzete iz Kyte i Doolittle, 1982).

Aminokiselina	Vrijednost	Aminokiselina	Vrijednost	Aminokiselina	Vrijednost
Ala	1,8	Gly	-0,4	Pro	-1,6
Arg	-4,5	His	-3,2	Ser	-0,8
Asn	-3,5	Ile	4,5	Thr	-0,7
Asp	-3,5	Leu	3,8	Trp	-0,9
Cys	2,5	Lys	-3,9	Tyr	-1,3
Gln	-3,5	Met	1,9	Val	4,2
Glu	-3,5	Phe	2,8		

3.10. OBRADA PODATAKA

Podaci su obrađeni koristeći program *LaCyTools* (v.1.0.1) (Jansen i sur., 2016) kojemu su zadani različiti parametri za poravnanje, kalibraciju i ekstrakciju podataka. Lista očekivanih dvostruko, $[M+2H]^{2+}$ i trostruko, $[M+3H]^{3+}$ nabijenih glikopeptida sastavljena je prema glikanima koji čine glikom ljudskog IgG-a. Budući da pri analizi velikog broja uzoraka dolazi do manjih odstupanja u retencijskim vremenima pojedinih analita zbog neujednačenog kromatografskog razdvajanja, svi kromatogrami su najprije automatski poravnati prema opaženom retencijskom vremenu svakog od tri pika u vremenskom prozoru od ± 30 s (ALIGNMENT_TIME_WINDOW). Za poravnavanje je zadano pet tzv. kalibracija, tj. najintenzivnijih signala glikopeptida u svakom piksu koji su morali imati $S/N \geq 9$ i odstupanje u m/z ne veće od ± 0.1 Da. Iz poravnatih kromatograma su ekstrahirani sumirani spektri masa pojedinog pika i kalibrirani na točnu m/z vrijednost slično kao i retencijska vremena. Kalibracija je izvršena s obzirom na tri najintenzivnija signala s razlikom m/z od $\pm 0,5$ Da (CALIB_MASS_WINDOW), omjerom signala i šuma 9 ili manje (CALIB_S_N_CUTOFF) te minimalnim intenzitetom pika koji iznosi 3 (CALIB_MIN_PEAK). Analiti koji su korišteni za poravnanje i/ili kalibraciju su zadani posebnim tablicama (engl. alignment file i reference file).

Rezultati dobiveni na kraju su u obliku .txt dokumenta koji uključuje vrijednosti: apsolutni intenzitet svakog analita, omjer signala i šuma (engl. signal to noise ratio, S/N) i kvalitetu izotopne raspodjele (engl. isotopic pattern quality, IPQ) i to zasebno za svaku podklasu i naboj. Iz tih vrijednosti su zatim izračunati relativni intenziteti i njihovi koeficijenti varijacije (CV) za svaki glikopeptid te za svaku podklasu ovisno o metodi pročišćavanja. Za omjer signala i šuma su također izračunate prosječne vrijednosti za svaku podklasu, kao i za IPQ.

3.11. ANALIZA TROŠKOVA

Visokoprotokna glikoproteomika podrazumijeva automatizaciju eksperimentalnog postupka s ciljem osiguravanja analize što većeg broja uzoraka u što kraćem vremenu, a da pritom ponovljivost bude zadovoljavajuća. S druge strane, glikobiološke analize zbog svoje složenosti uključuju upotrebu različitih materijala širokog raspona cijena što može rezultirati visokim troškovima. Zbog toga se u praksi nastoji osigurati visokoprotoknosti uz minimalno povećanje ili čak smanjenje troškova.

Metode pročišćavanja u ovom radu su, osim na temelju dobivenih rezultata, uspoređene i po financijskim troškovima izračunatim iz nabavnih vrijednosti za pojedine materijale i sirovine korištene prilikom analize (*Tablica 7.*).

Tablica 7. Nabavne cijene materijala i kemikalija korištenih u radu.

Proizvod	Količina	Cijena
C18 sorbent (CHROMABOND® Sorbent C18)	100 g	3.133 kn
Mikrokristalična celuloza	250 g	332 kn
HILIC sorbent (CHROMABOND® Sorbent HILIC)	100 g	3.380 kn
Filter pločica (Orochem) s 96 jažica	1 kom	187 kn
PCR pločica s 96 jažica	1 kom	30 kn
Pločica za sakupljanje eluata (Orochem) s 96 jažica	1 kom	37 kn
Acetonitril, čistoće za LC-MS	1000 mL	715 kn
Trifluoroctena kiselina, p.a.	100 mL	707 kn
Tripsin, čistoće za sekvenciranje, liofilizirani	100 µg	632 kn

4. REZULTATI I RASPRAVA

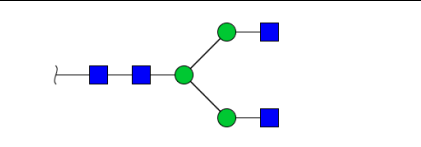
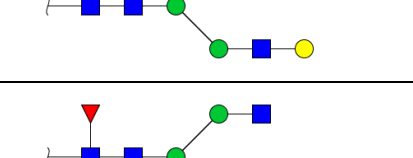
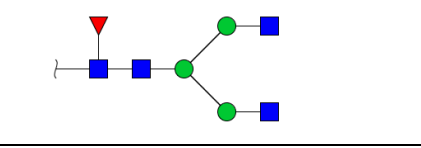
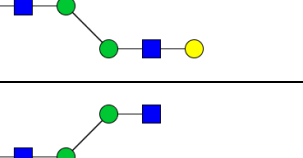
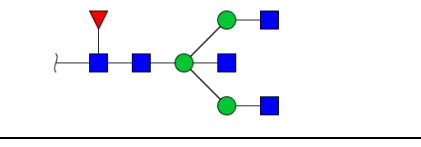
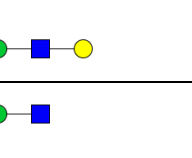
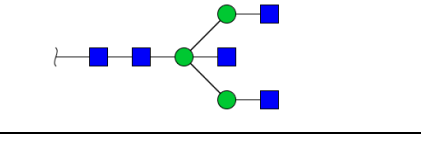
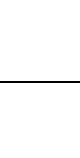
Ovaj diplomski rad je izrađen s ciljem usporedbe pročišćavanja glikopeptida ljudskog IgG-a na tri različite stacionarne faze: celulozi te C18 i HILIC adsorbensu. Prvi korak je bila tripsinizacija koja je rezultirala nastankom glikopeptidne smjese s neglikoziliranim peptidima kao onečišćenjima. Tripsin cijepa veze na točno određenim mjestima u molekuli IgG-a dajući po jedan peptidni fragment s Asn-297 (N₂₉₇) glikozilacijskim mjestom za svaki teški lanac, što znači da jedna molekula IgG-a daje 2 glikopeptida s identičnim aminokiselinskim slijedom. Postoje četiri podklase IgG-a koje se primarno razlikuju u svom proteinskom dijelu i daju različite peptidne fragmente te bi se u teoriji trebala dobiti 4 različita peptida koja nose N-glikozilacijsko mjesto Asn-297, no dobivaju se samo tri. Razlog tomu je poklapanje peptidnog dijela u tripsinizacijom dobivenim glikopeptidima podklase IgG3 s onima podklase IgG2, odnosno IgG4. Naime, IgG3 kod alotipova pokazuje varijaciju u aminokiselini susjednoj N₂₉₇ na N-terminalnoj strani (*podcrtano*) pri čemu kod bijelaca nastaje aminokiselinska sekvenca EEQFN₂₉₇STFR koja je identična onoj IgG2, dok kod azijske i afričke populacije pak nastaje sekvenca EEQYN₂₉₇STFR masom identična onoj IgG4 (Plomp i sur., 2016). Dakle, razlikuju se glikopeptidi s aminokiselinskim slijedovima EEQYN₂₉₇STYR (IgG1), EEQFN₂₉₇STFR (IgG2) te EEQFN₂₉₇STYR (IgG4).

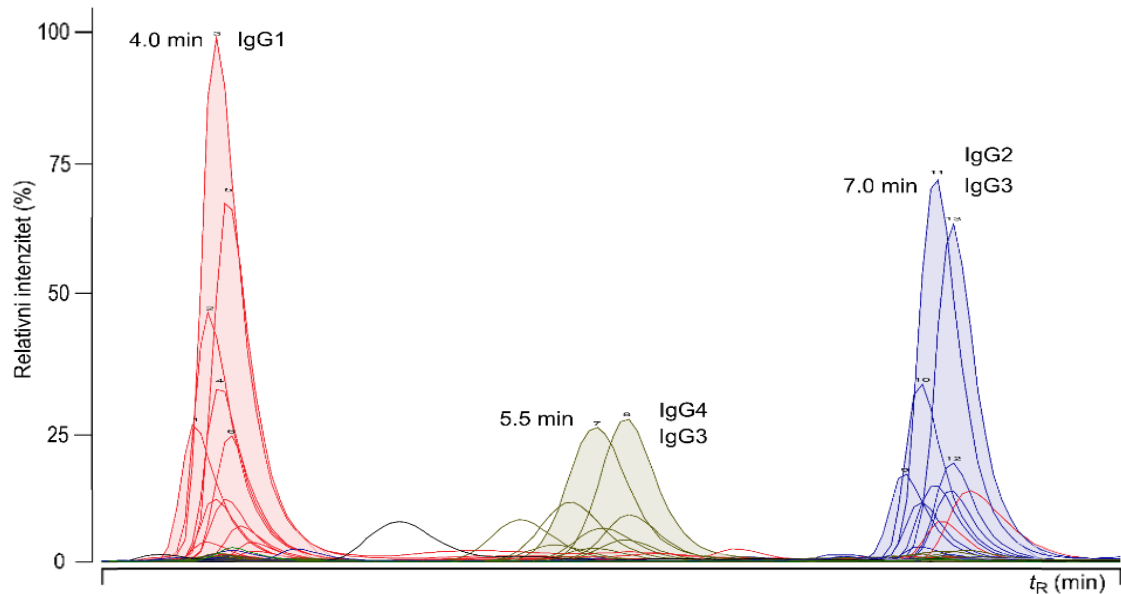
S obzirom da se separacija provodi na koloni punjenoj C18 stacionarnom fazom, glavne interakcije između glikopeptida i stacionarne faze na kojima se temelji odjeljivanje su one hidrofobne prirode, odnosno one gotovo potpuno ovisne o peptidnom dijelu glikopeptida a tek manjim dijelom o glikanskom. Prema tome, kao što se razlikuju 3 peptida koja nose N₂₉₇ glikozilacijsko mjesto, tako se na temelju razlika njihove hidrofobnosti razlikuju i 3 grupacije (klastera) pripadajućih kromatografskih pikova. Svaki klaster je karakteriziran različitim glikanima vezanim za istu aminokiselinsku sekvencu; jednu od ranije navedenih. Prvi eluiraju glikopeptidi podklase IgG1 jer su najmanje hidrofobni. Nakon njih eluiraju glikopeptidi podklase IgG4, a zadnji s kolone eluiraju oni podklase IgG2 s obzirom da su najhidrofobniji od sve tri skupine. Takvo ponašanje glikopeptida prilikom separacije se može predvidjeti izračunavanjem hidrofobnosti koristeći različite formule i kalkulatore koji iz predefiniраниh vrijednosti za svaku aminokiselinu izračunavaju hidrofobnost za ukupnu aminokiselinsku sekvencu od interesa, kao što je već spomenuto u ovom radu. Izračunaju li se vrijednosti hidrofobnosti za gore navedene peptide, uočava se da odgovaraju slijedu njihove elucije s kolone i tim redom iznose: -2,511 za IgG1 (EEQYNSTYR), -2,056 za IgG4 (EEQFNSTYR) te -1,600 za IgG2 (EEQFNSTFR).

Uzorak korišten u ovom radu je smjesa IgG-a iz različitih uzoraka pa je zapravo nepoznato iz kojih sve populacija potječu analizirani glikani te se ne može sa sigurnošću tvrditi koja je aminokiselinska sekvenca glikopeptida IgG3, odnosno nije poznato eluirati li on zajedno s IgG2, IgG4 ili oboje.

Tri su različita peptidna dijela na temelju kojih glikopeptidi eluiraju u 3 grupacije pikova kao što je već spomenuto. S druge strane, na temelju njihovog glikanskog dijela, razlikuje se dvadeset struktura koje je moguće detektirati ovdje korištenom nano-LC-ESI-MS metodom (*Tablica 7.*) (Selman i sur., 2012). Budući da se svih dvadeset detektibilnih glikanskih struktura, iako u različitim i promijenjivim relativnim omjerima, očekuje kod sve tri podklase koje se mogu separirati (IgG1, IgG2 i IgG4), ukupno se radi o šezdeset različitih glikopeptidnih struktura u jednom uzorku (3 različita peptida x 20 različitih glikana = 60 glikopeptida).

Tablica 8. Glikani vezani na Asn-297 (N₂₉₇) glikozilacijsko mjesto imunoglobulina G i detektirani nano-LC-ESI-MS metodom korištenom u ovom radu. Strukture su opisane na temelju broja galaktoza (G0, G1, G2), fukoze (F), rasijecajućeg GlcNAc-a (N) i sijalinske kiseline (S) te simbolima: plavi kvadrat (GlcNAc), zeleni krug (manoz), žuti krug (galaktoza), crveni trokut (fukoza) i ljubičasti romb (sijalinska kiselina).

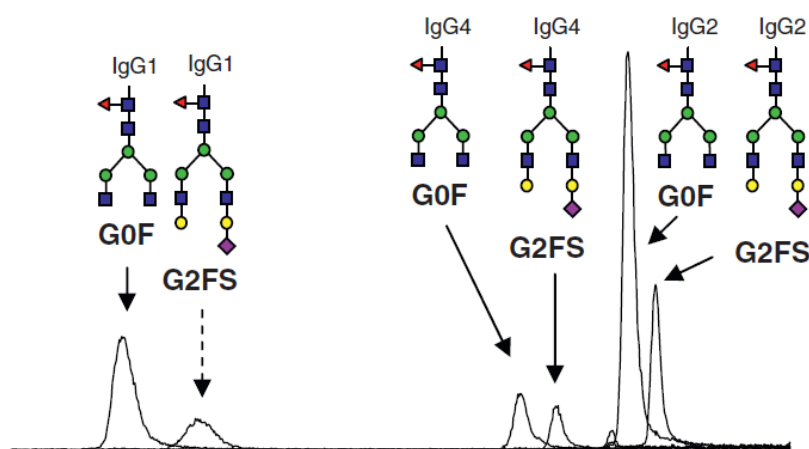
G0		G1NS	
G0F		G1S	
G0FN		G2	
G0N		G2F	
G1		G2FN	
G1F		G2FNS	
G1FN		G2FS	
G1FNS		G2N	
G1FS		G2NS	
G1N		G2S	



Slika 9. Ekstrahirani ionski kromatogrami glikopeptida Fc fragmenta imunoglobulina G dobivenih tripsinizacijom. Prva skupina pikova pripada glikopeptidima podklase IgG1 (retencijsko vrijeme 4 minute). Drugu skupinu pikova čine eluirani glikopeptidi podklase IgG4 (retencijsko vrijeme 5,5 minuta), a treću skupinu glikopeptidi podklase IgG2 (retencijsko vrijeme 7 minuta).

Bez obzira na širok spektar razlika u strukturi glikanskog dijela, on u ovom slučaju ima vrlo mali utjecaj na retencijsko vrijeme glikopeptida upravo zato što su temeljne interakcije pri separaciji hidrofobne prirode s obzirom da se radi o C18 stacionarnoj fazi. Kao što se vidi na **Slici 9.** koja prikazuje ionski kromatogram, svi glikopeptidi određene podklase imaju približno isto retencijsko vrijeme bez obzira na to što nose različite glikanske strukture vezane na isti peptid. Dakle, razlike u strukturama glikana imaju samo blagi utjecaj na vrijeme elucije. Razlog tomu je što različiti šećerni monomeri, iako su svi generalno hidrofilni, pokazuju male razlike u hidrofilnom/hidrofobnom karakteru kao posljedicu različitog broja hidroksilnih skupina te njihove pozicije i orijentacije, ali i nekih drugih skupina hidrofilnog i hidrofobnog karaktera. Posljedično, glikanske strukture također pokazuju razlike u hidrofilnosti što se relativno slabo reflektira na retencijsko vrijeme glikopeptida. Utjecaj strukture glikana na retencijsko vrijeme glikopeptida kod obrnuto-fazne LC je zapravo rezultat interakcija hidrofilnih skupina s mobilnom fazom, ali i nepokrivenim silanolnim skupinama na stacionarnoj fazi.

Većinom se to odnosi na hidroksilne skupine pošto su one najzastupljenije hidrofilne skupine u strukturi glikana. Međutim, skupine s najizraženijom hidrofilnošću su zapravo karboksilne skupine sijalinskih kiselina pa su i sijalinizirani glikani u pravilu vrlo hidrofilne strukture. Ta činjenica ne čudi s obzirom da karboksilne kiseline puno lakše ioniziraju od hidroksilnih skupina. Glikani koji nose sijalinske kiseline u obrnuto-faznoj kromatografiji zapravo eluiraju kasnije od onih nesijaliniziranih (*Slika 10.*), a razlog su izraženije interakcije sa silanolnim skupinama stacionarne faze od onih s mobilnom fazom (Selman i sur., 2012).



Slika 10. Ekstrahirani ionski kromatogrami s istaknutim nesijaliniziranim i sijaliniziranim glikopeptidima. Plavi kvadrat (GlcNAc); zeleni krug (manoz); žuti krug (galaktoza); crveni trokut (fukoza); ljubičasti romb (sijalinska kiselina). Preuzeto i modificirano iz Selman i sur., 2012.

Smanjivanje zaostajanja pikova sijaliniziranih glikopeptida za onim nesijaliniziranim i bolja separacija glikopeptidnih skupina se postiže dodatkom reagensa koji stvara ionske parove (IPR) pri čemu smanjuje ionske interakcije nabijenih karboksilnih skupina sijalinskih kiselina i slobodnih silanolnih skupina stacionarne faze. Selman i sur. (2012) su koristili mravlju kiselinu (FA) kao dodatak mobilnoj fazi pri čemu je postignuta kromatografska separacija glikopeptida IgG-a prikazana ekstrahiranim ionskim kromatogramom na *Slici 10.* Uočava se da mravlja kiselina nije u potpunosti uklonila zaostajanje pikova glikana sa sijalinskom kiselinom u strukturi. Nakon toga je mravlja kiselina zamijenjena trifluorocetenom kiselinom (TFA) pri čemu je zakašnjelo eluiranje sijaliniziranih struktura gotovo potpuno uklonjeno (*rezultati prikazani u radu Selman i sur. 2012.*).

Budući da je TFA ($pK_a=0,23$) jača kiselina od FA ($pK_a=3,74$), izraženija je njena disocijacija i sposobnost stvaranja ionskih parova, toliko da stvara ionske parove i u plinskoj fazi. Prema tome, korištenjem TFA kao IPR-a je osigurano da svi glikopeptidi iste podklase IgG-a eluiraju u približno isto vrijeme, kao što je vidljivo i u ovom radu na **Slici 9**.

Glikopeptidi IgG-a su nakon elucije ionizirani elektroraspršenjem (ESI) i analizirani koristeći Qq-TOF spektrometar masa. Budući da je kao IPR korištena TFA, ionizacija glikopeptida preko ESI sučelja je suprimirana. Razlog tomu je već spomenuta izražena sposobnost TFA da stvara ionske parove čak i sa pozitivno nabijenim analitima u plinovitom stanju pri čemu zapravo maskira i njihov naboj, iako to u ovom slučaju nije od interesa. Kako bi se taj nepoželjni utjecaj smanjio, prilikom elektrosprej ionizacije se koristi struja plinovitog dušika i acetonitrila. Pretpostavljeni mehanizam je otapanje para ACN-a u kapljicama koje nastaju raspršivanjem što potencijalno smanjuje nastajanje adukata TFA i glikopeptida. Također, struja plinova pospješuje desolvataciju te usmjerava mlaz spreja prema ulazu staklene kapilare koja uvodi ione iz izvora i prostora atomosferskog tlaka prema ionskoj optici i tako uz niske protoke karakteristične za nano-LC poboljšava osjetljivost cijelog sustava.

Elektroraspršenje je tehnika ionizacije koja nema ograničenje u masi, odnosno veličini same molekule što ju čini pogodnom za analizu glikopeptida. Temelji se na raspršivanju tekućine djelovanjem napona na vrhu uske kapilare zbog čega je metoda izbora kad je u pitanju kombinacija tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Upravo zbog tih razloga je ESI jedan od najčešće korištenih načina ionizacije u glikobiološkim analizama. Budući da je vrlo blaga (tzv. *soft ionization*) tehnika, proces ionizacije ne dovodi do cijepanja analita te rezultira nastankom strukturno nepromjenjenih kvazimolekulskih iona. Dakle, u ovom se slučaju glikopeptidi ne fragmentiraju, već samo primaju pozitivan naboj. Glikopeptidi su relativno velike molekule pa ESI često rezultira višestruko nabijenim ionskim oblicima zbog čega se istovremeno mogu detektirati i dvostruko $[M+2H]^{2+}$ i trostruko $[M+3H]^{3+}$ nabijene forme istog glikopeptida u formi protonskih adukata. S obzirom da ne dolazi do fragmentiranja, takvi oblici zadržavaju istu masu, ali se razlikuju u naboju zbog čega se javlja signal istog glikopeptida na više različitih m/z vrijednosti u masenom spektru. Uzme li se u obzir da je poznata struktura glikopeptida koji se analiziraju, a time i njihova molekulska masa koja odgovara masi nastalih iona, te da se oni javljaju u dvostruko i trostruko nabijenim oblicima, uvelike je olakšano predviđanje i izračun m/z vrijednosti na kojima se mogu očekivati signali za pojedini glikopeptid (**Tablica 8**).

Iako to vrijedi u većini slučajeva, ipak postoje situacije u kojima se može odrediti m/z vrijednost na kojoj se očekuje signal, no ne i struktura od koje taj signal potječe. Razlog tomu je postojanje glikopeptidnih izomera koji imaju istu molekulsku masu, ali različitu strukturu, pa se ne može sa sigurnošću tvrditi koji izomer daje signal. Međusobno su masom identični glikopeptidi iz različitih podklasa pa se nameće vrlo jednostavno rješenje problema, a to je separacija podklasa prije detekcije što je u ovom slučaju postignuto tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Tablica 9. Teorijske m/z vrijednosti glikopeptida Fc fragmenta humanog IgG-a detektiranih koristeći nano-LC-ESI-MS (preuzeto i modificirano iz Selman i sur., 2012).

Glikan	IgG1 P01857 ^a		IgG2 P01859 ^a		IgG4 P01861 ^a	
	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺
Bez glikana	595.260	397.176	579.265	386.513	587.263	391.844
G0F ^b	1317.527	878.687 ^{c1}	1301.532	868.024	1309.529	873.356 ^{d1}
G1F	1398.553	932.705 ^{c2}	1382.558	922.042	1390.556	927.373 ^{d2}
G2F	1479.580	986.722	1463.585	976.059	1471.582	981.391
G0FN	1419.067	946.380 ^{c3}	1403.072	935.717	1411.069	941.049 ^{d3}
G1FN	1500.093	1000.398 ^{c4}	1484.098	989.735	1492.096	995.066 ^{d4}
G2FN	1581.119	1054.416	1565.125	1043.752	1573.122	1049.084
G1FS	1544.101	1029.737 ^{c5}	1528.106	1019.073	1536.104	1024.405 ^{d5}
G2FS	1625.127	1083.754	1609.133	1073.091	1617.130	1078.423
G1FNS	1645.641	1097.430	1629.646	1086.767	1637.643	1092.098
G2FNS	1726.667	1151.447	1710.672	1140.784	1718.670	1146.116
G0	1244.498	830.001	1228.503	819.338	1236.501	824.670
G1	1325.524	884.019	1309.529	873.356 ^{d1}	1317.527	878.687 ^{c1}
G2	1406.551	938.036	1390.556	927.373 ^{d2}	1398.553	932.705 ^{c2}
G0N	1346.038	897.694	1330.043	887.031	1338.040	892.363
G1N	1427.064	951.712	1411.069	941.049 ^{d3}	1419.067	946.380 ^{c3}
G2N	1508.090	1005.730	1492.096	995.066 ^{d4}	1500.093	1000.398 ^{c4}
G1S	1471.072	981.051	1455.077	970.387	1463.075	975.719
G2S	1552.098	1035.068	1536.104	1024.405 ^{d5}	1544.101	1029.737 ^{c5}
G1NS	1572.612	1048.744	1556.617	1038.081	1564.614	1043.412
G2NS	1653.638	1102.761	1637.643	1092.098	1645.641	1097.430 ^{c6}

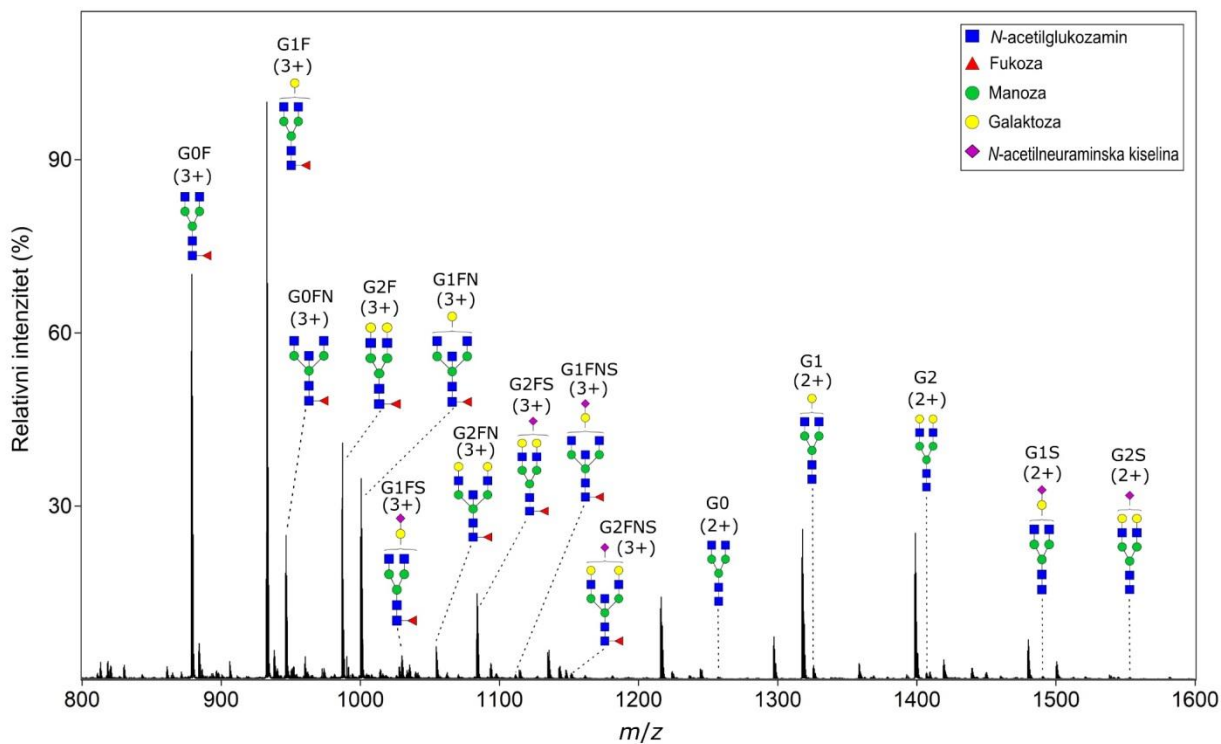
^a Broj u SwissProt bazi.
^b Struktura glikana opisana brojem galaktoza (G0, G1, G2), fukoza (F), rasijećajućeg N-acetilglukozamina (N) i N-acetilneuraminske ili sijalinske kiseline (S)
^{c1-c5} Izomerne glikopeptidne specije podklasa IgG4 i IgG1
^{d1-d5} Izomerne glikopeptidne specije podklasa IgG4 i IgG2

Ionizirani glikopeptidi su detektirani na Qq-TOF analizatoru što je u konačnici rezultiralo ekstrahiranim ionskim kromatogramom za svaki pojedini uzorak kao što je prikazan na *Slici 9*. Svaki pik u takvom kromatogramu odgovara jednom glikopeptidu. Uočljivo je da su neki pikovi vrlo niskog intenziteta, tj. glikopeptidi kojima ti pikovi odgovaraju su slabo zastupljeni u uzorku. Svaka grupacija pikova ima nekoliko glikopeptida koji su za tu podklasu nešto zastupljeniji od ostalih. To je također vidljivo na sumiranim masenim spektrima za svaku skupinu (*Slika 11.*, *Slika 12.* i *Slika 13.*).

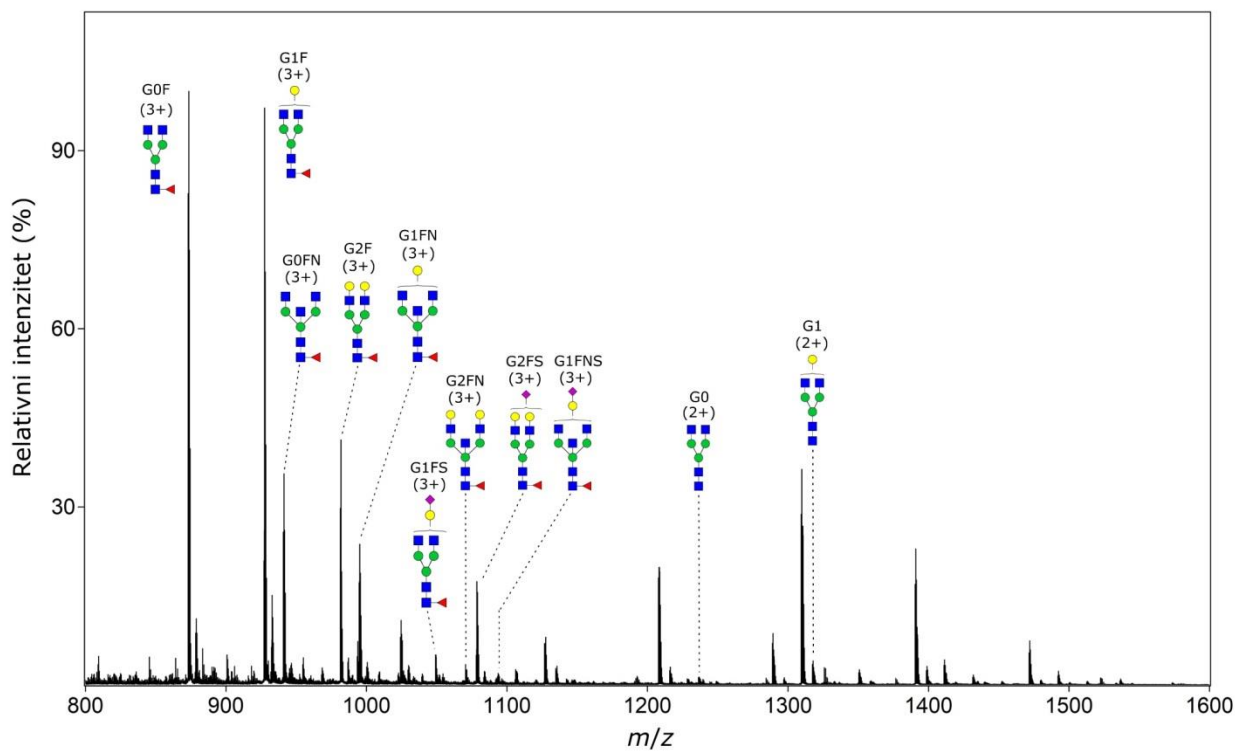
Sumirani spektri pokazuju relativne intenzitete signala unutar jedne skupine pikova kroz cijeli period elucije. Odnosno, za svaku podklasu (IgG1, IgG2 i IgG4) su prikazani relativni intenziteti svih glikopeptida koji su detektirani za vrijeme elucije te podklase, od početka elucije glikopeptida s najkraćim pa sve do kraja elucije glikopeptida s najduljim retencijskim vremenom.

Nakon što su dobiveni podaci detekcijom na masenom spektrometru, provedena je statistička obrada podataka. Pritom je iz apsolutnih površina ispod pikova određena relativna površina za svaki glikopeptid unutar podklase što je ujedno i pokazatelj zastupljenosti tog glikopeptida. Najveći udio u svim podklasama, pa tako i u cijelom uzorku, ima glikan koji u strukturi sadrži četiri heksoze (H), četiri *N*-acetilglukozamina (N) i jednu fukozu (F) – H4N4F1. Budući da se u heksoze u ovom slučaju ubrajaju manoza i galaktoza, a svaki *N*-glikan analiziran u ovom uzorku ima tri manoze koje se nalaze u pentasaharidnoj srži, dolazi se do zaključka da u strukturi najzastupljenijeg glikana postoji jedna galaktoza. Dakle, od svih glikana u analiziranom uzorku navedenom opisu odgovara onaj sa strukturom G1F (*Tablica 7.*) i udjelom koji iznosi oko 20%. Ostali zastupljeniji glikani su prikazani na sumiranim spektrima gdje su nekim pikovima pridružene i odgovarajuće strukture glikanskog dijela glikopeptida.

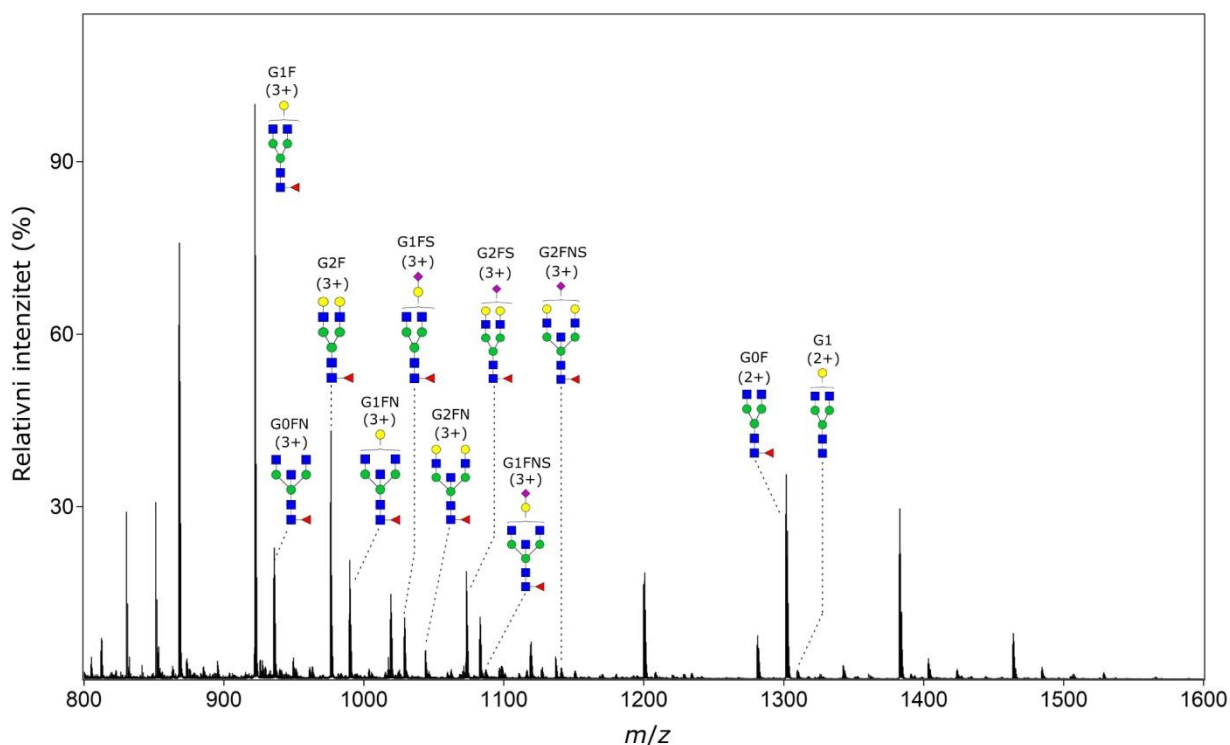
Sijalinska kiselina u strukturi glikana ima tendenciju primiti na sebe naboj što rezultira time da su sijalinizirani glikani najčešće nešto višeg naboja (3+ ili 4+). Upravo takvo ponašanje je vidljivo i u rezultatima ovog rada. Gotovo svi sijalinizirani glikani su trostruko nabijeni dok se dvostruko nabijeni primjećuju u vrlo malom postotku kao i oni četverostruko nabijeni (*nisu označeni na spektrima jer daju vrlo slabe signale*).



Slika 11. Sumirani spektar masa glikopeptida podklase IgG1.

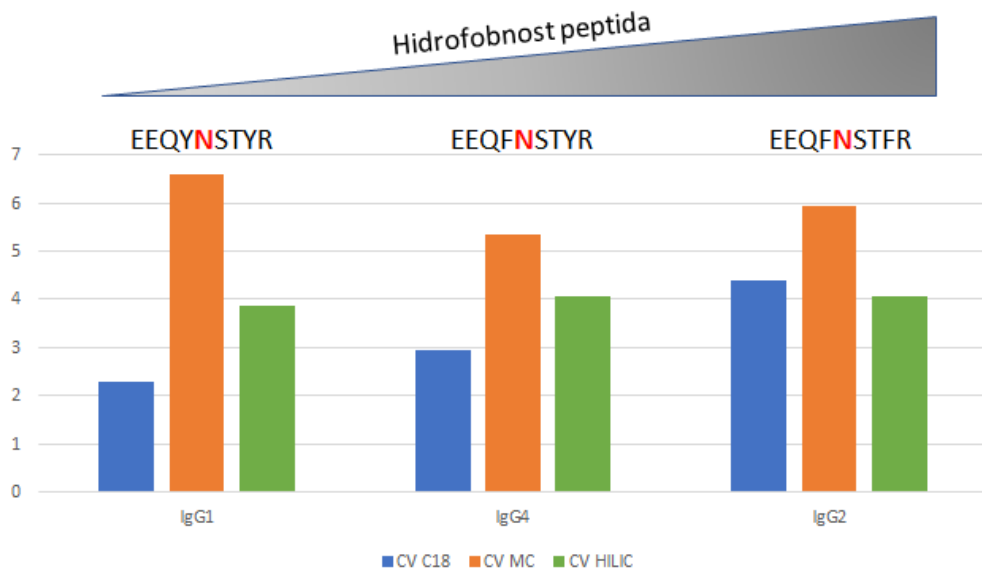


Slika 12. Sumirani spektar masa glikopeptida podklase IgG4.

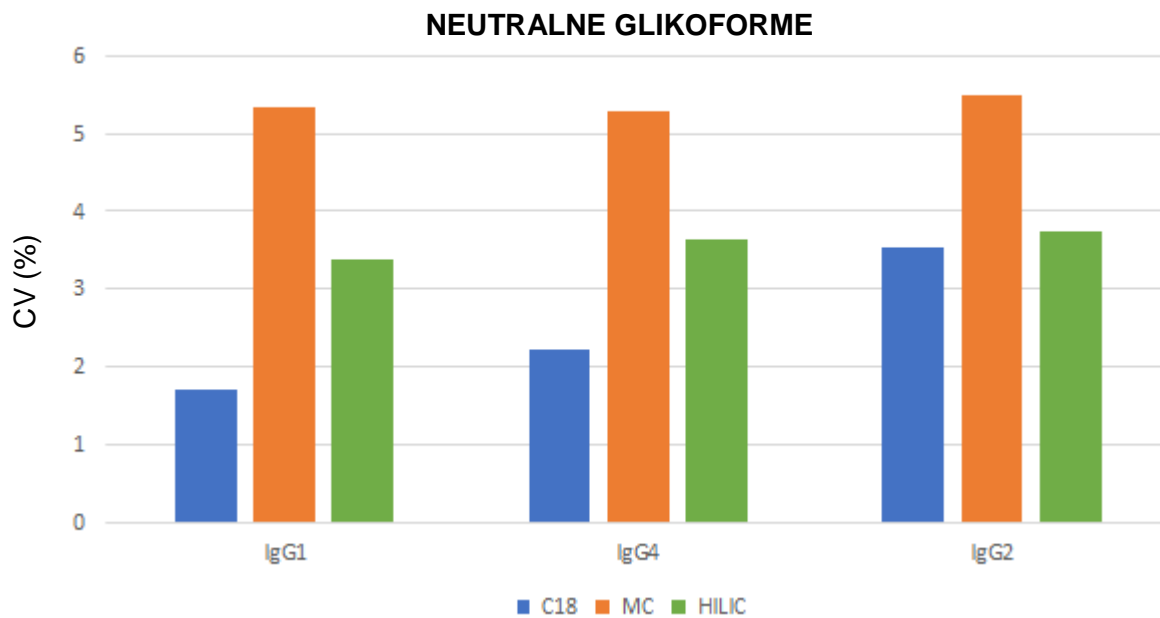


Slika 13. Sumirani spektar masa glikopeptida podklase IgG2.

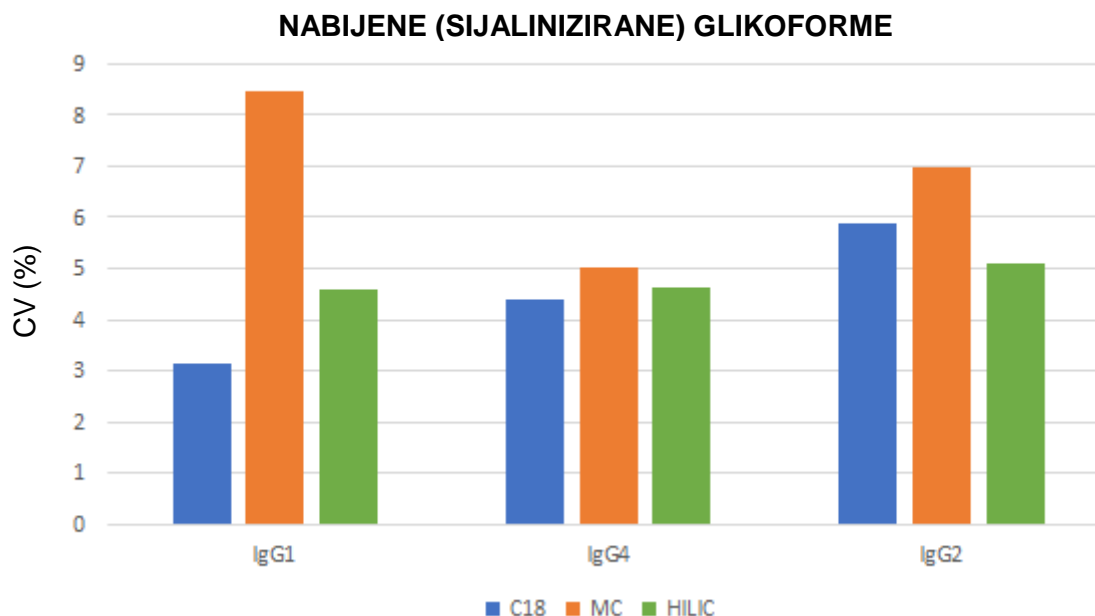
S obzirom na razlike u relativnim intenzitetima pojedinih glikopeptida, izračunati su koeficijenti varijacije za svaki glikopeptid (*Prilog 1.*). Uočeno je da uzorci pročišćavani na mikrokristaličnoj celulozi (MC) imaju relativno visoke koeficijente varijacije (*Slika 14.*). Neutralne glikoforme imaju stabilne vrijednosti koje ne variraju promjenom peptidnog dijela i njegove različite hidrofobnosti (*Slika 15.*), dok nabijeni glikopeptidi (sijalinizirane glikoforme) pokazuju razlike između podklasa, ali bez jasno vidljivog trenda (*Slika 16.*). Razlog tomu potencijalno leži u prirodnoj interakciji između glikopeptida i celuloze koja na svojoj površini ima niz hidroksilnih skupina. Budući da dominiraju hidrofilne interakcije i to pretežito vodikove veze, glavna komponenta koja utječe na vezanje je glikan. S druge strane, peptidni dio ima slab utjecaj na vezanje pa tako i razlike u njegovoj hidrofobnosti nisu od velikog značaja. Objašnjenje zašto nabijeni glikopeptidi pokazuju razlike između podklasa potencijalno leži u činjenici da nije korištena TFA koja bi neutralizirala eventualno prisutne naboje pa dolazi do visoke varijabilnosti u vezanju i otpuštanju glikopeptida s celuloze.



Slika 14. Prosječni koeficijent varijacije (CV) ukupnih glikopeptida po podklasama.



Slika 15. Prosječni koeficijent varijacije (CV) za neutralne glikoforme po podklasama.



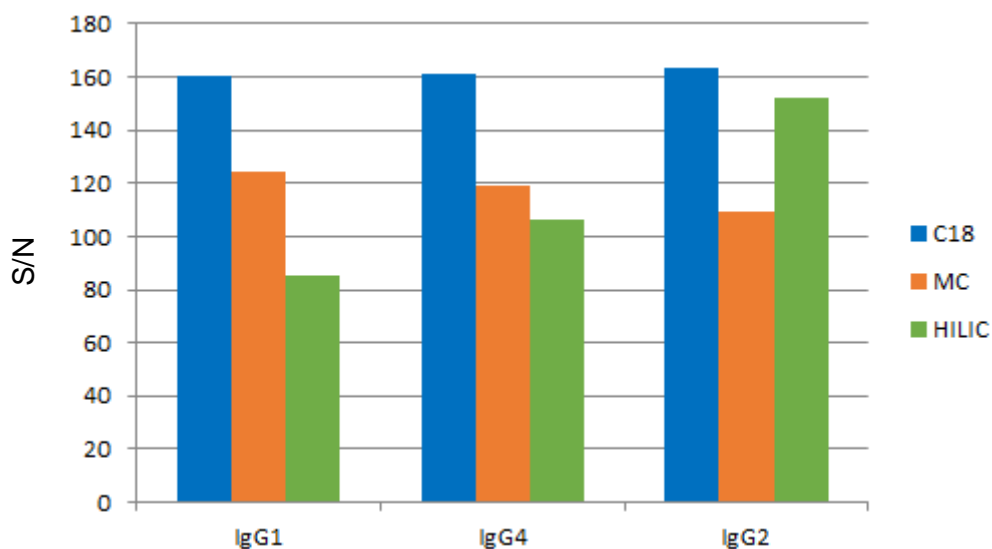
Slika 16. Prosječni koeficijent varijacije za nabijene (sijalinizirane) glikoforme po podklasama.

Pročišćavanje na HILIC adsorbensu pokazuje podjednake vrijednosti koeficijenta varijacije za sve tri podklase, odnosno nema razlika s obzirom na promjenu hidrofobnosti peptida (*Slika 14.*). U ovom je slučaju korištena zwitterionski HILIC adsorbens koji podjednako dobro veže i pozitivno i negativno nabijene analite. Međutim, korištena je TFA pa su naboji na peptidima većinski neutralizirani tako da se glikopeptidi razdvajaju gotovo isključivo na temelju neionskih hidrofilnih interakcija koje potječu od glikanskog dijela strukture. Osim što neutralizira naboj na peptidima, TFA neutralizira i negativan naboj na sijalinskim kiselinama zbog čega su i izvorno nabijeni (sijalinizirani) glikani u ovom slučaju neutralizirani i ponašaju se jednako kao i oni bez sijalinskih kiselina. Takva priroda vezanja je najvjerojatniji razlog zbog kojeg ova metoda pročišćavanja pokazuje konstantan koeficijent varijabilnosti i kod neutralnih i kod sijaliniziranih glikopeptida (*Slika 15.* i *Slika 16.*).

Koeficijent varijacije za C18 adsorbens pokazuje trend rasta s povećanjem hidrofobnosti peptida (*Slika 14.*). Takav je slučaj i kod neutralnih (*Slika 15.*) i kod sijaliniziranih glikoformi (*Slika 16.*). Glikopeptidi se adsorbiraju na C18 stacionarnu fazu putem hidrofobnih interakcija što znači da u ovom slučaju, za razliku od HILIC-a i celuloze, peptidna komponenta glikopeptida igra važnu ulogu u vezanju.

Dodatno, korištena je TFA pa su naboji neutralizirani što objašnjava zašto je trend isti i kod neutralnih i kod sijaliniziranih glikoformi. Jedno od mogućih objašnjenja zašto s povećanjem hidrofobnosti peptida raste i koeficijent varijacije leži u snažnijem vezanju analita za stacionarnu fazu. Naime, elucija pročišćenih glikopeptida se provodi s 20%-tnim ACN-om i postoji mogućnost da je takav udio ACN-a graničan ili čak prenizak da učinkovito eluira sve glikopeptide vezane za C18 adsorbens što rezultira visokim varijacijama dobivenih rezultata. S druge strane, povećanje postotka ACN-a može dovesti do neželjene koelucije hidrofobnijih neglikoziliranih peptida koji bi zatim ometali ionizaciju i detekciju glikopeptida od interesa.

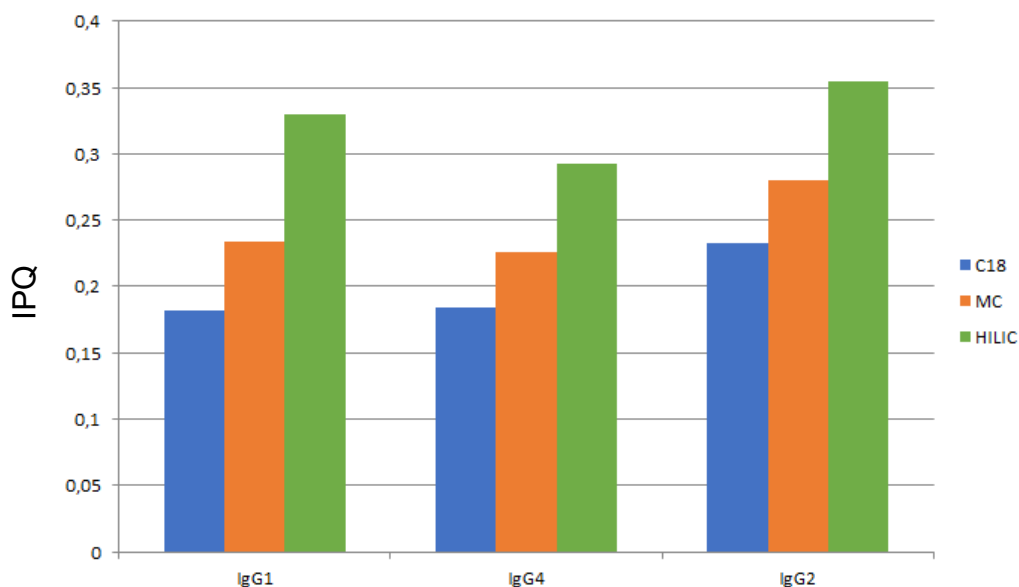
Onečišćenja prisutna u uzorku također daju signale čime najčešće povećavaju neželjeni šum. Što je šum jači, a željeni signal slabiji, to su točnost i preciznost metode manje. Prema tome, cilj je postići što veći omjer signala i šuma (*engl. signal to noise, S/N*). Kod analiza glikopeptida, kao što je i ovdje slučaj, onečišćenja primarno predstavljaju neglikozilirani peptidi koji su se pročistili zajedno s ciljanim glikopeptidima. Izračunate su prosječne vrijednosti S/N za svaki detektirani glikopeptid (**Prilog 2.** i **Prilog 3.**). Najveći S/N je postignut kod uzoraka pročišćavanih na C18 adsorbensu te je približno jednak kod sve tri podklase, odnosno ostaje konstantan promjenom hidrofobnosti peptidnog dijela (**Slika 17.**). Slično ponašanje pokazuje i celuloza, dok je kod HILIC-a primijećen trend rasta koji prati porast hidrofobnosti peptida (**Slika 17.**). Potencijalno objašnjenje za takvu korelaciju proizlazi iz mogućnosti da se vrlo hidrofilni peptidi pročišćavaju i eluiraju s HILIC adsorbensa zajedno s glikopeptidima te se zatim zajedno injektiraju na C18 kromatografsku kolonu. Budući da su generalno hidrofilniji, ti neglikozilirani peptidi će eluirati pri nižim udjelima ACN-a u mobilnoj fazi, tj. eluirati će ranije. Moguće je i da se retencijska vremena neglikoziliranih peptida i glikopeptida djelomično preklapaju pa je šum veći kod hidrofilnijih podskupina kao što je IgG1 i djelomično IgG4. Dakle, peptidna onečišćenja najvećim dijelom eluiraju ranije dok se povećanjem hidrofobnosti mobilne faze njihov udio u eluatu smanjuje čime se smanjuje i njihov negativan utjecaj na S/N.



Slika 17. Prosječni omjer signala i šuma (S/N) po podklasama.

Elementi u prirodi mogu postojati u više izotopnih oblika koji se primarno razlikuju po masi. Ti izotopi mogu biti uklopljeni u strukturu neke veće molekule, najčešće u omjeru u kojem ih nalazimo u prirodi. Odnosno, ako neki izotop čini 1% nekog elementa u prirodi i ako postoji molekula koja ima 100 atoma tog elementa, teoretski barem jedan atom će biti spomenuti izotop. Za svaki element su određene zastupljenosti njegovih izotopa u prirodi što omogućava izračunavanje teoretskog izotopnog obrasca tj. raspodjele (engl. *isotopic pattern*) koji možemo očekivati. U MS analizama to znači da će se javljati pikovi nekog analita na više m/z vrijednosti s obzirom na različite zastupljenosti izotopa elemenata koji čine molekulu tog analita. Ukoliko se dobivene vrijednosti usporede s teoretskom izotopnom raspodjelom, moguće je dobiti postotak varijacije između predviđenog i dobivenog. Ta vrijednost se naziva kvaliteta izotopne raspodjele (*isotopic pattern quality*; IPQ) i može ukazati na čistoću analiziranog uzorka. U ovom slučaju, određivan je IPQ za svaki glikopeptid u uzorku (**Prilog 4.** i **Prilog 5.**). Uočeno je da najmanji (najbolji) IPQ imaju uzorci pročišćavani na C18 adsorbensu, ali i oni pokazuju povećanje vrijednosti s povećanjem hidrofobnosti (**Slika 18.**). Razlog za to je vjerojatno sve manje eluiranje ciljanih glikopeptida, a sve veće eluiranje stranih analita/onečišćenja koje pogoršavaju kvalitetu izotopnog obrasca.

IPQ je generalno lošiji za HILIC i celulozu (*Slika 18.*) što je moguće objasniti paralelnim obogaćivanjem hidrofilnih peptida iz smjese koji pogoršavaju kvalitetu dobivenih rezultata, odnosno IPQ vrijednosti.



Slika 18. Prosječne vrijednosti IPQ po podklasama.

U visokoprotlačnoj glikoproteomici je vrlo važno da rezultati budu pouzdani i točni, ali s obzirom na veliku količinu uzoraka, isto su tako važni i neki drugi parametri analize kao primjerice financijski troškovi i vrijeme potrebno za provedbu same analize. Ukoliko se izračuna potrebna količina svakog korištenog materijala, vrlo lako se dolazi do ukupne cijene za pročišćavanje jednog uzorka, a zatim i cijele jedne pločice od 96 jažica. Kao najjeftinija opcija se pokazala metoda s C18 adsorbensom za koju cijena pročišćavanja cijele pločice od 96 jažica iznosi 441,06 kn (*Tablica 10.*). Nešto skuplja je mikrokristalična celuloza s cijenom 468,02 kn (*Tablica 11.*), a najskuplja je metoda koja koristi HILIC adsorbens s iznosom 502,07 kn po pločici (*Tablica 12.*). Iako su C18 i HILIC adsorbensi slični cijenom i oboje relativno skupi, metoda s C18 zahtijeva daleko manje količine ACN-a što se pokazalo vrlo važnim u financijskom smislu. Isto objašnjenje stoji iza činjenice da je ukupna cijena metode s mikrokristaličnom celulozom veća od one s C18 adsorbensom iako je celuloza u količini potrebnoj za pročišćavanje 96 uzoraka oko 230 puta jeftinija od količine C18 adsorbensa potrebne za isti broj uzoraka. Dakle, od svih materijala i sirovina korištenih u radu, najveći utjecaj na cijenu metode u ovom slučaju ima ACN.

Ukoliko se metode usporede po vremenu trajanja cijelog postupka, pročišćavanje na mikrokristaličnoj celulozi i HILIC adsorbensu traju otprilike jednako jer je u pravilu jedina razlika TFA koja se kod celuloze ne dodaje otopinama. S druge strane, metoda s C18 adsorbensom traje nešto duže jer ima sveukupno više ponovljenih pipetiranja u koracima pripreme adsorbensa i pročišćavanja te također uključuje i obavezni korak sušenja uzoraka prije LC-MS analize zbog prisutnog 20%-tnog ACN kojim se eluira.

Tablica 10. Količine i cijene materijala korištenih u metodi pročišćavanja s C18 adsorbensom te ukupna cijena po jednom uzorku i cijeloj pločici (96 jažica).

Materijal	Količina		Cijena	
	1 uzorak	cijela pločica	1 uzorak	cijela pločica
C18 sorbent (CHROMABOND® Sorbent C18)	0,01 g	0,96 g	0,31 kn	30,08 kn
Acetonitril, čistoće za LC-MS	0,68	65,28 mL	0,49 kn	46,68 kn
Trifluoroctena kiselina, p.a.	0,0016 mL	0,1536 mL	0,01 kn	1,09 kn
Tripsin, čistoće za sekvenciranje, liofilizirani	0,18 µg	17,28 µg	1,14 kn	109,21 kn
Filter pločica (Orochem) s 96 jažica	-	1	-	187,00 kn
PCR pločica s 96 jažica	-	1	-	30,00 kn
Pločica za sakupljanje eluata (Orochem) s 96 jažica	-	1	-	37,00 kn
		UKUPNO:	1,95 kn	441,06 kn

Tablica 11. Količine i cijene materijala korištenih u metodi pročišćavanja s mikrokristaličnom celulozom te ukupna cijena po jednom uzorku i cijeloj pločici.

Materijal	Količina		Cijena	
	1 uzorak	cijela pločica	1 uzorak	cijela pločica
Mikrokristalična celuloza	0,001 g	0,096 g	0,001328 *	0,13 kn
Acetonitril, čistoće za LC-MS	1,525 mL	146,4 mL	1,09 kn	104,68 kn
Trifluoroctena kiselina, p.a.	-	-	-	-
Tripsin, čistoće za sekvenciranje, liofilizirani	0,18 µg	17,28 µg	1,14 kn	109,21 kn
Filter pločica (Orochem) s 96 jažica	-	1	-	187,00 kn
PCR pločica s 96 jažica	-	1	-	30,00 kn
Pločica za sakupljanje eluata (Orochem) s 96 jažica	-	1	-	37,00 kn
		UKUPNO:	2,23 kn	468,02 kn

Tablica 12. Količine i cijene materijala korištenih u metodi pročišćavanja s HILIC adsorbensom te ukupna cijena po jednom uzorku i cijeloj pločici.

Materijal	Količina		Cijena	
	1 uzorak	cijela pločica	1 uzorak	cijela pločica
HILIC sorbent (CHROMABOND® Sorbent HILIC)	0,01 g	0,96 g	0,34 kn	32,45 kn
Acetonitril, čistoće za LC-MS	1,525 mL	146,4 mL	1,09 kn	104,68 kn
Trifluoroctena kiselina, p.a.	0,00255 mL	0,2448 mL	0,02 kn	1,73 kn
Tripsin, čistoće za sekvenciranje, liofilizirani	0,18 µg	17,28 µg	1,14 kn	109,21 kn
Filter pločica (Orochem) s 96 jažica	-	1	-	187,00 kn
PCR pločica s 96 jažica	-	1	-	30,00 kn
Pločica za sakupljanje eluata (Orochem) s 96 jažica	-	1	-	37,00 kn
		UKUPNO:	2,59 kn	502,07 kn

5. ZAKLJUČAK

Glikopeptidi Fc fragmenta dobiveni tripsinizacijom humanog imunoglobulina G su u ovom radu pročišćavani na tri različita adsorbensa i zatim analizirani nano-LC-ESI-MS metodom. Separirano je i uspješno detektirano 60 glikopeptida dobivenih kombinacijom dvadeset različitih glikana vezanih za tri različita peptida. Svaki peptid potječe od jedne podklase IgG-a (IgG1, IgG2 i IgG4) dok je onaj podklase IgG3 identičan onima podklasa IgG2 i/ili IgG4. Uspoređivani su koeficijenti varijacije (CV), omjer signala i šuma (S/N) te kvaliteta izotopnog obrasca (IPQ).

Utvrđeno je da pročišćavanje na C18 adsorbensu daje najbolje rezultate za sve tri promatrane vrijednosti, no pokazuje ovisnost o hidrofobnosti peptidne komponente glikopeptida po pitanju CV i IPQ. Celuloza se pokazala najvarijabilnijom u dvije od tri kategorije (CV i IPQ) bez očitih trendova i ovisnosti o podklasi, tj. hidrofobnosti peptida. Međutim, iako vrlo varijabilna, pokazuje relativno stabilne S/N vrijednosti u sve tri podklase. Pročišćavanje na HILIC adsorbensu pokazuje gotovo suprotne trendove od C18 adsorbensa pri čemu su vrijednosti CV relativno stabilne i konstantne dok je S/N vrijednost ovisna o peptidnoj komponenti, odnosno raste s porastom hidrofobnosti.

Financijski gledano, pročišćavanje na C18 adsorbensu se pokazalo najisplativijim zbog malih količina ACN-a koji ima izražen utjecaj na cijenu cijelog postupka. Metoda koja koristi mikrokristaličnu celulozu je nešto skuplja, ali je prednost te metode što ne koristi TFA pa je rizik od gubitka analita uslijed hidrolize nešto niži nego kod ostale dvije metode. Najskuplja opcija se pokazalo pročišćavanje na HILIC adsorbensu. S druge strane, metoda s C18 adsorbensom je vremenski gledano najmanje pogodan odabir jer cijeli postupak traje duže od onog s HILIC adsorbensom ili mikrokristaličnom celulozom. Razlog tomu je sveukupno veći broj pipetiranja i obavezno sušenje uzorka prije analize LC-MS metodom.

6. LITERATURA

Ando T, Imamura A, Ishida H, Kiso M. Synthesis of Glycolipids. U: Comprehensive Glycoscience, From Chemistry to Systems Biology. Kamerling JP, Boons G-J, Lee YC, Suzuki A, Taniguchi N, Voragen AGJ, urednici, Utrecht, Elsevier, 2007, 1, 797-813.

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473, 4-8.

Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25, 21–50.

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

Chen CC, Su WC, Huang BY, Chen YJ, Tai HC, Obena RP. Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment. *Analyst*, 2014, 139, 688-704.

Chen JK, Shen CR, Liu CL. *N*-Acetylglucosamine: Production and Applications. *Mar Drugs* 2010, 8, 2493-2516.

Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins — Implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820, 1318-26.

Jansen BC, Falck D, de Haan N, L. Hipgrave Ederveen A, Razdorov G, Lauc G, Wührer M. LaCyTools – a targeted LC-MS data processing package for relative quantitation of glycopeptides. *J Proteome Res*, 2016, 15, 2198-2210.

Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature*, 2009, 8, 226-234.

Jerry Eichler. Protein Glycosylation. *Curr Biol*, 2019, 29, R225-R240.

Keser T. Influence of genetic and environmental factors on N-glycosylation of immunoglobulin G and total plasma proteins determined by twin study. Doktorski rad, 2016.

Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe*, 2009, 5, 580-592.

Kyte D, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157, 105-132.

Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1860, 1574-1582.

Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation—an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst*, 2010, 6, 2373-2379.

Macherey-Nagel Catalog Chromatography (EN). URL: <https://www.mn-net.com/media/pdf/51/5e/04/Catalog-Chromatography-EN.pdf>

Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn, AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13, 448-462.

Mysling S, Palmisano G, Højrup P, Thaysen-Andersen M. Utilizing Ion-Pairing Hydrophilic Interaction Chromatography Solid Phase Extraction for Efficient Glycopeptide Enrichment in Glycoproteomics. *Anal Chem*, 2010, 82, 5598-5609.

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

Ongay S, Boichenko A, Govorukhina N, Bischoff R. Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *J Sep Sci*, 2012, 35, 2341-2372.

Pang PC, Chiu PCN, Lee CL, Chang LY, Panico M, Morris HR, Haslam SM, Khoo KH, Clark GF, Yeung WSB, Dell A. Human Sperm Binding Is Mediated by the Sialyl-Lewis^x Oligosaccharide on the Zona Pellucida. *Science*, 2011, 333, 1761-1764.

Peng Y, Lv J, Yang L, Wang D, Zhang Y, Lu H. A streamlined strategy for rapid and selective analysis of serum N-glycome. *Anal Chim Acta*, 2018, 1050, 80-87.

Plomp R, Bondt A, de Haan N, Rombouts Y, Wuhler M. Recent advances in clinical glycoproteomics of immunoglobulins. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15, 2217-2228.

Pučić Baković M. Variability and heritability of immunoglobulin G glycosylation. Doktorski rad, 2013.

Qing G, Yan J, He X, Li X, Liang X. Recent advances in hydrophilic interaction liquid interaction chromatography materials for glycopeptide enrichment and glycan separation. *Trac-Trend Anal Chem*, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.020>

Reusch D, Tejada ML. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes (CQAs). *Glycobiology*, 2015, 25(12), 1325-1334.

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

Selman MH, Derks RJE, Bondt A, Palmblad M, Schoenmaker B, Koeleman CAM, van de Geijn F, Dolhain RJEM, Deelder AM, Wuhrer M. Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. *J Proteomics*, 2012, 75, 1318-1329.

Springer SA, Gagneux P. Glycomics: Revealing the Dynamic Ecology and Evolution of Sugar Molecules. *J Proteomics*, 2016, 135, 90-100.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ Jr. Biochemistry, 7th edition. New York, W.H. Freeman and Company, 2012.

<http://goldbook.iupac.org/terms/view/G02645> (pristupljeno 12.5.2020.)

https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html (pristupljeno 20.7.2020.)

<https://www.pharmaguideline.com/2018/05/difference-between-c8-and-c18-columns.html#gsc.tab=0> (pristupljeno 13.08.2020.)

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/07/Cellulose_Sessel.svg (pristupljeno 13.08.2020.)

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH. Essentials of Glycobiology, 3rd

edition. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2015-2017. At <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/>

Varki A. Biological Roles of Glycans. *Glycobiology*, 2017, 27, 3–49.

Veillon L, Huang Y, Peng W, Dong X, Cho BG, Mechref Y. Characterization of Isomeric Glycan Structures by LC-MS/MS. *Electrophoresis*, 2017, 38, 2100-2114.

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

Yamada E, Tsukamoto Y, Sasaki R, Yagyu K, Takahashi N. Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconjugate J*, 1997, 14, 401-405.

Yang S, Zhang H. Solid-phase glycan isolation for glycomics analysis. *Proteomics Clin Appl*, 2012, 6, 596-608.

Zauner G, Deelder AM, Wuhrer M. Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*, 2011, 32, 3456-3466.

Zhu Z, Desaire H. Carbohydrates on Proteins: Site-Specific Glycosylation Analysis by Mass Spectrometry. *Annu Rev Anal Chem*, 2015, 8, 20.1-20.21.

7. SAŽETAK

Glikozilacija Fc fragmenta humanog imunoglobulina G je vrlo raznolika te varijabilna s obzirom na različite vanjske i unutarnje utjecaje na organizam. Iz tog razloga se promjene u glikozilaciji i glikanskim profilima intenzivno istražuju te povezuju s različitim stanjima i bolestima kako bi poslužile kao potencijalni biomarkeri u dijagnostici ili mete u terapiji. Za osiguravanje ispravnih zaključaka potrebni su pouzdani i točni podaci dobiveni iz glikobioloških analiza. Budući da takve analize najčešće podrazumijevaju složene biološke uzorke u kojima su analiti od interesa u vrlo malim količinama, korak pročišćavanja u procesu analize igra vrlo važnu ulogu.

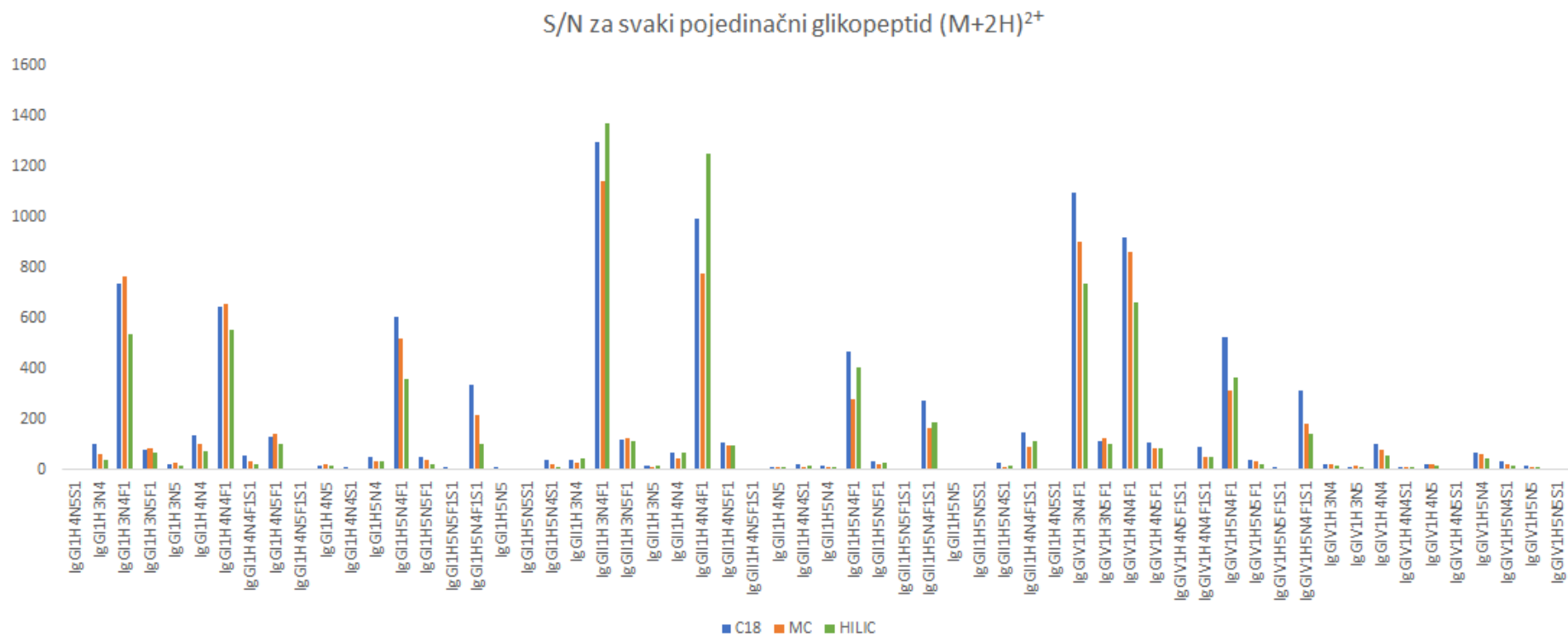
U ovom su radu uspoređene tri metode pročišćavanja s ciljem dobivanja što konzistentnijih i točnijih rezultata analize glikopeptida Fc fragmenta humanog imunoglobulina G dobivenih tripsinizacijom. Uzorak je pročišćavan na tri stacionarne faze: mikrokristaličnoj celulozi te C18 i HILIC adsorbensu. Nakon pročišćavanja su eluati analizirani LC-MS metodom pri čemu su dobiveni ekstrahirani ionski kromatogrami s tri grupacije pikova koje odgovaraju podklasama IgG1, IgG2 i IgG4. Iz svake grupacije su također dobiveni sumirani maseni spektri glikana u uzorku. Detektirano je dvadeset glikana vezanih za tri različita peptida, dakle sveukupno šezdeset različitih glikopeptida. Daljnjom analizom podataka programom *LaCyTools* (v.1.0.1) su dobiveni podaci o relativnoj zastupljenosti svakog glikopeptida, omjeru signala i šuma te kvaliteti izotopne raspodjele. Metoda s C18 adsorbensom pokazuje najbolje rezultate u svim promatranim kategorijama, a kao najvarijabilnijom se pokazala mikrokristalična celuloza. Također je utvrđeno da je pročišćavanje na C18 adsorbensu financijski najisplativije i vremenski najduže, dok je HILIC najskuplja opcija, ali nešto kraća po trajanju.

8. SUMMARY

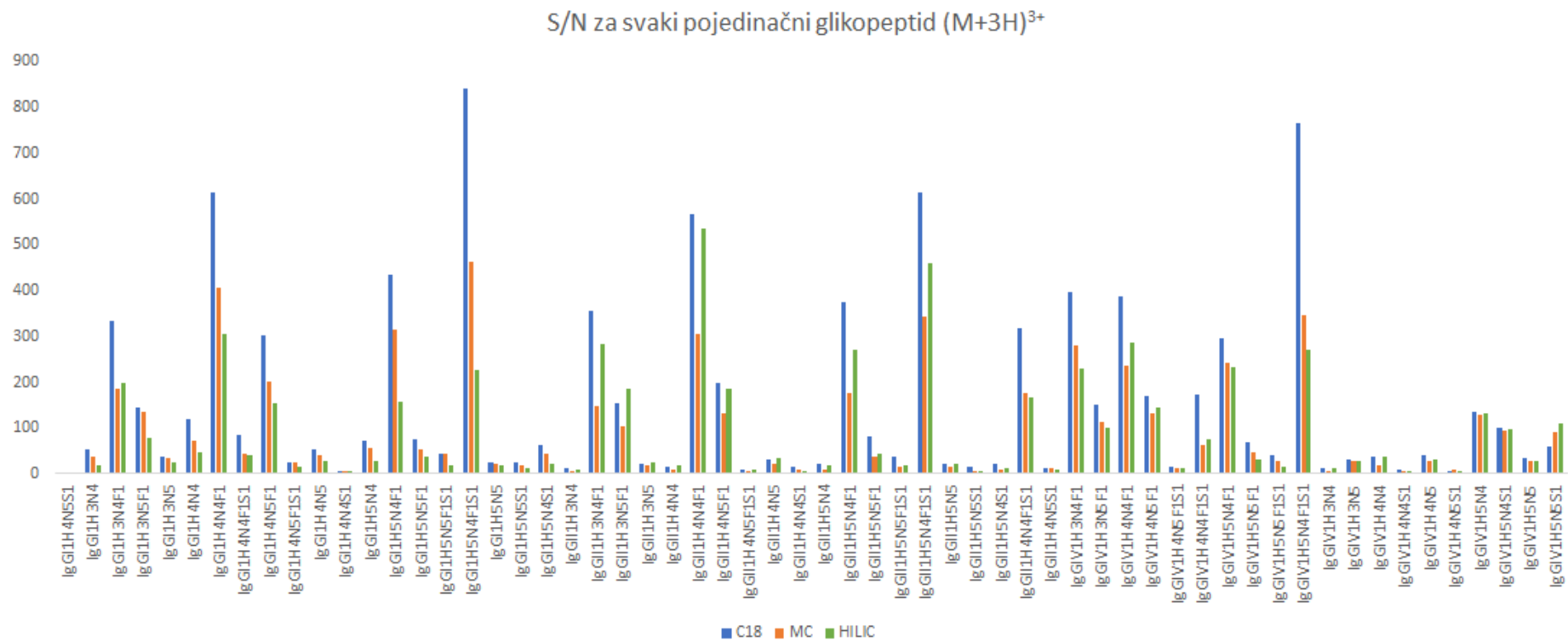
The glycosylation of the Fc fragment of human immunoglobulin G is very diverse and variable depending on different external and internal influences on the organism. For this reason, changes in glycosylation and glycan profiles are intensively investigated and linked to various conditions and diseases to serve as potential biomarkers in diagnosis or targets in therapy. Reliable and accurate data obtained from glycobiological analyzes are required to ensure correct conclusions. Since such analyzes most often involve complex biological samples in which the analytes of interest are in very small quantities, the purification step plays a very important role in the analysis process.

In this paper, three purification methods are compared in order to obtain the most consistent and accurate results of the analysis of glycopeptides of the Fc fragment of human immunoglobulin G obtained by trypsinization. The sample was purified on three stationary phases: microcrystalline cellulose and C18 and HILIC adsorbent. After purification, the eluates were analyzed by the LC-MS method to give extracted ion chromatograms with three groups of peaks corresponding to the IgG1, IgG2 and IgG4 subclasses. Summarized glycan mass spectra were also obtained from each group. Twenty glycans bound to three different peptides were detected, ie a total of sixty different glycopeptides. Further analysis of the data by *LaCyTools (v.1.0.1)* yielded data on the relative presence of each glycopeptide, the signal-to-noise ratio, and the quality of the isotope distribution. The C18 adsorbent method shows the best results in all observed categories, and microcrystalline cellulose proved to be the most variable. Purification on C18 adsorbent was also found to be the most cost-effective, while HILIC was the most expensive option, but somewhat shorter in duration.

9. PRILOZI

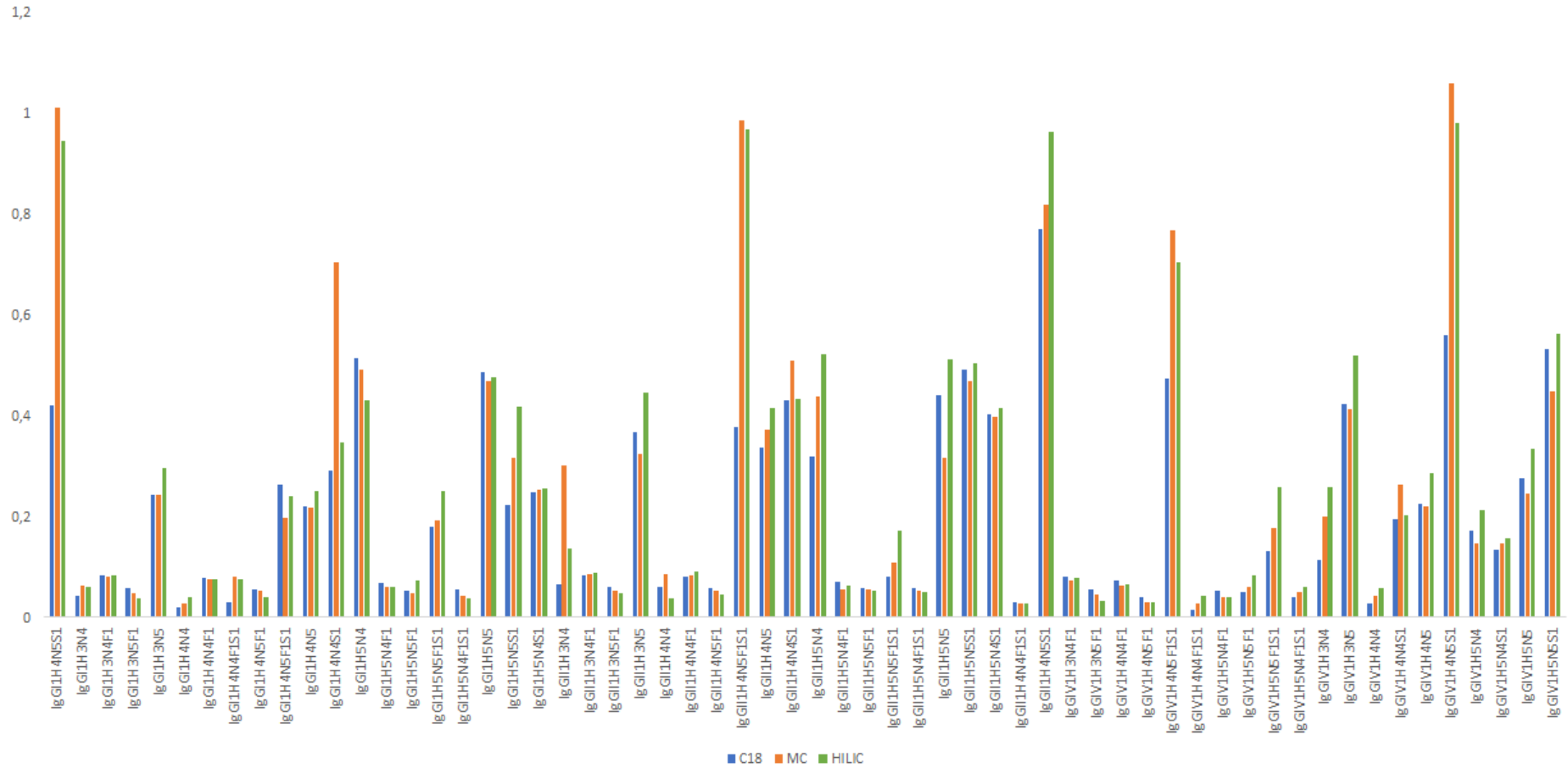


Prilog 2. Prosječni S/N za svaki pojedinačni glikopeptid u dvostruko nabijenom ionskom obliku.



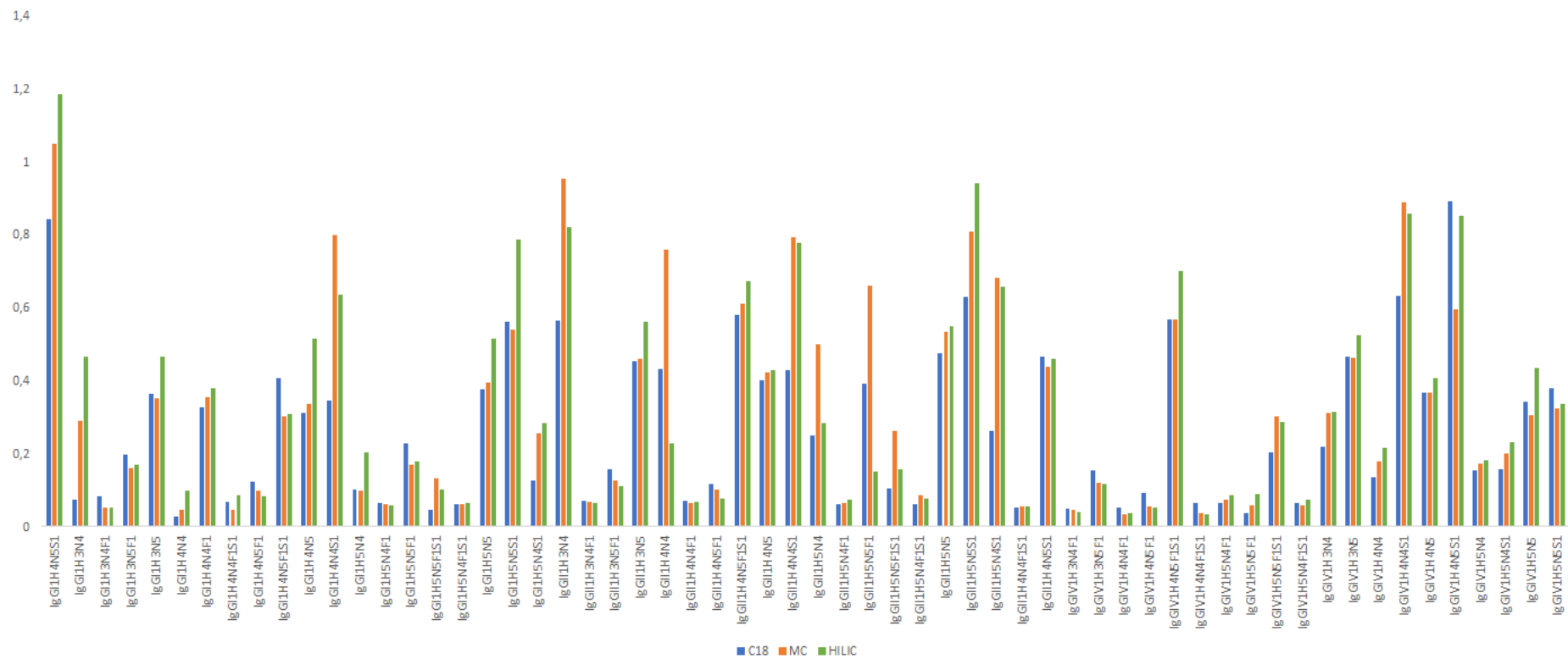
Prilog 3. Prosječni S/N za svaki pojedinačni glikopeptid u trostruko nabijenom ionskom obliku.

IPQ za svaki pojedinačni glikopeptid (M+2H)²⁺



Prilog 4. Prosječni IPQ za svaki pojedinačni glikopeptid u dvostruko nabijenom ionskom obliku.

IPQ za svaki pojedinačni glikopeptid (M+3H)³⁺



Prilog 5. Prosječni IPQ za svaki pojedinačni glikopeptid u trostruko nabijenom ionskom obliku.

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 MIKROKRISTALIČNE CELULOZE, C18 TE HILIC ADSORBENSA U SVRHU PROČIŠĆAVANJA GLIKOPEPTIDA LJUDSKOG IMUNOGLOBULINA G ZA VISOKOPROTOČNU GLIKOPROTEOMIKU

Dario Gnjilac

SAŽETAK

Glikozilacija Fc fragmenta humanog imunoglobulina G je vrlo raznolika te varijabilna s obzirom na različite vanjske i unutarnje utjecaje na organizam. Iz tog razloga se promjene u glikozilaciji i glikanskim profilima intenzivno istražuju te povezuju s različitim stanjima i bolestima kako bi poslužile kao potencijalni biomarkeri u dijagnostici ili mete u terapiji. Za osiguravanje ispravnih zaključaka potrebni su pouzdani i točni podaci dobiveni iz glikobioloških analiza. Budući da takve analize najčešće podrazumijevaju složene biološke uzorke u kojima su analiti od interesa u vrlo malim količinama, korak pročišćavanja u procesu analize igra vrlo važnu ulogu.

U ovom su radu uspoređene tri metode pročišćavanja s ciljem dobivanja što konzistentnijih i točnijih rezultata analize glikopeptida Fc fragmenta humanog imunoglobulina G dobivenih tripsinizacijom. Uzorak je pročišćavan na tri stacionarne faze: mikrokristaličnoj celulozi te C18 i HILIC adsorbensu. Nakon pročišćavanja su eluati analizirani LC-MS metodom pri čemu su dobiveni ekstrahirani ionski kromatogrami s tri grupacije pikova koje odgovaraju podklasama IgG1, IgG2 i IgG4. Iz svake grupacije su također dobiveni sumirani maseni spektri glikana u uzorku. Detektirano je dvadeset glikana vezanih za tri različita peptida, dakle sveukupno šezdeset različitih glikopeptida. Daljnjom analizom podataka programom LaCyTools (v.1.0.1) su dobiveni podaci o relativnoj zastupljenosti svakog glikopeptida, omjeru signala i šuma te kvaliteti izotopne raspodjele. Metoda s C18 adsorbensom pokazuje najbolje rezultate u svim promatranim kategorijama, a kao najvarijabilnijom se pokazala mikrokristalična celuloza. Također je utvrđeno da je pročišćavanje na C18 adsorbensu financijski najisplativije i vremenski najduže, dok je HILIC najskuplja opcija, ali nešto kraća po trajanju.

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

Rad sadrži: 66 stranica, 23 grafička prikaza, 12 tablica i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pročišćavanje, C18, HILIC, mikrokristalična celuloza, LC-MS, glikopeptidi, ljudski IgG

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

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

Dr. sc. Lidija Bach Rojceky, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Jasna Jablan, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

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 MICROCRYSTALLINE CELLULOSE, C18 AND HILIC ADSORBENTS FOR THE PURPOSE OF PURIFICATION OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN G GLYCOPEPTIDES FOR HIGH-THROUGHPUT GLYCOPROTEOMICS

Dario Gnjilac

SUMMARY

The glycosylation of the Fc fragment of human immunoglobulin G is very diverse and variable depending on different external and internal influences on the organism. For this reason, changes in glycosylation and glycan profiles are intensively investigated and linked to various conditions and diseases to serve as potential biomarkers in diagnosis or targets in therapy. Reliable and accurate data obtained from glycobiological analyzes are required to ensure correct conclusions. Since such analyzes most often involve complex biological samples in which the analytes of interest are in very small quantities, the purification step plays a very important role in the analysis process.

In this paper, three purification methods are compared in order to obtain the most consistent and accurate results of the analysis of glycopeptides of the Fc fragment of human immunoglobulin G obtained by trypsinization. The sample was purified on three stationary phases: microcrystalline cellulose and C18 and HILIC adsorbent. After purification, the eluates were analyzed by the LC-MS method to give extracted ion chromatograms with three groups of peaks corresponding to the IgG1, IgG2 and IgG4 subclasses. Summarized glycan mass spectra were also obtained from each group. Twenty glycans bound to three different peptides were detected, ie a total of sixty different glycopeptides. Further analysis of the data by LaCyTools (v.1.0.1) yielded data on the relative presence of each glycopeptide, the signal-to-noise ratio, and the quality of the isotope distribution. The C18 adsorbent method shows the best results in all observed categories, and microcrystalline cellulose proved to be the most variable. Purification on C18 adsorbent was also found to be the most cost-effective, while HILIC was the most expensive option, but somewhat shorter in duration.

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

Thesis includes: 66 pages, 23 figures, 12 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Enrichment, C18, HILIC, microcrystalline cellulose, LC-MS, glycopeptides, human IgG

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

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

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

Jasna Jablan, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.