

# N-glikozilacija alfa-1 kiseloga glikoproteina kao potencijalni dijagnostički biljeg za monogeniski tip šećerne bolesti HNF1A-MODY

---

Mustapić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:850443>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



Ivana Mustapić

**N-glikozilacija alfa-1 kiseloga  
glikoproteina kao potencijalni  
dijagnostički biljeg za monogeniski tip  
šećerne bolesti HNF1A-MODY**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Diabetes mellitus – patogeneza, prevalencija, klasifikacija i terapija .....	2
1.2. Izazovi u diferencijalnoj dijagnostici diabetes mellitusa.....	4
1.3. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) i uloga transkripcijskih faktora iz HNF obitelji	6
1.4. Uloga, sinteza i glikozilacija $\alpha$ -1 kiselog glikoproteina .....	7
1.5. Prednosti ispitivanja funkcije proteina naspram metoda molekularne dijagnostike u dijagnostici MODY-a.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Ispitanici .....	15
3.2. Obogaćivanje AGP-a.....	15
3.3. Redukcija, alkilacija i digestija tripsinom .....	15
3.4. Obogaćivanje glikana ekstrakcijom na čvrstu fazu (HILIC-SPE).....	16
3.5. Analiza obogaćenih glikopeptida metodom LC-ESI-MS.....	17
3.6. Obrada podataka.....	17
4. REZULTATI.....	19
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČAK .....	26
7. LITERATURA .....	28
8. SAŽETAK/SUMMARY .....	33
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	36

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička biokemija Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Olge Gornik Kljaić.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić i Marku Tijardoviću, mag. med. biochem. za predivnu suradnju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se također i svojim prekrasnim kolegama i kolegicama koji su mi studiranje učinili nezaboravnim, cimericama i docimericama iz Studentskog doma Stjepan Radić koje su mi Zagreb učinile drugom domom i, napose, svojoj obitelji, dečku i najbližim prijateljima koji su mi uvijek čuvali leđa.*

# **1. UVOD**

## 1.1. Diabetes mellitus – patogeneza, prevalencija, klasifikacija i terapija

Diabetes mellitus (u daljnjem tekstu DM) je teška kronična bolest koju uzrokuje nemogućnost gušterače da sintetizira inzulin ili nemogućnost organizma da funkcionalno koristi sintetizirani inzulin (WHO, 1999.). Smatra se da u svijetu od DM-a boluje 463 milijuna osoba u dobi od 20 do 79 godina, dok godišnje od komplikacija DM-a umire 4 milijuna ljudi (IDF Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition, 2019.). U Hrvatskoj od DM-a boluje preko 315 000 osoba te su komplikacije ove bolesti četvrti vodeći uzrok smrtnosti (CroDiab registar, 2019.).

DM se, obzirom na mehanizam razvoja bolesti, može podijeliti na više podtipova. Osnovna klasifikacija dijeli DM na sljedeće četiri podgrupe (ADA, 2015.):

- Diabetes mellitus tipa I – uzrokuje ga autoimuna destrukcija  $\beta$ -stanica gušterače koja za posljedicu ima potpuni nedostatak inzulina
- Diabetes mellitus tipa II – uzrokuje ga progresivni manjak lučenja inzulina uslijed inzulinske rezistencije
- Gestacijski diabetes mellitus (GDM) – dijabetes koji je prvi put dijagnosticiran u drugom i trećem tromjesečju trudnoće, a čija patogeneza leži u razvoju inzulinske rezistencije uslijed hormonalnih promjena u trudnoći
- Diabetes mellitus uzrokovan drugim različitim mehanizmima – u ovu grupu spadaju monogenetski dijabetički sindromi poput neonatalnog dijabetesa i MODY-a (*maturity-onset diabetes of the young*), bolesti koje narušavaju egzokrinu funkciju gušterače poput cistične fibroze te DM uzrokovan lijekovima ili drugim kemijskim supstancama poput dijabetesa uzrokovanog terapijom AIDS-a (*acquired immunodeficiency syndrome*) ili dijabetesa nakon transplantacije organa

Karakteristični simptomi za sve tipove dijabetesa su pojačana žeđ, poliurija, zamagljenje vida i gubitak na težini, no, ovisno o tipu, variraju načini kako se ti simptomi manifestiraju. Tako će kod dijabetesa tipa I simptomi nastupiti brzo i naglo, često odmah uz komplikacije, dok se kod pacijenata s dijabetesom tipa II simptomi razvijaju polako i lako ih je previdjeti. Postavljanje dijagnoze kod asimptomatskih pacijenata uglavnom započinje slučajnim otkrivanjem povišene razine glukoze u krvi natašte, odnosno razine glukoze iznad preporučene gornje granice koja iznosi 5,6 mmol/L (Mayo Clinic, 2020.). Dijagnoza se ne smije postaviti na temelju jednom izmjerene povišene vrijednosti glukoze, već se

intermitentna mjerenja glukoze natašte interpretiraju u skladu s kliničkom slikom, obiteljskom anamnezom i rezultatima drugih dijagnostičkih testova. Dijagnostički testovi koji se koriste pri postavljanju dijagnoze DM-a su:

- OGTT (oralni test opterećenja glukozom)
- mjerenje koncentracije inzulina ili C-peptida (nusprodukt u sintezi inzulina koji izravno korelira s koncentracijom inzulina),
- postprandijalno mjerenje glukoze (dva sata nakon uobičajenog obroka) i
- mjerenje koncentracije hemoglobina A1c, odnosno glikiranog hemoglobina čija koncentracija reflektira razinu glukoze u krvi kroz protekla dva do tri mjeseca, obzirom da je poluvrijeme života hemoglobina 120 dana

Obzirom na to da je DM cjeloživotna bolest koja zahtijeva konstantno praćenje i liječenje, rano postavljanje dijagnoze je ključno u održavanju kvalitete života. Rizične skupine za razvoj DM-a su (ADA, 2020.):

- osobe s indeksom tjelesne mase preko  $25 \text{ kg/m}^2$
- osobe koje žive sjedilačkim načinom života
- osobe s visokim krvnim tlakom
- osobe s abnormalnim vrijednostima ukupnog i LDL kolesterola
- osobe koje imaju dijagnozu PCOS (*polycystic ovary syndrome*)
- osobe starije od 45 godina
- osobe koje su u trudnoći imale dijagnosticiran gestacijski dijabetes (GDM)
- osobe s dijagnozom predijabetesa (koncentracija glukoze između  $5,6 \text{ mmol/L}$  i  $7,8 \text{ mmol/L}$  natašte ili između  $7,8 \text{ mmol/L}$  i  $11,1 \text{ mmol/L}$  postprandijalno)

Komplikacije DM-a dijele se na akutne i kronične. Akutne komplikacije DM-a su stanja koja nastupaju naglo, očituju se gubitkom svijesti ili čak komom, a uslijed izostanka adekvatne medicinske intervencije mogu imati i fatalne posljedice. Takva stanja su dijabetička ketoacidoza (najčešće kod pacijenata s DM tipa I), hiperosmolarna koma (kod pacijenata s DM tipa II) i hipoglikemija (stanje koje se javlja uslijed preskakanja obroka, prevelike doze antidijabetičkih lijekova, pretjerane fizičke aktivnosti). Kronične komplikacije DM-a su brojne te se odražavaju na gotovo cijeli organizam. DM progresivno oštećuje krvne žile i povećava rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti, a između ostalih kroničnih komplikacija izdvajaju se neuropatije, nefropatije i retinopatije.

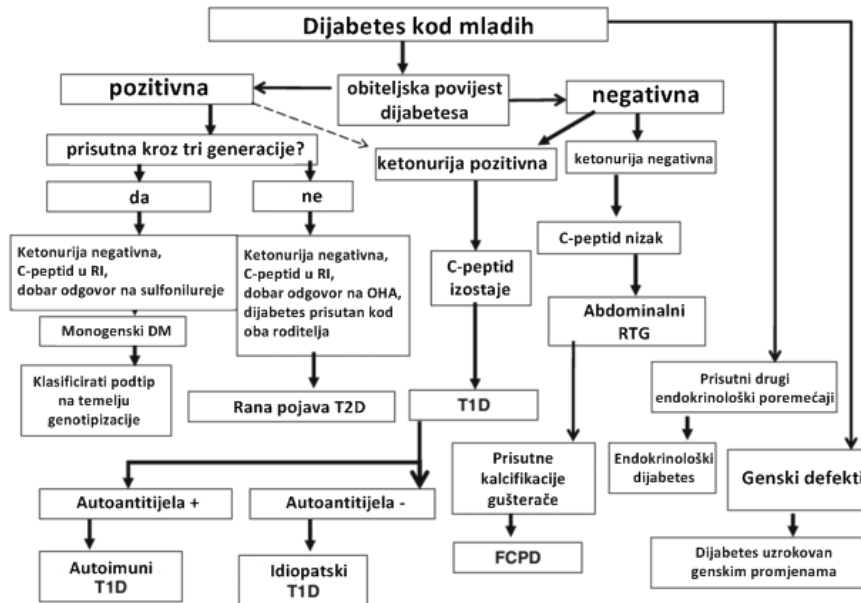
Terapija DM-a nakon postavljanja dijagnoze je, neovisno o tipu, cjeloživotna. Uključuje farmakološke i nefarmakološke mjere liječenja. Nefarmakološke mjere liječenja su, između ostalih, intervencija nutricionista, promjena životnog stila (povećanje tjelesne aktivnosti, prestanak pušenja) i kirurški zahvati za liječenje debljine te takve mjere liječenja dokazano produljuju životni vijek, poboljšavaju kvalitetu života i odgađaju potrebu za nadomjesnim liječenjem inzulinom kod DM-a tipa II, a od koristi su i u kombinaciji s inzulinskom nadomjesnom terapijom kod DM-a tipa I (Raveendran et al., 2018.). Farmakološke mjere liječenja razlikuju se ovisno o diferencijalnoj dijagnozi DM-a. Kad je riječ o DM-u tipa I, neophodno je u protokol liječenja uvrstiti nadomjesnu terapiju inzulinom (humanim rekombinantnim inzulinom ili njegovim analogima), obzirom na to da je sekrecijska funkcija  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače narušena ili u potpunosti izostaje (ADA, 2021.). Kod DM-a tipa II, preporuka je da se odmah po postavljanju dijagnoze u protokol liječenja uvede metformin, osim ukoliko on nije kontraindiciran (ADA, 2021.). Metformin je oralni antidijabetik iz skupine bigvanida. Siguran je, jeftin i efikasan lijek te može prevenirati životno ugrožavajuće komplikacije poput kardiovaskularnih incidenata (Holman et al., 2008.). Ukoliko je metformin kontraindiciran ili ga pacijent ne podnosi dobro, izbor liječenja su drugi oralni antidijabetici poput sulfonilureja, meglitinida, tiazolidindiona, inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze i inhibitora dipeptil-peptidaze 4. Ostali oralni antidijabetici su manje učinkoviti od metformina te se uglavnom primjenjuju u kombinacijama. Također, animalnim studijama provedenim na sulfonilurejama dokazan je njihov teratogeni učinak (BMJ, 2015.) te izazivaju najveći broj hipoglikemijskih incidenata u odnosu na druge oralne antidijabetike.

## **1.2. Izazovi u diferencijalnoj dijagnostici diabetes mellitusa**

U poglavlju 1.1. definirane su četiri podgrupe diabetes mellitusa, kao i protokol postavljanja inicijalne dijagnoze. Međutim, za odabir adekvatne terapije i parametara longitudinalnog praćenja, potrebno je jasno definirati uzroke DM-a kod pacijenta. Kod odraslih pacijenata, a osobito pacijenata starijih od 45 godina, u većini slučajeva je opravdano postaviti dijagnozu DM-a tipa II ukoliko su zadovoljeni dijagnostički kriteriji prezentirani u poglavlju 1.1. Kada je u pitanju gestacijski dijabetes (GDM), također su jasno definirani kriteriji postavljanja dijagnoze koji kažu da je to dijabetes prvi put dijagnosticiran u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće. No, pojava simptoma u ranijoj dobi, kod djece i adolescenata,



zahtijeva opsežniju dijagnostiku. Na Slici 1. (Unnikrishnan et al., 2016.) prikazan je algoritam postavljanja dijagnoze dijabetesa kod mladih osoba.



**Slika 1.** Algoritam diferencijalne dijagnostike DM-a kod mladih (Unnikrishnan et al., 2016.). Prema prikazanom algoritmu, kod pojave simptoma DM-a kod mladih prvo je potrebno uzeti obiteljsku anamnezu. Ukoliko je ona pozitivna, potrebno je ustanoviti kroz koliko generacija unazad se DM ponavlja. Negativan nalaz ketona u urinu, prisutnost C-peptida, dobar odgovor na sulfonilureje i pojavnost DM-a unazad tri generacije indicira monogeniski DM kojeg valja tipizirati postupcima genotipizacije. Ukoliko uz negativan nalaz ketona u urinu i prisutnost C-peptida pacijent dobro odgovara i na ostale oralne antidijabetike (OHA- *Oral Hypoglycemic Agents*), a incidencija u obitelji je prisutna, no ne ponavlja se kontinuirano kroz generacije, radi se o ranoj pojavi DM-a tipa II. Ukoliko C-peptid nije prisutan, a nalaz ketona u urinu je pozitivan, radi se o DM-u tipa I kojeg dalje tipiziramo na temelju prisutstva ili odsudstva autoantitijela na  $\beta$ -stanice gušterače na autoimuni i idiopatski. Kod pacijenata s negativnom obiteljskom anamnezom, također se prvo pribjegava mjerenju koncentracije ketona u urinu i C-peptida u serumu. Kod negativnog nalaza ketona i izmjerenih sniženih vrijednosti C-peptida, pacijentu se vrši rendgensko snimanje abdomena, kako bi se utvrdilo postoje li kalcifikacije na pankreasu koje uzrokuju FCPD (Fibrocalculous pancreatic diabetes), rijetki oblik DM-a. Kod pacijenata se prethodno dijagnosticiranim genskim poremećajima, poput cistične fibroze, DM se razvija uglavnom kao sekundarno oboljenje, odnosno kao posljedica primarne bolesti.

### 1.3. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) i uloga transkripcijskih faktora iz HNF obitelji

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) je oblik monogenetskog dijabetesa koji je najčešće pogrešno dijagnosticiran kao DM tipa I ili DM tipa II. Simptomi se javljaju uglavnom prije 25. godine života.

Naziv „MODY“ zapravo se odnosi na skupinu heterogenih poremećaja funkcije  $\beta$ -stanica gušterače koji su uzrokovani mutacijama u različitim genima (Shields et al., 2010.). Najčešće mutacije koje uzrokuju poremećaje funkcije  $\beta$ -stanica gušterače su one u genima *GCK*, *HNF1A* i *HNF4A*, a među navedenima po učestalosti prednjači mutacija u genu za *HNF1A*. *GCK* kodira glukokinazu, enzim koji katalizira fosforilaciju glukoze. Fosforilacija glukoze je primarna reakcija u metaboličkom putu glukoze te omogućuje zadržavanje glukoze unutar stanica. Ukoliko reakcija izostane, razina nefosforilirane glukoze u krvi raste i dolazi do hiperglikemije. Mutacije u genima *HNF1A* i *HNF4A* koji kodiraju za transkripcijske faktore *HNF1A* i *HNF4A* dovode do gubitka kontrole glikemije.

Transkripcijski faktori *HNF1A* i *HNF4A* (*Hepatocyte Nuclear Factors*) prvotno su opisani kao transkripcijski faktori u stanicama jetre, no ustanovljeno je kako su vezujući motivi za ove transkripcijske faktore prisutni i u brojnim drugim tkivima, osobito u bubrezima i gušterači (Lau et al., 2017.). Primarna uloga transkripcijskih faktora koji pripadaju HNF obitelji je razvoj i diferencijacija stanica u embrionalnom razvoju s naglaskom na stanice jetre, gušterače i bubrega. Kod odraslih, ovi transkripcijski faktori reguliraju ekspresiju gena za sintezu bitnih staničnih elemenata koji održavaju stanicu funkcionalnom. U svim tkivima koji sadrže transkripcijske faktore HNF je prisutna njihova križna regulacija. Kod miševa sa *HNF1A*-null genotipom primjećena je smanjena ekspresija transkripta *HNF4A* u otočićima gušterače (Boj SF et al., 2001. ; Shih DQ, Screenan S. et al. 2001.). Križna regulacija uvjetuje činjenicu da će mutacija u genu za bilo koji od transkripcijskih faktora uvjetovati različitu ekspresiju drugih HNF transkripcijskih faktora u tom tkivu. Tako na primjer *HNF1A* regulira promotor P2 za ekspresiju gena *HNF4A*, dok je s druge strane *HNF4A* esencijalan aktivator ekspresije gena *HNF1A*. Koliko ovise jedan o drugom, govori i činjenica da transkripcijski faktori *HNF1A* i *HNF4A* protein-protein interakcijama tvore kompleks *HNF1A*- *HNF4A* koji regulira potonje puteve ekspresije gena u stanicama gušterače. Ukoliko izostaje regulacija kompleksom *HNF1A*- *HNF4A*, dolazi do slabljenja funkcije otočića gušterače, smanjuje se izlučivanje inzulina te se razvija dijabetes.

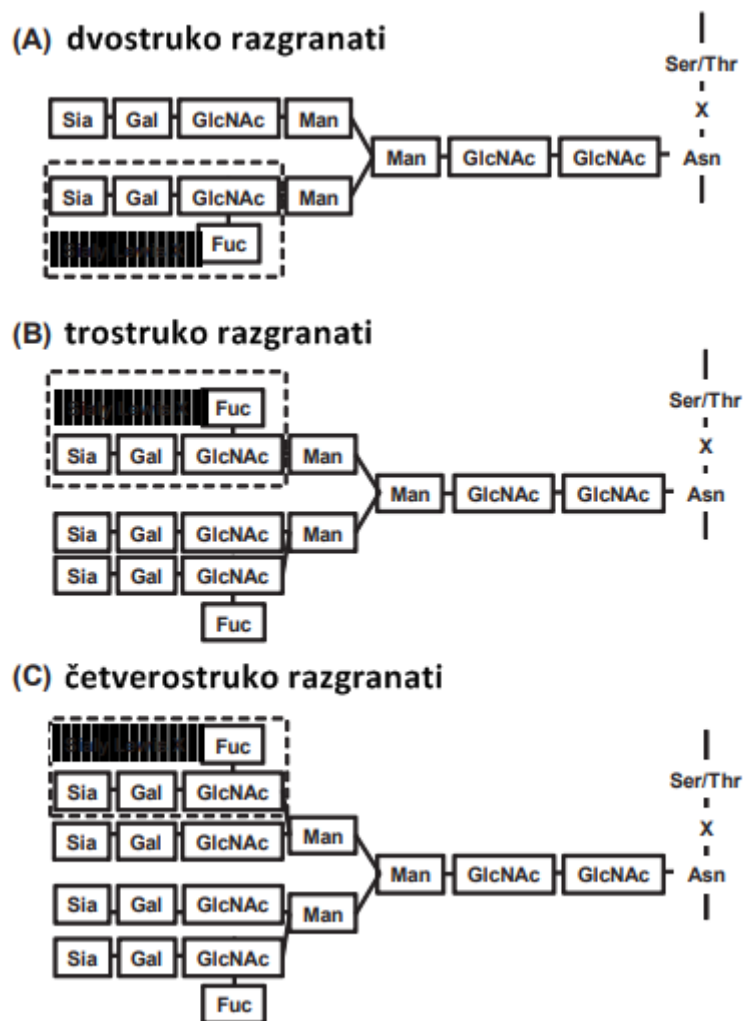
#### 1.4. Uloga, sinteza i glikozilacija $\alpha$ -1 kiselog glikoproteina

$\alpha$ -1 kiseli glikoprotein (u daljnjem tekstu AGP) je protein akutne faze koji se najvećim dijelom sintetizira u jetri iako je sinteza prepoznata i opisana i u drugim organima kao što su srce, želudac i pluća (Taguchi et al, 2013). Mase je oko 44 kDa, a na ugljikohidratni dio otpada čak 40% ukupne mase proteina. Bazalna koncentracija AGP-a u plazmi zdravih pojedinaca je 20  $\mu$ mol/L. Gen *AGP* je prisutan u 3 varijante koje su kodirane susjednim genima na kromosomu 9. Gen *AGP* kodira za F-1, F-2 i S varijante, dok geni *AGP-B* i *AGP-B'* kodiraju za A varijantu. Obzirom da se varijante F1 i S razlikuju u tek 5 aminokiselina u primarnoj strukturi proteina, a varijanta F2 je pristupa samo u određenim populacijama (Europa, Zapadna Azija), najčešće se opisuju skupa kao F1\*S varijanta. Omjer F1\*S i A varijante kod zdravih pojedinaca je od 3:1 do 2:1, a u određenim stanjima kronične upale, kao što su maligne bolesti, omjer raste i do 8:1 u korist F1\*S varijante.

Glikozilacija je najvažnija posttranslacijska modifikacija koja se uglavnom odvija u citosolu, endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu (Jaeken, 2016.). Radi se o vezanju, uglavnom enzimskom, ugljikohidrata na druge makromolekule, najčešće proteine. Ugljikohidratni dio tako modificiranog proteina nazivamo glikan. Glikani mogu biti vezani O- i N-glikozidnim kovalentnim vezama. Kod AGP-a su glikani vezani N-glikozidnim vezama, što podrazumijeva kovalentno vezanje ugljikohidratnih jedinica na asparaginski ostatak u polipeptidnom lancu, pri čemu Asn-ostatak mora biti dijelom niza Asn - x - Ser/Thr, pri čemu je „x“ bilo koja aminokiselina osim prolina. Veliki broj danas opisanih nasljednih metaboličkih bolesti upravo je uzrokovano mutacijama u genima koji reguliraju glikozilaciju proteina. Glikozilacija je varijabilan proces na koji, osim genskih, utječu i okolišni čimbenici, te istraživanje glikana vezanih na proteine može biti od velikog dijagnostičkog značaja.

Biološka uloga AGP-a nije u potpunosti razjašnjena. Brojnim in vivo kao i in vitro studijama potvrđeno je sudjelovanje AGP-a u procesima transporta endogenih i egzogenih tvari (npr. lijekovi poput varfarina, polimiksina i dr.), kao i u imunomodulatornim i antiupalnim procesima kao što su inhibicija agregacije trombocita i promjene u proliferaciji limfocita (Hochepped et al, 2003.). Sinteza AGP-a u hepatocitima regulirana je glukagonom te interleukinima 6 i 8 i to putem mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK). Također, ekspresija AGP-a je s jedne strane regulirana glukokortikoidima, a s druge citokinima (tumor-nekrozni faktor, interleukin-1 i interleukin-6) što ga izdvaja od drugih proteina akutne faze poput ceruloplazmina, fibrinogena i  $\alpha$ -2 mikroglobulina (Baumann et al, 1989).

AGP ima 5 N - glikozilacijskih mjesta (Asn-15, -38, -54, -75 i -85). Asn-ostatci nalaze se u aminokiselinskom slijedu Ser/Thr – X – Asn (gdje je X bilo koja aminokiselina osim Pro) što je uvjet za tvorbu N-glikozilacijskog mjesta. Glikani vezani na AGP pokazuju heterogenost u sastavu obzirom na različitost terminalno vezanih šećera te različit stupanj razgranatosti (mogu biti dvostruko, trostruko i četverostruko razgranati) kako je prikazano na slici 2. Karakterizaciju strukture i sastava glikana vezanih na AGP omogućile su visoko specijalizirane laboratorijske metode kao tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) i masena spektrometrija (MS) različitih izvedbi (tandem MS, MALDI). Primjećeno je kako brojna fiziološka i patološka stanja utječu na promjenu sastava i razgranatosti glikana vezanih na AGP. Tako se stopa 3-fukozilacije dvostruko razgranatih glikana povećava u ranoj fazi akutne upale (van Dijk et al, 1995.), a kod malignih bolesti raste stopa i fukozilacije i sijalinizacije (Kremmer et al, 2004.). Kod pojedinaca sa oštećujućim mutacijama gena *HNF1A* koji posljedično razvijaju MODY tip dijabetesa primjećeno je kako opada stopa fukozilacije plazmatskih proteina (Juszczak et al, 2019.). U prethodno spomenutoj publikaciji također se navodi kako glikani koji sadrže N-acetilglukozaminske i manozne ostatke u sržnom dijelu, te sijalinske kiseline i fukoze kao terminalne šećere najviše diskriminiraju HNF1A-MODY pacijente od onih s dijabetesom tipa II. Upravo takve strukture opisuju glikane vezane na AGP (Slika 2.) te je opravdano pretpostaviti da promjeni ukupne fukozilacije plazmatskih proteina najviše doprinosi promjena na AGP-u. Iako je u brojnim studijama primjećeno kako se glikozilacija mijenja ovisno u stanju pojedinca, još uvijek nije sigurno znači li promijenjena glikozilacija AGP-a i promjenu u njegovoj funkciji.



Slika 2. Prikaz dvostruko, trostruko i četverostruko razgranatih glikana vezanih na AGP. Vidljivo je kako srž glikana čine N-acetilglukozamin (GlcNAc) te manozu (Man), a najčešći terminalni šećeri su sijalinska kiselina (Sia) koja se veže na galaktozu (Gal) te fukoza (Fuc) koja se veže na N-acetilglukozamin (GlcNAc) (Taguchi et al, 2013.)

## 1.5. Prednosti ispitivanja funkcije proteina naspram metoda molekularne dijagnostike u dijagnostici MODY dijabetesa

LC-ESI-MS predstavlja snažnu analitičku metodu u kojoj su, kako sam naziv kaže, spregnute tekućinska kromatografija, elektrosprej ionizacija i masena spektrometrija. LC (tekućinska kromatografija) omogućuje razdvajanje analita u uzorku otopljenom u prigodnom otapalu na temelju različitih elucijskih vremena, odnosno na temelju fizikalno-kemijskih različitosti koje dovode do razlika u vremenu zadržavanja na kromatografskoj koloni. ESI

(elektrosprej ionizacija) za razliku od ionizacije laserom (MALDI; matrix-associated laser desorption/ionization) omogućuje tvorbu aerosola bez velike fragmentacije molekula, što je od velike važnosti u analizi bioloških makromolekula. ESI također omogućuje sprezanje tekućinske kromatografije na maseni spektrometar – naime, analiti razdvojeni na kromatografskoj koloni relativno niskom brzinom protoka ulaze u maseni spektrometar gdje dolazi do raspršenja čestica i ionizacije pod utjecajem jakog električnog polja, te se potom pod utjecajem visoke temperature ukloni ostatak otapala (prigodna otapala su ona koja su lako hlapljiva, poput metanola ili acetonitrila). U masenom spektrometru, nastale čestice koje nazivamo molekularnim ionima razdvajaju se načelno na temelju razlike u omjeru  $m/z$ , odnosno omjeru mase i naboja. Postoji više izvedbi masenih spektrometara, pa tako kvadrupolni maseni spektrometar razdvaja molekularne ione na temelju stabilnosti njihove putanje u oscilirajućem polju stvorenom pomoću četiri paralelno postavljene šipke. Analitička učinkovitost ove izvedbe može se poboljšati pripajanjem više analizatora mase u niz što nazivamo tandemskom spektroskopijom, a između dva takva kvadrupola može se postaviti i kolizijska ćelija ispunjena inertnim plinom gdje će analiti koji su prošli prvi kvadrupol biti dodatno fragmentirani prije ulaska u drugi. Druga česta izvedba masenog spektrometra je ona u kojoj se analiti razdvajaju na temelju razlike u brzini putovanja do detektora, tzv. TOF (time-of-flight) analizatori. Svim ioniziranim česticama dodijeljena je ista kinetička energija te će se njihova brzina putovanja razlikovati na temelju razlike u omjeru  $m/z$ .

LC-ESI-MS je specifična i osjetljiva analitička metoda čiji rezultati govore o strukturi ispitivanog analita. Struktura proteina uvjetuje funkciju proteina, te je stoga informacija o strukturi proteina od neizmjerne koristi kada ispituje njegovu funkcionalnost. S druge strane, metodama molekularne dijagnostike kao što su sekvenciranje gena ili ispitivanje prisutstva određenih mutacija metodom lančane reakcije polimerazom, dobivamo informaciju o prisustvu ili odsudstvu mutacije. Kada je riječ konkretno o MODY dijabetesu, od interesa je nekoliko različitih gena. Najčešći oblik MODY dijabetesa, HNF1A-MODY, može biti posljedica više različitih mutacija, od kojih brojne još uvijek nisu poznate, a kamoli opisane. S druge strane, opisane su i brojne mutacije gena HNF1A koje ne uzrokuju pojavu MODY dijabetesa, a prepoznate su i one kojima još nije pridruženo značenje. Zbog heterogenosti i složenosti promjena u genu HNF1A, metode molekularne dijagnostike u dijagnostici MODY dijabetesa imaju određene nedostatke, dugotrajne su i ponekadne donose zadovoljavajuću kliničku informaciju. Obzirom da postoje brojne indicije da upravo HNF1A sudjeluje u regulaciji glikozilacije AGP-a, analiza strukture i sastava glikana na AGP-u govori izravno o

funkcionalnosti HNF1A, što je gotovo potpuna klinička informacija u dijagnostici MODY dijabetesa.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**



Maturity-onset diabetes of the young (MODY) je oblik monogenetskog tipa šećerne bolesti na koji otpada 1-2 % svih slučajeva. Danas je opisano preko deset različitih mutacija koje uzrokuju MODY, te je na temelju tih mutacija bolest klasificirana u više podtipova (Tablica 1.). Najčešći tip je MODY3, uzrokovan mutacijom u genu *HNF1A* koji kodira za transkripcijski faktor HNF1A, pa ga nazivamo i HNF1A–MODY. Diferencijalna dijagnostika za HNF1A–MODY uključuje genotipizaciju kako bi se utvrdila neka od desetaka mutacija gena koja pouzdano uzrokuje bolest. Bolest se najčešće javlja u dobi od 18.-te do 45.-te godine života, te je u tom životnom periodu opravdano posumnjati na to da se radi o diabetes mellitusu tipa II, pa čak i o diabetes mellitusu tipa I kod mladih pacijenata u ovoj skupini. Obzirom na to da je diabetes mellitus tipa I ima svoje specifičnosti, kao što je autoimuna patofiziologija bolesti, lakše ga je eliminirati kao potencijalnu dijagnozu. Stoga je inicijalno postavljena dijagnoza kod HNF1 –MODY najčešće diabetes mellitus tip II, što uvelike otežava oporavak i uspostavu kontrole glikemije kod tih pacijanata. Naime, prva linija liječenja kod osoba diabetes mellitusom tipa II je metformin, koji kod HNF1A–MODY djeluje slabo ili nikako na kontrolu glikemije, za razliku od sulfonilureja koje brzo, efikasno i sigurno dovode do kontrole glikemije kod ovih pacijenata.

$\alpha$ -1 kiseli glikoprotein (AGP) je protein akutne faze koji se sintetizira najvećim dijelom u jetri te je njegova fiziološka uloga do danas uglavnom opisivana u kontekstu transportnog proteina za brojne endogene i egzogene tvari. AGP ima 5 glikozilacijskih mjesta te na glikanski dio otpada čak 40% ukupne mase. Juszczak i suradnici primjetili su kako pojedinci s potvrđenom mutacijom *HNF1A* imaju smanjenu stopu fukozilacije plazmatskih proteina. Također, glikanske strukture za koje Juszczak i suradnici navode da imaju najveću diskriminirajuću moć u razlikovanju pojedinaca s HNF1A-MODY i onih s dijabetesom tipa II odgovaraju strukturama glikana vezanih na AGP (Clerc et al., 2015.). Promatranje promjena u glikozilaciji ukupnih proteina plazme može navesti na krivi trag, obzirom da rezultati ovise i o koncentracijama tih proteina. U slučaju ispitivanja glikozilacije pojedinačnih proteina, koncentracija u plazmi neće imati utjecaja. Stoga će se u ovom radu ispitati fukozilacija AGP-a kod pojedinaca s HNF1A-MODY-em u odnosu na pojedince bez mutacije u *HNF1A* genu LC-ESI-MS metodom, s ciljem identifikacije onih struktura koje ih razlikuju te predstavljaju potencijalan diskriminacijski biljeg. Hipoteza rada je da je udio glikanskih struktura AGP-a koje na sebi imaju vezanu fukozu smanjen kod osoba s HNF1A-MODY oblikom šećerne bolesti u odnosu na osobe bez mutacija u genu.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Ispitanici

Analiza N-vezanih glikana na AGP-u provedena je na ukupno 90 uzoraka plazme pacijenata sa različitim stanjem gena *HNF1A*, od čega je 57 ženskih i 33 muška ispitanika. Od ukupnog broja, 72 uzorka prikupljena su od pacijenata koji nemaju mutaciju *HNF1A*, dok je ostalih 18 uzoraka pripada pacijentima koji imaju potvrđenu mutaciju *HNF1A* koja je dokazano povezana s razvojem MODY-a. Kao kontrolni uzorci odabrani uzorci AGP standarda izoliranog iz humane plazme (Sigma Aldrich, St Louis, MO, SAD) te smjesa uzoraka plazme koji su analizirani usporedno s uzorcima plazme pacijenata.

### 3.2. Obogaćivanje AGP-a

Priprema uzoraka za tandemsku masenu spektroskopiju je u prvom koraku uključivala „obogaćivanje“ AGP-a na način da je iz uzoraka plazme istaložena seromukoidna frakcija. Po 20 $\mu$ L plazme svakog od uzoraka otpipetirano je u PCR pločicu sa 96 jažica (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) te je potom u svaku jažicu dodano 80 $\mu$ L 0,75M otopine perklorata (Merck, Darmstad, Njemačka). Tako pripremljena PCR pločica centrifugira se 10 minuta na 2250g. Nastali supernatant pretoči se u drugu, čistu PCR pločicu, uz pomoć adaptera za spajanje pločica i kratkog centrifugiranja (oko 30 sekundi) na niskoj brzini (15g). Supernatantu u svakoj jažici dodaje se približno 9  $\mu$ L 2% otopine fosfotungistične kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u 2M otopini HCl (VWR International, Radnor, PA, SAD). PCR pločica se potom ponovno centrifugira 10 minuta na 2250g, a nastali supernatant odvoji pomoću adaptera za spajanje pločica i kratkog centrifugiranja (oko 30 sekundi) na niskoj brzini (15g). Zaostali talog u primarno korištenoj PCR pločici sadrži seromukoidnu frakciju, te se on otopi s oko 30  $\mu$ L 0.1M otopine NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) pri čemu se dobije bistra otopina.

### **3.3. Redukcija, alkilacija i digestija tripsinom**

Po 2,5  $\mu\text{L}$  1,5% RapiGest SF-a (Waters, Milford, MA, SAD) u otopini 30 mM amonijevog bikarbonata doda se u svaku jažicu otopljenim proteinima. RapiGest SF je surfaktant koji se dodaje kako bi se olakšala digestija enzimima. Nakon dodavanja RapiGesta, PCR pločica s uzorcima inkubira se 5 minuta na 60 °C. Potom se u svaku jažicu dodaje po 5  $\mu\text{L}$  60 mM otopine ditiotreitola (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) koji služi kao reducirajuće sredstvo te se tako pripremljena PCR pločica inkubira 30 minuta na 60 °C. Nakon druge inkubacije, nakon što PCR pločica s uzorcima ponovno dosegne sobnu temperaturu, svakoj jažici dodaje se po 5  $\mu\text{L}$  160 mM jodoacetamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) kao alkilirajuće sredstvo, a potom se uzorci miješaju na tresilici u mraku 30 minuta. Nakon provedene alkilacije, djelovanje suviška jodoacetamida poništava se dodavanjem 1  $\mu\text{L}$  200mM otopine ditiotreitola. Za optimalno djelovanje tripsina, potrebno je prilagoditi pH otopine što se postiže dodatkom 2  $\mu\text{L}$  1 M amonijevog bikarbonata. Potom se u svaku jažicu doda po 2  $\mu\text{L}$  otopine TPCK-om tretiranog tripsina koncentracije 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . PCR pločica s uzorcima ostavi se preko noći inkubirati na 37 °C. Dan poslije, u svaku se jažicu doda po 3  $\mu\text{L}$  1M HCl kako bi se razgradio RapiGest SF-a koji bi u suprotnom kasnije ometao ionizaciju. PCR pločicu s dodanim HCl-om potrebno je inkubirati 45 minuta na 37°C.

### **3.4. Obogaćivanje glikana ekstrakcijom na čvrstu fazu (HILIC-SPE)**

Nakon tretmana uzoraka tripsinom čime su hidrolizirane peptidne veze, u uzorcima zaostaje smjesa peptida i glikopeptida, a ekstrakcijom na čvrstoj fazi pomoću kromatografije temeljene na hidrofilnim vezama (HILIC-SPE) glikopeptidi se obogaćuju. Ekstrakcija na čvrstu fazu provodi se u propilenskim filter pločicama s 96 jažica u koje se otpipetira 100  $\mu\text{L}$  suspenzije Chromabond® HILIC kuglica (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) u 0,1% TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) koncentracije 50mg/mL. Propilenska pločica se potom pripremi na način da se jažice dva puta isperu s po 250  $\mu\text{L}$  0,1% TFA, a potom ekvilibriraju dvostrukim ispiranjem s po 250  $\mu\text{L}$  90%-tne otopine acetonitrila + 0,1% TFA. Ispiranje pločice provodi se uz pomoć vakuumske pumpe na način da se ispod pločice postavi pločica za otpad te se snagom vakuuma otapalo eluira u pločicu za otpad. Uzorci se razrijede s po 450  $\mu\text{L}$  acetonitrila + 0,1% TFA i dodaju u jažice propilenske filter pločice. Prvo se dvostruko

isperu s po 250  $\mu$ L acetonitrila + 0,1 % TFA uz pomoć vakuumske pumpe, a dobiveni eluati se odbace u pločicu za otpad. Nakon dvostrukog ispiranja, umjesto pločice za otpad se postavi čista PCR pločica, a glikopeptidi zaostali na čvrstoj fazi konačno se eluiraju s po 200  $\mu$ L 0,1%-tne otopine TFA. Ostatak otapala iz eluata se ukloni u SpeedVac vakuumskom koncentratoru, nakon čega se uzorci pohranjuju na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize.

### **3.5. Analiza obogaćenih glikopeptida metodom LC-ESI-MS**

Razdvajanje i analiza glikopeptida prvotno vezanih na AGP provedena je uz pomoć Compact spektrometra masa (Bruker, USA) koji je spregnut sa nanoACQUITY UPLC sustav (Waters, USA). Osušanim uzorcima doda se 30  $\mu$ L ultračiste vode čime se razrijede 10 puta. Potom se uzorci injiciraju u Acclaim PepMap100 C8 (5 mm $\times$ 300  $\mu$ m i.d.) pretkolonu gdje se 3 minute ispiru s 0,1%-tnim TFA pri brzini protoka od 40  $\mu$ L/min. AGP glikopeptidi potom se razdvajaju na C18 nano-LC koloni (150 mm $\times$ 75  $\mu$ m i.d.) s 2.7 $\mu$ m HALO česticama fuzionirane jezgre na temelju peptidne osnove glikopeptida gradijentnom eluacijom na  $30^{\circ}\text{C}$  uz acetonitril brzinom protoka od 1  $\mu$ L/min i to na način da se udio 80% acetonitrila tijekom prvih 5 minuta povećao od 0% do 20%, a narednih 11,5 minuta od 20% do 50%. NanoACQUITY UPLC sustav spregnut je na Compact spektrometar masa preko CaptiveSpray nanoBooster ionskog izvora, kolizijska i ionska energija su bile postavljene na 4 eV, a kolizijska ćelija ispunjena argonom. Za povećanje stope ionizacije glikopeptida, dodan je acetonitril u struju dušika. Maseni spektri snimljeni su na frekvenciji od 0,5 Hz unutar raspona m/z od 100 do 4000.

### **3.6. Obrada podataka**

Sirovi podatci dobiveni analizom glikana LC-ESI-MS-om pretvoreni su u mzXML datoteku uz MSConvert alat (ProteoWizard verzija 3.), dok je za relativnu kvantifikaciju rezultata korišten alat LaCyTools (verzija 1.0.11.0.1 b.9). Retencijska vremena usklađena su prema pet najsnažnijih glikopeptidnih signala. Na trostruko i četverostruko nabijenim ionima izvršena je integracija vršaka na način da se zadrži 90% teorijske izotopne distribucije kako bi se pojednostavnila daljnja obrada podataka. Kontrola kvalitete provedena je na tri nivoa:

- omjer signala i šuma (veći od 15)
- odstupanje od teorijske izotopne distribucije (manje od 25%)
- odstupanje izmjerene mase od teorijske manje od 30 ppm („parts per million“)

Kako bi intenziteti bili međusobno usporedivi, intenzitet svakog od signala izražen je kao udio ukupne integrirane površine po glikozilacijskom mjestu.

Tako dobiveni podatci vizualizirani su tabličnim prikazima u programu Microsoft Office Excel. Potom su statistički uspoređeni rezultati dobiveni analizom glikopeptida koji sadrže fukozu. Uspoređivani su intenziteti signala dobivenih na fukoziliranim glikopeptidima uzoraka pacijenata koji nose oštećujuću mutaciju *HNF1A* sa signalima dobivenim na kontrolnim uzorcima. Statistička usporedba provedena je Mann-Whitney testom. Obzirom na velik broj napravljenih testova, provedena je Benjamin-Hochberg korekcija p-vrijednosti kako bi se kontrolirao broj lažno pozitivnih rezultata, odnosno broj pogrešaka prve vrste.

## **4. REZULTATI**

Intenziteti signala u masenim spektrima analiziranih glikopeptida izraženi su kao udio ukupne integrirane površine po glikozilacijskom mjestu. Obzirom na svrhu istraživačkog rada, kao glikani od interesa odabrani su oni koji sadrže fukozu kako bi se utvrdilo postojanje statistički značajne razlike u fukozilaciji N-glikana AGP-a kod pojedinaca s HNF1A-MODY u odnosu na zdrave pacijente, odnosno, u ovom slučaju, u odnosu na kontrolne uzorke. Intenziteti glikana od interesa uspoređeni su Mann-Whitney testom te su dobivene p-vrijednosti koje su zbog velikog broja testova korigirane Benjamini-Hochbergovom korekcijom. Izvorne i korigirane p-vrijednosti dobivene usporedbom glikana od interesa pridružene su odgovarajućim glikozilacijskim mjestima te prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz izračunatih p-vrijednosti na temelju Mann-Whitney testa i pripadajućih korigiranih p-vrijednosti Benjamini-Hochberg korekcijom za pojedini glikan od interesa.

Glikozilacijsko mjesto	Glikan	p – vrijednost	korigirana p-vrijednost
I <sub>1</sub>	N4H5S2F1	1,652E-07	4,946E-07
I <sub>1</sub>	N5H6S3F1	1,399E-07	4,946E-07
I <sub>1</sub>	N4H5S2F1	9,615E-06	1,168E-05
I <sub>1</sub>	N5H6S1F1	1,141E-06	1,931E-06
I <sub>1</sub>	N5H6S2F1	3,332E-07	7,080E-07
I <sub>1</sub>	N5H6S3F1	6,852E-07	1,294E-06
I <sub>1,2</sub>	N6H7S2F1	7,309E-07	1,308E-06
I <sub>1,2</sub>	N6H7S3F1	8,850E-04	9,116E-04
I <sub>1,2</sub>	N5H6S1F1	2,712E-04	2,974E-04
I <sub>1,2</sub>	N5H6S2F1	2,706E-07	6,572E-07
I <sub>1,2</sub>	N5H6S3F1	1,746E-07	4,946E-07
I <sub>1,2</sub>	N6H7S2F1	6,716E-01	6,716E-01
I <sub>1,2</sub>	N6H7S3F1	4,970E-01	5,120E-01
IV <sub>1</sub>	N5H6S2F1	1,563E-07	4,946E-07
IV <sub>1</sub>	N5H6S3F1	1,323E-07	4,946E-07
IV <sub>1</sub>	N6H7S2F1	2,687E-06	3,806E-06
IV <sub>1</sub>	N6H7S3F1	3,445E-06	4,685E-06
IV <sub>1</sub>	N6H7S4F1	1,193E-06	1,931E-06
IV <sub>1</sub>	N7H8S3F1	7,194E-09	2,372E-07
IV <sub>1</sub>	N7H8S4F1	7,125E-08	4,946E-07
V <sub>1</sub>	N5H6S3F1	8,936E-08	4,946E-07
V <sub>1</sub>	N6H7S2F1	4,858E-06	6,352E-06



Tablica 2. nastavak

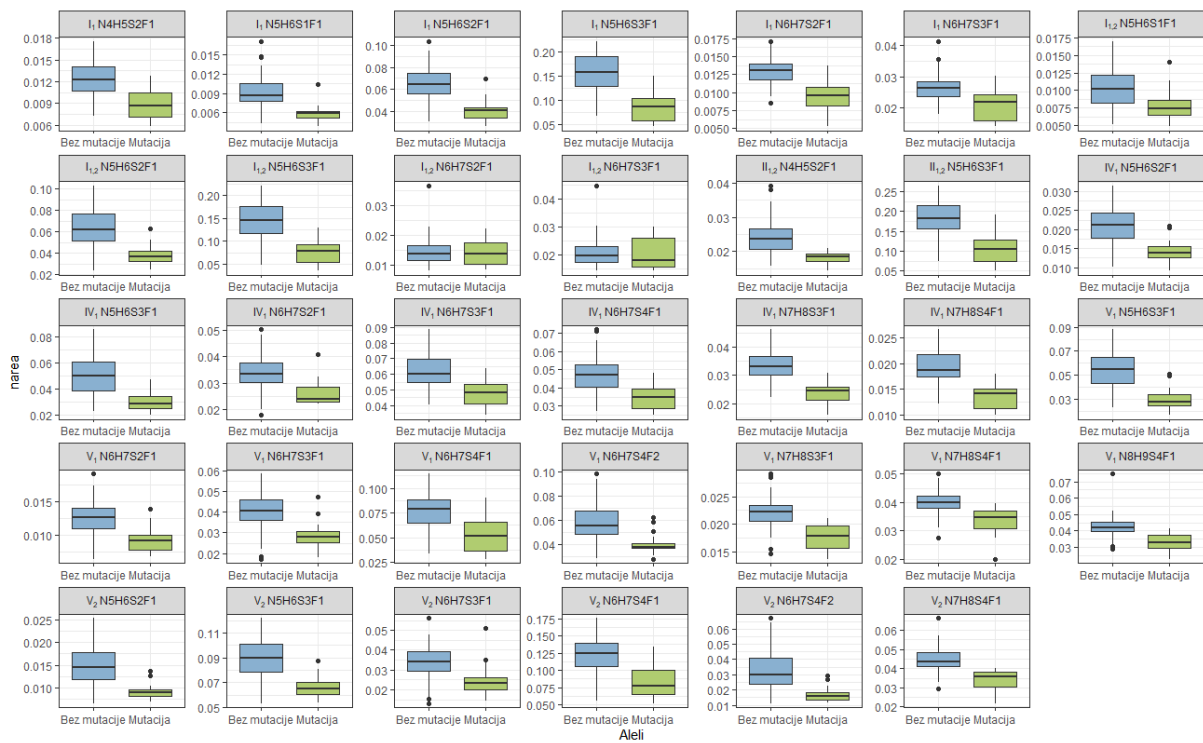
Klaster	Glikan	p – vrijednost	korigirana p-vrijednost
V <sub>1</sub>	N6H7S3F1	1,987E-06	3,071E-06
V <sub>1</sub>	N6H7S4F1	9,979E-06	1,170E-05
V <sub>1</sub>	N6H7S4F2	6,190E-06	7,795E-06
V <sub>1</sub>	N7H8S3F1	1,058E-07	4,946E-07
V <sub>1</sub>	N7H8S4F1	3,743E-07	7,487E-07
V <sub>1</sub>	N8H9S4F1	1,000E-07	4,946E-07
V <sub>2</sub>	N5H6S2F1	1,746E-07	4,946E-07
V <sub>2</sub>	N5H6S3F1	3,184E-07	7,080E-07
V <sub>2</sub>	N6H7S3F1	7,241E-05	8,207E-05
V <sub>2</sub>	N6H7S4F1	2,556E-06	3,778E-06
V <sub>2</sub>	N6H7S4F2	2,706E-07	6,571E-07
V <sub>2</sub>	N7H8S4F1	1,395E-08	2,372E-07

*Legenda :*

*Rimskim brojem (I-V) u nazivu klastera označeno je kojem glikozilacijskom mjestu glikan pripada, dok je u subskriptu arapskim brojem (1,2) označeno s koje forme AGP-a glikan potječe;*

*Oznake u formulama glikana predstavljaju monosaharida od kojih se sastoje: N - N-acetilglukozamin, H - heksoza (manoza i galaktoza), F - fukoza, S - sijalinska kiselina*

Kao statistički značajne, odabrane su korigirane p-vrijednosti manje od 0,05. Statistički značajne vrijednosti su označene crvenom bojom u tablici 2. Za lakše razumijevanje podataka prikazanih u tablici 2., na slici 3. prikazani su kutijasti dijagrami za uspoređene glikane.



Slika 3. Prikaz usporedbe intenziteta signala glikana od interesa uz pomoć kutijastih dijagrama. Na apscisi je označen promatrani alel, odnosno radi li se u glikanima iz uzoraka s mutacijom ili iz uzoraka bez mutacije, dok je na y-osi intenzitet signala.

## **5. RASPRAVA**

MODY3, najčešći oblik MODY-dijabetesa u populaciji, uzrokovan je heterogenom skupinom mutacija u genu za transkripcijski faktor HNF1A. Poznato je kako se većina oštećujućih mutacija nalazi u egzonima 1-6 (Bellanné-Chantelot et al., 2008.), no obzirom na velik broj svih potencijalnih mutacija u genu HNF1A, to informacija nije od dovoljne kliničke značajnosti. Također, metode molekularne dijagnostike su dugotrajne i zahtijevaju specifične reagense. Za ispitivanje prisustva određene mutacije metodom lančane reakcije polimeraze, potrebno je osigurati specifične početnice koje će omogućiti repliciranje određenog segmenta DNA molekule. Ukoliko se radi o više segmenata koje je potrebno ispitati, a oni su u primarnom slijedu udaljeni, potrebno je osigurati različite parove početnica što je često nedostupno i neisplativo. Sekvenciranje gena osigurava potpunu informaciju o njegovom nukleotidnom slijedu, no ukoliko nukleotidni slijed dobiven analizom nije prethodno ispitan i istražen, sam po sebi nije dijagnostički informativan.

Iz tabličnog i grafičkog prikaza usporedbe fukoziliranih glikopeptida kod pacijenata koji nose oštećujuću mutaciju i kontrolnih uzoraka u poglavlju 4.1., vidljivo je kako je statistički značajna razlika prisutna kod većine promatranih glikopeptida, točnije od ukupno 34 promatrana glikopeptida tek 2 pokazuju razliku koja nije statistički značajna. Iz toga se da zaključiti kako je glikozilacija, točnije fukozilacija, uistinu promijenjena kod pacijenata koji nose mutaciju HNF1A u odnosu na pojedince bez mutacije. Rezultati idu u prilog GWAS studiji (Lauc et al., 2010.) koja je ukazala na to da HNF1A sudjeluje u regulaciji fukozilacije plazmatskih proteina. Indicije da je fukozilacija plazmatskih proteina promijenjena kod pojedinaca s mutacijom *HNF1A* proizlaze iz studija koje su proveli Thanabalasingham i suradnici, kao i Juszczak i suradnici. Prema rezultatima prikazanim u spomenutim publikacijama, glikani čija je struktura najviše promijenjena, odnosno najbolje diskriminira pojedince s mutacijom *HNF1A* od onih bez mutacije, strukturno odgovaraju glikanima vezanim na AGP. Obzirom na to da na rezultate koji se dobiju istovremenim ispitivanjem glikana sa svih plazmatskih proteina značajno može utjecati koncentracija tih proteina u plazmi, ispitivanje glikana s pojedinačnog proteina (u ovom slučaju AGP-a) doprinosi dijagnostičkoj specifičnosti analize.

LC-ESI-MS metodom dobivamo informaciju o sastavu i strukturi glikana vezanih na AGP, a dobiveni rezultati izravna su posljedica funkcionalnosti, odnosno nefunkcionalnosti gena od interesa, što je u ovom slučaju *HNF1A*. LC-ESI-MS te ostale izvedbe masene spektrometrije rijetko su prisutne u kliničkim laboratorijima, obzirom na to da su uređaji skupi te je rukovanje njima, kao i obrada dobivenih podataka, vrlo zahtjevno. Iako je

implementacija metode rijetka, činjenica da se u istovremeno može obraditi velik broj uzoraka te da su analiti gotovo trajno stabilni ukoliko se pravovremeno pohrane na  $-20^{\circ}\text{C}$  omogućuje da se interlaboratorijskom suradnjom i razmjenom uzoraka ipak na relativno jeftin i dostupan način ti uzorci i analiziraju.

Istraživanje biomolekula masenom spektrometrijom daje potpune i opsežne rezultate, omogućuje individualan pristup pacijentu te oplemenjuje kliničku anamnezu pacijenta informacijama koje su rezultat dugoročnog djelovanja genskih i okolišnih čimbenika što je svrha personalizirane medicine. Za razliku od molekularne dijagnostike koja daje jednoznačne rezultate, odnosno prisustvo ili odsustvo mutacije gena HNF1A, rezultati analize glikozilacije AGP-a u sklopu dijagnostike MODY3 govore o funkcionalnosti transkripcijskog faktora HNF1A i, osim potvrde dijagnoze, daju informaciju i o intenzitetu učinka prisutne mutacije i omogućuju personalizirano praćenje pacijenta. MODY dijabetes je najčešće pogrešno inicijalno dijagnosticiran kao dijabetes tipa II, što kliničara dovodi na krivi trag kad je u pitanju kreiranje protokola liječenja i posljedično dovodi do razvoja dijabetičkih komplikacija koje su mogle biti izbjegnute. Kad je riječ o pacijentima koji boluju od MODY dijabetesa, činjenica da se specifičnom i osjetljivom metodom jasno mogu razlučiti od pacijenata koji boluju od drugih tipova dijabetesa od velike je pomoći u izradi protokola liječenja pa time i u poboljšanju kvalitete života tih pacijenata.

## **6. ZAKLJUČAK**

MODY dijabetes je najčešće pogrešno dijagnosticiran kao dijabetes tipa II obzirom da se javlja u adolescentskoj i odrasloj populaciji, nema autoimuni karakter i okarakteriziran je tipičnim simptomima šećerne bolesti. Greška u postavljanju inicijalne dijagnoze dovodi do pogrešnog liječenja te se umjesto dokazano korisnih sulfonilureja, uglavnom propisuje metformin koji značajno ne doprinosi liječenju bolesti. MODY dijabetes se odnosi na heterogenu skupinu bolesti, a najčešći oblik je MODY3 uzrokovan mutacijom gena *HNF1A* koji kodira za istoimeni transkripcijski faktor. No, iako je poznato koji je gen od interesa čije se mutacije mogu ispitivati u kliničke svrhe, dosadašnja istraživanja utvrdila su postojanje brojnih mutacija gena *HNF1A* od kojih neke uzrokuju bolest, neke ne, a nekima još uvijek nije dodijeljeno značenje. Stoga metode molekularne dijagnostike nisu od velikog značaja u dijagnostici dijabetesa MODY3 obzirom da daju jednoznačnu informaciju o postojanju ili nepostojanju mutacije, što nije dovoljna klinička informacija za postavljanje dijagnoze. Istraživanja su potvrdila kako postoji značajna korelacija između prisutstva mutacije *HNF1A* i promjene u glikozilaciji, točnije fukozilaciji, plazmatskih proteina. Usporedbom glikana plazmatskih proteina pacijenata bez i pacijenata sa oštećujućom mutacijom *HNF1A* ustanovljeno je kako je stopa fukozilacije smanjena. Nedostatak tih studija je činjenica da na rezultat mogu utjecati i koncentracije pojedinih plazmatskih proteina i njihovi omjeri. S druge strane, ukoliko se analiziraju glikani s pojedinačnog proteina, može se isključiti rizik utjecaja koncentracije i omjera svih plazmatskih proteina. U ovom radu je u tu svrhu odabran AGP, obzirom da glikani koji u prethodnim studijama pokazuju statistički značajnu razliku između pojedinaca s mutacijom *HNF1A* i onih bez nje strukturno odgovaraju glikanima s AGP-a. Usporedba glikana s AGP-a u pojedinaca sa i bez oštećujuće mutacije *HNF1A* potvrdila je inicijalnu hipotezu rada, a to je da je stopa fukozilacije uistinu smanjena kod pojedinaca s oštećujućom mutacijom *HNF1A*, odnosno pojedinaca s MODY-em. Istraživanjem strukture i sastava glikana na AGP-u, koji su izravna posljedica djelovanja transkripcijskog faktora *HNF1A*, dobiju se informacije koje govore o funkcionalnosti tog transkripcijskog faktora, te omogućuju jednostavnije postavljanje dijagnoze i pravovremeno liječenje. Struktura i sastav glikana na AGP-u mogu se definirati metodom LC-ESI-MS koja je osjetljiva i specifična te omogućuje istovremenu analizu velikog broja uzoraka.

## **7. LITERATURA**



American Diabetes Association. 7. Diabetes Technology: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 2020, 43(Suppl. 1), 7–8

American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 2015, 38 (Suppl. 1), 8–16

Bacon S., Kyithar M. P., Rizvi S. R., Donnelly E., McCarthy A., Burke M., Colclough K., Ellard S., Byrne M. M. Successful maintenance on sulphonylurea therapy and low diabetes complication rates in a HNF1A–MODY cohort. *DIABETIC Medicine*, 2016, 33, 976–984

Balsells M., García-Patterson A., Solà I., Roqué M., Gich I., Corcoy R., Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2015, 350, h102

Baumann H, Prowse KR, Marinkovic S, Won KA, Jahreis GP. Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, 557, 280-295

Bellanné-Chantelot C., Carette C., Riveline J., Valéro R., Gautier J., Larger E., Reznik Y., Ducluzeau P., Sola A., Hartemann-Heurtier A., Lecomte P., Chaillous L., Laloi-Michelin M., Wilhem J., Cuny P., Duron F., Guerci B., Jeandidier N., Mosnier-Pudar H., Assayag M., Dubois-Laforgue D., Velho G., Timsit J.. The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. *Diabetes*, 2008, 57(2), 503-508

Boj SF, Párrizas M, Maestro MA, Ferrer J.. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *PNAS*, 2001, 98, 81–86

World Health Organization. Definition and diagnosis criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. DEFINITION, DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS AND ITS COMPLICATIONS. PART 1: DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Geneva, 1999, 2-7

Diabetes – Diagnosis and Treatment, 2020, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/diabetes/diagnosis-treatment/drc-20371451> , pristupljeno 2.5.2021.

Eap CB, Fischer JF, Baumann P. Variations in relative concentrations of variants of human alpha 1-acid glycoprotein after acute-phase conditions. *Clin Chim Acta*. 1991, 203(2-3), 379-385

Hanada K, Yamanaka E, Yamamoto N, Minami H, Kawai S, Sasaki Y, et al. Effects of surgery and chronic disease states on the concentrations and phenotype distribution of alpha1-acid glycoprotein: studies in patients with breast cancer and patients with chronic inflammatory disease. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2011, 49(7), 415-421.

Hocheplied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(1), 25-34.

Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2008., 359, 77–89

Keser T., Tijardović M., Gornik I., Lukić E., Lauc G., Gornik O., Novokmet M. High-throughput and site-specific N-glycosylation analysis of human alpha-1 acid glycoprotein offers a great potential for new biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20, 100044

Kremmer T, Szollosi E, Boldizsar M, Vincze B, Ludanyi K, Imre T, et al. Liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of human serum acid alpha-1-glycoprotein. *Biomed Chromatogr*, 2004, 18(5), 323-329

Kulkarni AB, Reinke R, Feigelson P. Acute phase mediators and glucocorticoids elevate alpha 1-acid glycoprotein gene transcription. *J Biol Chem*, 1985, 260(29), 86-89

Kuribayashi T, Tomizawa M, Seita T, Tagata K, Yamamoto S. Relationship between production of acute-phase proteins and strength of inflammatory stimulation in rats. *Lab Anim*, 2015, 45(3), 215-218.

Lau H.H., Hui Jin Ng N., Sai Weng Loo L., Binte Jasmen J., Kee Keong Teo A., The molecular functions of hepatocyte nuclear factors – In and beyond the liver. *Journal of Hepatology*. 2017, 68, 1033–1048

Lauc G, Essafi A, Huffman JE, Hayward C, Knežević A, et al., Genomics Meets Glycomics—The First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1 $\alpha$  as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation. *PLOS Genetics*, 2010, 6(12), 1001256

Raveendran, A. V., Chacko, E. C., & Pappachan, J. M. Non-pharmacological Treatment Options in the Management of Diabetes Mellitus. *European endocrinology*, 2018, 14(2), 31–39

Shields, B.M., Hicks, S., Shepherd, M.H. et al. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*, 2010, 53, 4–8

Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, et al. Loss of HNF-1a function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes*, 2001, 50, 72–80

Stadnyk A, Gauldie J., The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunol Today*, 1991, 12(3), 7-12

T. Poljičanin, M. Švajda. Izvješće za 2019., 2020., <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/03/Izvje%C5%A1%C4%87e-za-2019.-godinu.pdf>, pristupljeno 5.5.2021.

Taguchi K., Nishi K., Tuan Giam Chuang V., Maruyama T., Otagiri M., Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein Structure and Function. *Acute Phase Proteins*, 2013., <https://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins/molecular-aspects-of-human-alpha-1-acid-glycoprotein-structure-and-function>, pristupljeno 30.4.2021.

Thanabalasingham G, Huffman JE, Kattla JJ, Novokmet M, Rudan I, Gloyn AL, Hayward C, Adamczyk B, Reynolds RM, Muzinic A, Hassanali N, Pucic M, Bennett AJ, Essafi A, Polasek O, Mughal SA, Redzic I, Primorac D, Zgaga L, Kolcic I, Hansen T, Gasperikova D, Tjora E, Strachan MW, Nielsen T, Stanik J, Klimes I, Pedersen OB, Njølstad PR, Wild SH, Gyllensten U, Gornik O, Wilson JF, Hastie ND, Campbell H, McCarthy MI, Rudd PM, Owen KR, Lauc G, Wright AF. Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile. *Diabetes*, 2013, 62(4):13, 29-37.

Unnikrishnan, Ranjit & Shah, Viral & Mohan, Viswanathan. Challenges in diagnosis and management of diabetes in the young. *Clinical Diabetes and Endocrinology*. 2016, 10, 2-18

van Dijk W, Havenaar EC, Brinkman-van der Linden EC. Alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid): pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. *Glycoconj J*, 1995, 12(3), 227-233

## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

Diabetes mellitus je teška kronična bolest koju uzrokuje nemogućnost gušterače da sintetizira inzulin ili nemogućnost organizma da funkcionalno koristi sintetizirani inzulin (WHO, 1999.). Diabetes mellitus se, obzirom na mehanizam razvoja bolesti, može podijeliti na više podtipova, a najčešće pogrešno dijagnosticiran tip dijabetesa je MODY (Maturity-onset Diabetes of the Young). MODY dijabetes je heterogena skupina poremećaja uzrokovanih mutacijama u različitim genima, a najčešći tip je MODY3 uzrokovan mutacijom gena *HNF1A* za istoimeni transkripcijski faktor. Mutirani transkripcijski faktor *HNF1A* dovodi do abnormalne regulacije sinteze inzulina u  $\beta$ -stanicama Langerhansovih otočića pankreasa zbog čega dolazi do razvoja šećerne bolesti. Dosadašnjim istraživanjima ustanovljeno je da do najboljeg terapijskog ishoda kod MODY pacijenata dovodi liječenje sulfonilurejama, no, zbog često pogrešno postavljene inicijalne dijagnoze, pacijentima se daje metformin koji ne dovodi do poboljšanja stanja i povlačenja simptoma. Mutacije gena *HNF1A* su heterogene; neke od njih su benigne, više različitih dovodi do razvoja bolesti, a nekima još uvijek nije dodijeljeno značenje. Stoga su metode molekularne dijagnostike u dijagnostici MODY dijabetesa manjkave i često pružaju rezultate kojima se, zbog manjka literaturnih podataka, ne može dodijeliti kliničko značenje. Prepoznato je kako mutacije u transkripcijskom faktoru *HNF1A* dovode do promjene glikozilacije  $\alpha$ -1 kiselog glikoproteina, te se može pretpostaviti kako bi iscrpna analiza strukture i sastava glikana na  $\alpha$ -1 kiselom glikoproteinu dala adekvatnu informaciju o funkcionalnosti transkripcijskog faktora *HNF1A*, pa tako i o kliničkoj slici pacijenta. U ovom istraživačkom radu glikopeptidi su analizirani masenom spektrometrijom spregnutom na tekućinsku kromatografiju kojom je moguće usporediti velik broj uzoraka obzirom da metoda trpi istovremeno analiziranje velikih kohorti. Glikopeptidi su ispitani u 90 uzoraka plazme pri čemu je njih 72 pripadalo osobama bez mutacije u *HNF1A* genu, a njih 18 pojedincima s potvrđenom oštećujućom mutacijom *HNF1A*. Statističkom obradom podataka pomoću Mann Whitney testa ustanovljeno je kako je prisutna statistički značajna razlika u fukozilaciji AGP-a između ispitanih skupina.

Diabetes mellitus is a severe chronic disease caused by the inability of the pancreas to synthesize insulin or the inability of the body to functionally use synthesized insulin (WHO, 1999). Diabetes mellitus, according to the mechanism of disease development, can be divided into several subtypes, and the most commonly misdiagnosed type of diabetes is MODY (Maturity-onset Diabetes of the Young). MODY diabetes is a heterogeneous group of disorders caused by mutations in different genes, and the most common type is MODY3 caused by a mutation in the HNF1A gene for the transcription factor of the same name. Mutated transcription factor HNF1A leads to abnormal regulation of insulin synthesis in the  $\beta$ -cells of the pancreatic islets of Langerhans leading to the development of diabetes. Previous research has shown that treatment with sulfonylureas leads to the best therapeutic outcome in MODY patients, but due to the often misdiagnosed initial diagnosis, patients are given metformin which does not lead to improvement and withdrawal of symptoms. Mutations in the HNF1A gene are heterogeneous; some of them are benign, more different leads to the development of the disease, and some have not yet been assigned meaning. Therefore, molecular diagnostic methods in the diagnosis of MODY diabetes are deficient and often provide results that, due to lack of literature data, cannot be assigned clinical significance. It has been recognized that mutations in the transcription factor HNF1A lead to changes in the glycosylation of  $\alpha$ -1 acid glycoprotein, and it can be assumed that a comprehensive analysis of the structure and composition of glycans on  $\alpha$ -1 acid glycoprotein would provide adequate information on the functionality of transcription factor in HNF1A. patient. In this research work, glycopeptides were analyzed by mass spectrometry coupled to liquid chromatography by which it is possible to compare a large number of samples since the method can simultaneously analyse large cohorts. Glycopeptides were tested in 90 plasma samples, of which 72 belonged to individuals without a mutation in the HNF1A gene, and 18 to individuals with a confirmed damaging HNF1A mutation. Statistical processing of the data using the Mann Whitney test revealed that there was a statistically significant difference in AGP fucosylation between the examined groups.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Ivana Mustapić

## SAŽETAK

Diabetes mellitus je teška kronična bolest koju uzrokuje nemogućnost gušterače da sintetizira inzulin ili nemogućnost organizma da funkcionalno koristi sintetizirani inzulin (WHO, 1999.). Diabetes mellitus se, obzirom na mehanizam razvoja bolesti, može podijeliti na više podtipova, a najčešće pogrešno dijagnosticiran tip dijabetesa je MODY (Maturity-onset Diabetes of the Young). MODY dijabetes je heterogena skupina poremećaja uzrokovanih mutacijama u različitim genima, a najčešći tip je MODY3 uzrokovan mutacijom gena *HNF1A* za istoimeni transkripcijski faktor. Mutirani transkripcijski faktor *HNF1A* dovodi do abnormalne regulacije sinteze inzulina u  $\beta$ -stanicama Langerhansovih otočića pankreasa zbog čega dolazi do razvoja šećerne bolesti. Dosadašnjim istraživanjima ustanovljeno je da do najboljeg terapijskog ishoda kod MODY pacijenata dovodi liječenje sulfonilurejama, no, zbog često pogrešno postavljene inicijalne dijagnoze, pacijentima se daje metformin koji ne dovodi do poboljšanja stanja i povlačenja simptoma. Mutacije gena *HNF1A* su heterogene; neke od njih su benigne, više različitih dovodi do razvoja bolesti, a nekima još uvijek nije dodijeljeno značenje. Stoga su metode molekularne dijagnostike u dijagnostici MODY dijabetesa manjkave i često pružaju rezultate kojima se, zbog manjka literaturnih podataka, ne može dodijeliti kliničko značenje. Prepoznato je kako mutacije u transkripcijskom faktoru *HNF1A* dovode do promjene glikozilacije  $\alpha$ -1 kiselog glikoproteina, te se može pretpostaviti kako bi iscrpna analiza strukture i sastava glikana na  $\alpha$ -1 kiselim glikoproteinu dala adekvatnu informaciju o funkcionalnosti transkripcijskog faktora *HNF1A*, pa tako i o kliničkoj slici pacijenta. U ovom istraživačkom radu glikopeptidi su analizirani masenom spektrometrijom spregnutom na tekućinsku kromatografiju kojom je moguće usporediti velik broj uzoraka obzirom da metoda trpi istovremeno analiziranje velikih kohorti. Glikopeptidi su ispitani u 90 uzoraka plazme pri čemu je njih 72 pripadalo osobama bez mutacije u *HNF1A* genu, a njih 18 pojedincima s potvrđenom oštećujućom mutacijom *HNF1A*. Statističkom obradom podataka pomoću Mann Whitney testa ustanovljeno je kako je prisutna statistički značajna razlika u fukozilaciji AGP-a između ispitanih skupina.

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

Rad sadrži:

Ključne riječi: dijabetes, MODY, *HNF1A*, alfa-1 kiseli glikoprotein, N-glikozilacija, LC-MS

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik Kljaić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Toma Keser**, viši asistent – poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana-Maria Šimundić**, spec. medicinske biokemije, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2021.



## 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

**Ivana Mustapić**

### SUMMARY

Diabetes mellitus is a severe chronic disease caused by the inability of the pancreas to synthesize insulin or the inability of the body to functionally use synthesized insulin (WHO, 1999). Diabetes mellitus, according to the mechanism of disease development, can be divided into several subtypes, and the most commonly misdiagnosed type of diabetes is MODY (Maturity-onset Diabetes of the Young). MODY diabetes is a heterogeneous group of disorders caused by mutations in different genes, and the most common type is MODY3 caused by a mutation in the HNF1A gene for the transcription factor of the same name. Mutated transcription factor HNF1A leads to abnormal regulation of insulin synthesis in the  $\beta$ -cells of the pancreatic islets of Langerhans leading to the development of diabetes. Previous research has shown that treatment with sulfonylureas leads to the best therapeutic outcome in MODY patients, but due to the often misdiagnosed initial diagnosis, patients are given metformin which does not lead to improvement and withdrawal of symptoms. Mutations in the HNF1A gene are heterogeneous; some of them are benign, more different leads to the development of the disease, and some have not yet been assigned meaning. Therefore, molecular diagnostic methods in the diagnosis of MODY diabetes are deficient and often provide results that, due to lack of literature data, cannot be assigned clinical significance. It has been recognized that mutations in the transcription factor HNF1A lead to changes in the glycosylation of  $\alpha$ -1 acid glycoprotein, and it can be assumed that a comprehensive analysis of the structure and composition of glycans on  $\alpha$ -1 acid glycoprotein would provide adequate information on the functionality of transcription factor in HNF1A. patient. In this research work, glycopeptides were analyzed by mass spectrometry coupled to liquid chromatography by which it is possible to compare a large number of samples since the method can simultaneously analyse large cohorts. Glycopeptides were tested in 90 plasma samples, of which 72 belonged to individuals without a mutation in the HNF1A gene, and 18 to individuals with a confirmed damaging HNF1A mutation. Statistical processing of the data using the Mann Whitney test revealed that there was a statistically significant difference in AGP fucosylation between the examined groups.

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

Thesis  
includes:

Keywords: dijabetes, MODY, HNF1A, alfa-1 kiseli glikoprotein, N-glikozilacija, LC-MS

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

Reviewers: **Olga Gornik Kljaić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Toma Keser, Ph.D.** *Senior Teaching Assistant –Postdoctoral Researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Maria Šimundić, Ph.D., European Specialist in Laboratory Medicine**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

