

# Odjeljivanje formi $\alpha$ -1 kiselog glikoproteina niskotlačnom kromatografijom anionske izmjene

---

Radovčić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:231876>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

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



**Jelena Radovčić**

**ODJELJIVANJE FORMI  $\alpha$ -1 KISELOG  
GLIKOPROTEINA NISKOTLAČNOM  
KROMATOGRAFIJOM ANIONSKE IZMJENE**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Opća i anorganska kemija sa stehiometrijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marija Gabričevića.

## SADRŽAJ

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                    | 1  |
| 1.1. KISELI GLIKOPROTEIN.....   | 3  |
| a. FIZIOLOŠKA FUNKCIJA.....     | 4  |
| i. VEZANJE LIJEKOVA.....        | 4  |
| ii. IMUNOMODULACIJA.....        | 5  |
| b. STRUKTURA.....               | 7  |
| i. PEPTIDNI DIO.....            | 7  |
| ii. GLIKANSKI DIO.....          | 8  |
| c. POLIMORFIZMI.....            | 10 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....       | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....     | 15 |
| 3.1. DESIJALINIZACIJA.....      | 15 |
| 3.2. KROMATOFOKUSIRANJE.....    | 15 |
| 3.3. MJERENJE APSORBANCIJE..... | 17 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....    | 18 |
| 5. ZAKLJUČCI.....               | 22 |
| 6. LITERATURA.....              | 23 |
| 7. SAŽETAK.....                 | 26 |

## 1. UVOD

Krvna plazma je kompleksni biološki materijal koji predstavlja tekući dio ljudske krvi te čini 55% njezina volumena dok ostalih 45% čine krvne stanice. Krvnu plazmu sačinjava najvećim dijelom voda te elektroliti, proteini, protutijela, hormoni i otpadne tvari. Koncentracija proteina u plazmi iznosi 70-75 g/L koji imaju mnogobrojne fiziološke funkcije. Gotovo svi proteini plazme pripadaju glikoproteinskoj porodici, što znači da sadrže kovalentno vezane oligosaharidne lance. Albumin predstavlja iznimku budući da ne sadrži glikanske lance u svojoj strukturi (Zemek, Korabecny, Sepsova, Karasova Zdarova, Musilek i Kuca, 2016). Utjecaj na fiziološke funkcije proteina plazme mogu imati: heterogenost u njihovom peptidnom dijelu (zbog polimorfizma gena za njihovu sintezu), posttranslacijske modifikacije (na primjer glikozilacija) i promjene u njihovoj koncentraciji.

Jedan od mnogih proteina plazme je  $\alpha$ 1-kiseli glikoprotein (AGP) koji ima dvije glavne genske varijante. Također je uočena i heterogenost u njegovoj bogatoj glikanskoj strukturi koja čini otprilike 40% njegove strukture. AGP je protein akutne faze te je njegova koncentracija podložna promjenama za vrijeme upale prilikom čega koncentracija AGP-a može porasti i do pet puta. Uz promjenu koncentracije, promjene u peptidnom i glikanskom dijelu također mogu imati utjecaj na njegove fiziološke funkcije. Promjena koncentracije AGP-a može imati utjecaj na vezanje nekih lijekova pa time i koncentraciju slobodne frakcije lijeka u plazmi. Promjena u glikozilaciji prepoznata je kao potencijalan dijagnostički marker (Vasson, Roch-Arveiller, Couderc, Bauget, Raichvarg, 1994), a specifični glikani na površini AGP-a mogli bi se koristiti kao biomarkeri u praćenju progresije raka dojke (Bteich, 2019).

Kromatografija je često korištena metoda razdvajanja u kojoj se tvari razdjeljuju između pokretne i nepokretne faze (Bolanča i Ukić, 2013). Popularnost ionske izmjenjivačke kromatografije je porasla posljednjih godina zato što omogućuje analizu širokog spektra molekula u farmaceutskoj industriji, biotehnologiji, poljoprivredi i drugim industrijama. Ova kromatografija je jedna od najzastupljenijih tehnika razdvajanja peptida, proteina, nukleinskih kiselina i sličnih biopolimera koji su nabijene molekule različitih molekulskih masa i svojstava. Razdvajanje je bazirano na stvaranju ionskih veza između nabijenih grupa biomolekula i ionsko-izmjenjivačkog gela/nosača koji nosi suprotan naboj. Mobilna faza se sastoji od vodenog sistema pufera u kojem se smjesa može otopiti. Stacionarna faza se najčešće sastoji od inertnog organskog matriksa

kemijski modificiranog s ionizirajućim funkcionalnim grupama. Kationi se razdvajaju kation-izmjenjivajućom kromatografijom, a anioni anion-izmjenjivajućom kromatografijom. Prvo se u sustav unosi otopina pufera koja sadrži funkcionalne skupine suprotnog naboja od onih stacionarne faze. Nakon toga se nanosi uzorak koji je također suprotnog naboja od onog koji se nalazi na stacionarnoj fazi (u ovom istraživanju uzorak je negativnog naboja) te se uzorak koncentrira na koloni (tvari koje ne nose naboj ili nose isti naboj kao i tvari stacionarne faze se ispiru s kolone). Promjenom pH-a otopine dolazi do promjene naboja uzorka nanesenog u koloni te dolazi do otpuštanja sa stacionarne faze zbog slabljenja ionskih veza. Na kraju postupka slijedi ispiranje kolone kako bi se uklonile sve tvari vezane na stacionarnu fazu (Acikara, 2013).

## 1.1 KISELI GLIKOPROTEIN

AGP je protein plazme, prvi put opisan 1950. (Schmid, 1950), čija masa iznosi između 38,8 i 48,0 kDa (Israili i Dayton, 2013). Glavno mjesto sinteze AGP-a su hepatociti (Bteich, 2019). Ekstrahepatička sinteza uočena je na primjer u endotelnim stanicama i makrofazima alveolarnog tipa 2 te i u drugim tkivima za vrijeme upale (Fournier, Bouach, Delafosse, Crestani i Aubier, 1999), posebno pod utjecajem citokina (interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-6 (IL-6)), faktora nekroze tumora (TNF $\alpha$ ) i glukokortikoida (Bteich, 2019). Dnevna razina sinteze AGP-a iznosi otprilike 10 mg po kilogramu tjelesne mase pojedinca. Nakon sinteze se distribuira u tjelesne tekućine kao što su plazma, gastrični sok, tjelesne sekrete (urin i feces)... (Israili i Dayton, 2013). Metabolizam AGP-a se odvija u hepatocitima, kojem prethodi vezanje desijalinizarnog ili degalaktiziranog oblika AGP-a na asijaloglikoproteinski receptor (ASGP-R) (Bteich, 2019).

U zdravih pojedinaca, koncentracija u plazmi iznosi 0,5-2,0 mg/mL (10-20  $\mu$ M), čineći 1-3% proteina plazme (Huang i Ung, 2013). Za vrijeme upale zabilježen je značajan porast koncentracije koji je također zabilježen kod životinja (Azuma, Nishioka, Aono, Inayama, Makino i Kishi, 2007).

## a. FIZIOLOŠKA FUNKCIJA

Točna fiziološka funkcija AGP-a nije u potpunosti poznata, ali prepoznata je njegova uloga u procesima kao što su inhibicija agregacije trombocita, modulacija proliferacije limfocita te vezanje i transport lijekova. Pretpostavljeno je da AGP sudjeluje u više različitih imunomodulatornih i protupalnih procesa na što ukazuje više rezultata istraživanja. Utvrđeni su utjecaj citokina i glukokortikoida na ekspresiju AGP-a, pronalazak endogenog i egzogenog AGP-a na mjestima upale u štakora s upalnim granulomom te povećanje koncentracije AGP-a za vrijeme upalnih procesa (Taguchi, Nishi, Chuang, Maruyama i Otagiri, 2013). Osim imunomodulatornog djelovanja, bitna uloga je i vezanje lijekova. Jačina vezanja lijeka na AGP utječe na slobodnu frakciju lijeka, koja se smatra zaslužnom za terapijsko ili toksično djelovanje stoga je vezanje potrebno uzeti u obzir prilikom određivanja farmakokinetike i farmakodinamike novih lijekova. Iako je uloga AGP-a u vezanju lijekova u prošlosti bila podcijenjena zbog njegove niske koncentracije (10-20 $\mu$ M) u usporedbi s albuminom (otprilike 600 $\mu$ M), prepoznata je njegova uloga kao primarnog nosača bazičnih lipofilnih lijekova kao što su dipiridamol, propranolol i imatinib. Dosad je pronađeno preko 300 lijekova koji se vežu na AGP uključujući  $\beta$ -blokatore, lokalne anestetike i inhibitore HIV proteaze. Prepoznati su i endogeni ligandi AGP-a, a neki od njih su histamin, melatonin, serotonin, heparin, imunoglobulin G<sub>3</sub> (IgG<sub>3</sub>) i aktivirajući faktor trombocita (Huang i Ung, 2013).

## i. VEZANJE LIJEKOVA

Vezanje lijekova na proteine plazme je često prvi kontrolirajući korak u distribuciji lijekova u organizmu. Vezanje je bitna determinanta ne samo djelovanja lijekova (terapijskog i toksičnog), nego i za difuziju u okolna tkiva. Općenito, vezanje lijekova na AGP može imati utjecaj na farmakokinetiku lijekova, posebno na lijekove koji se čvrsto vežu na AGP, čiji je volumen distribucije ( $V_D$ ) malen te AGP predstavlja glavni protein plazme za njihovo vezanje (Israili i Dayton, 2013).

AGP i albumin su najvažniji nosači lijekova u plazmi, s razlikom u fizikalno-kemijskim svojstvima lijekova koje vežu (Israili i Dayton, 2013). Iako AGP predstavlja manji udio ukupnih



proteina plazme, za razliku od albumina koji predstavlja otprilike 60% ukupnih proteina plazme, AGP može imati značajnu ulogu u vezanju lijekova i farmakokinetici (Smith i Waters, 2019).

Budući da je AGP protein akutne faze, njegova se koncentracija može povećati i do 5 puta za vrijeme različitih patoloških stanja kao što su rak, trauma, infekcija i upala. Kod zdravih pojedinaca također postoji intra- i inter-individualna varijabilnost u koncentraciji AGP-a u plazmi ovisno o dobi, rasi, spolu i hormonalnom statusu za razliku od albumina čija koncentracija nije podložna promjenama osim u slučaju ciroze jetre, nefrotičkog sindroma i malnutricije (Huang i Ung, 2013). Udio lijeka vezanog na AGP ovisi o više faktora kao što su: koncentracija liganda, koncentracija AGP-a, pH, prisutnost drugih liganada koji se natječu za vezno mjesto na AGP-u, prisutnost drugih proteina (na primjer albumin), prisutnost AGP varijanti. Faktori koji mijenjaju koncentraciju AGP-a u serumu ili uzrokuju promjenu njegove strukture imaju utjecaj na vezanje lijekova *in vivo*, što utječe na slobodnu frakciju lijeka u plazmi (Isriali i Dayton, 2013).

AGP ima jedno primarno saturabilno vezno mjesto, visokog afiniteta i niskog kapaciteta formirano tercijarnom strukturom proteina, pozicionirano u hidrofobnoj pukotini koju čine tri reznja (Bteich, 2019). Zbog niske koncentracije i jednog veznog mjesta, vezanje na AGP je podložno zamjeni s drugim ligandima AGP-a (Huang i Ung, 2013). Sijalinska kiselina i ugljikohidratni dio pridonose negativnom naboju glikoziliranog AGP-a, posljedično privlačeći ksenobiotike pozitivnog naboja pri pH 7,4. Negativan naboj u reznju II je posljedica ostatka Glu64 u donjem dijelu reznja, dok je negativan naboj u reznju III zbog Asp115. Svi ovi ostaci su zaslužni za čvrsto vezanje liganada bazičnih karakteristika u džepove AGP-a. Postoje i druga vezna mjesta različitih kapaciteta i niskih afiniteta, ali prethodno spomenuto vezno mjesto jedino pokazuje klinički značaj (Bteich, 2019).

## ii. IMUNOMODULACIJA

AGP je klasificiran kao član imunokalinske obitelji budući da ima protuupalno i imunomodulacijsko djelovanje u svih sisavaca. Ima inhibitoran učinak na stanice imunskog sustava (primjerice T limfocite) i na agregaciju trombocita te uzrokuje indukciju određenih citokina (Bteich, 2019).

Povećanje koncentracije AGP-a za vrijeme upale smatra se dijelom urođenog (nespecifičnog) obrambenog sustava koji pruža obranu prije odgovora adaptivnog (specifičnog)

imunskog odgovora (Smith i Waters, 2019). Može doći i do promjene u omjeru varijanti AGP-a (F1\*S i A) u plazmi jer dolazi i do trostrukog povećanja F1\*S varijante prema A varijanti (Bteich, 2019).

Tijekom upale se ne mijenja samo koncentracija AGP-a već su uočene promjene i u njegovom glikanskom dijelu. Preciznije, promjene u stupnju sijalinizacije i broj terminalnih Le<sup>X</sup> i SiaLe<sup>X</sup> antigena koji predstavljaju strukture nastale fukozilacijom N-acetilglukozamina (GlcNAc) u glikanskim lancima AGP-a. Različite glikoforme imaju različit utjecaj na proliferaciju limfocita u kulturi. Iz literature nije jasno koliko su zaslužni glikanski lanci, a koliko peptidni dio za biološku aktivnost AGP-a. U istraživanju Shiyan i Bovin 1997, N-glikanski lanci AGP-a su odstranjeni s peptidnog dijela glikoproteina te preneseni na inertni poliakrilamidni nosač kako bi se utvrdilo koliki je utjecaj peptidne strukture glikoproteina, a koliki glikanskih lanaca na imunomodulatorno djelovanje AGP-a. Visok prinos ovog procesa donosi sintetska molekula na kojoj je broj glikanskih lanaca sličan onom koji se nalazi na prirodnom AGP-u. Blagi uvjeti modifikacije i vezanje omogućuju zadržavanje netaknute sijalinske kiseline u strukturi te odabir određenih polimerskih nosača omogućava sintezu konjugata koji ima srednju molekulsku masu sličnu onoj AGP-a, otprilike 40 kDa. Sintetizirani pseudo-AGP se razlikuje od nativnog AGP-a u dva aspekta: nema peptidni dio i glikanski lanci se ne nalaze u istom relativnom rasporedu. Navedeni pseudo-AGP zadržava sposobnost moduliranja proliferativnih odgovora limfocita na mitogen, može aktivirati mononuklearne stanice i modulirati monocitnu sintezu TNF $\alpha$ . Protočna citometrija je pokazala da se pseudo-AGP veže na krvne stanice na sličan način kao i prirodan AGP. Ovo istraživanje pokazuje da su glikanski lanci bitni za ovaj biološki efekt te da točan raspored glikanskih lanaca u peptidu ili na nosaču nije bitan za učinak (Shiyan i Bovin, 1997).

## b. STRUKTURA

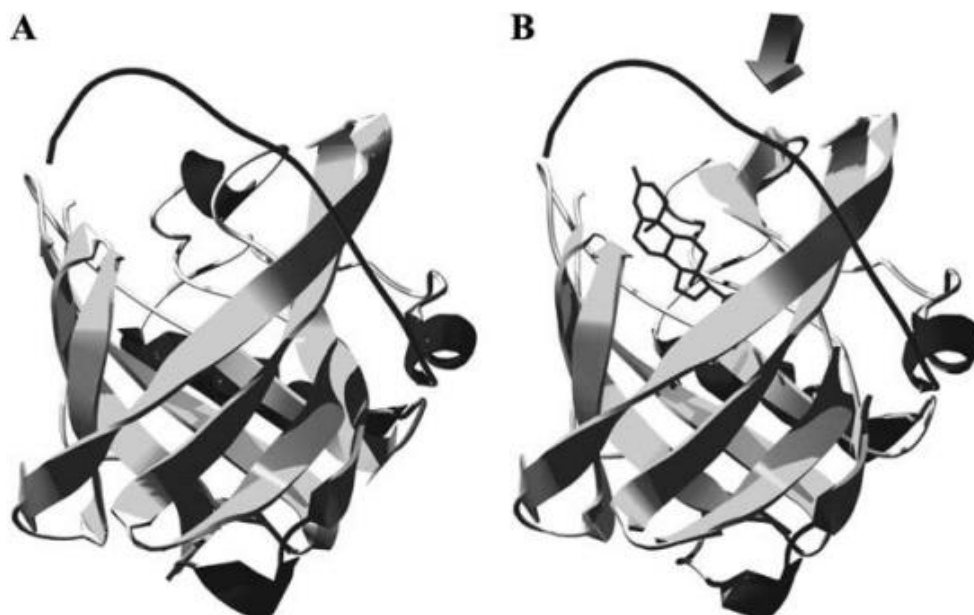
$\alpha$ -1 kiseli glikoprotein ili poznat kao i oromukozid (ORM) je negativno nabijeni kiseli glikoprotein plazme visokog ugljikohidratnog udjela u strukturi. Sadrži 59% proteinskog dijela (u ljudi, zreli oblik AGP-a se sastoji od 183 aminokiselina (Bteich, 2019)) i 41% ugljikohidratnog dijela. AGP se smatra jednim od najglikoziliranih poznatih proteina (Israili i Dayton, 2013). Visoko je topljiv u vodi i drugim organskim polarnim otapalima. Ukupni naboj AGP-a je negativan i ovisi o prirodi glikanskog dijela. Njegova izoelektrična točka varira između 2,8 i 3,8, pri

fiziološkom pH od 7,4. 11% glikanskog dijela čini sijalinska kiselina. Visok udio sijalinske kiseline pridonosi negativnom naboju na površini AGP-a i određuje vrstu interakcija koje ovaj glikoprotein može imati s biološkim membranama (Bteich, 2019). AGP dijeli značajnu homologiju s ljudskim imunoglobulinom G (IgG) i epidermalnim faktorom rasta (EGF)-vezujućom domenom EGF receptora (Smith i Waters, 2019).

#### i. PEPTIDNI DIO

Peptidnu strukturu AGP-a čine 183 aminokiseline (Bteich, 2019). AGP sadrži dvije disulfidne veze između cisteina 5-147 i 72-164 (Kopecky, Etrich, Hofbauerova i Baumruk, 2002) u svojim glavnim alelnim varijantama koje održavaju stabilnost njegove sekundarne strukture. Disulfidne veze, poput sijalinskih kiselina, doprinose potencijalnim interakcijama AGP-a s biomembranama. Nativni proteini sadrži 15%  $\alpha$ -heliksa, 41%  $\beta$ -ploča, 12%  $\beta$ -zavoja, 8% pregiba, i 24% nesređene strukture pri pH 7,4. Udio  $\alpha$ -heliksa može porasti tijekom disulfidne redukcije i u prisutnosti biomembrana (Bteich, 2019).

Unutrašnjost peptidnog dijela molekule sadrži tri reznja. Glavni reznaj broj I je voluminozan i apolaran te pruža dovoljno prostora za smjestiti ligande hidrofobnih karakteristika. Ulaz u pukotinu sadrži dva pozitivno nabijena ostatka, Arg68 i Arg90, koji podliježu interakcijama s polarnim i negativno nabijenim ligandima. Ulaz u pukotinu varijante A ljudskog AGP-a je uži od onog kod F1\*S, dakle varijanta F1\*S veže veću raznolikost liganada. Reznaj I je dubok otprilike 18 Å i sadrži Tyr27, Phe 49, Phe51, Leu 62, Leu79, Ile88, Leu101, Tyr110, Leu112 i Tyr127. Drugi apolarni ostaci Ile13, Leu18 i Val81 formiraju njegovo dno. Hidrofobni reznaj I u AGP-u je smješten između dva negativno nabijena, manja reznja (reznjevi II i III). Zbog negativnog naboja na površini AGP-a, dobro je topljiv u ekstracelularnom prostoru (Bteich, 2019). Predloženo je da je karcinoembrijski antigen (CEA) prekursor AGP-a zbog imunosne sličnosti AGP-a i CEA (Israili i Dayton, 2013).



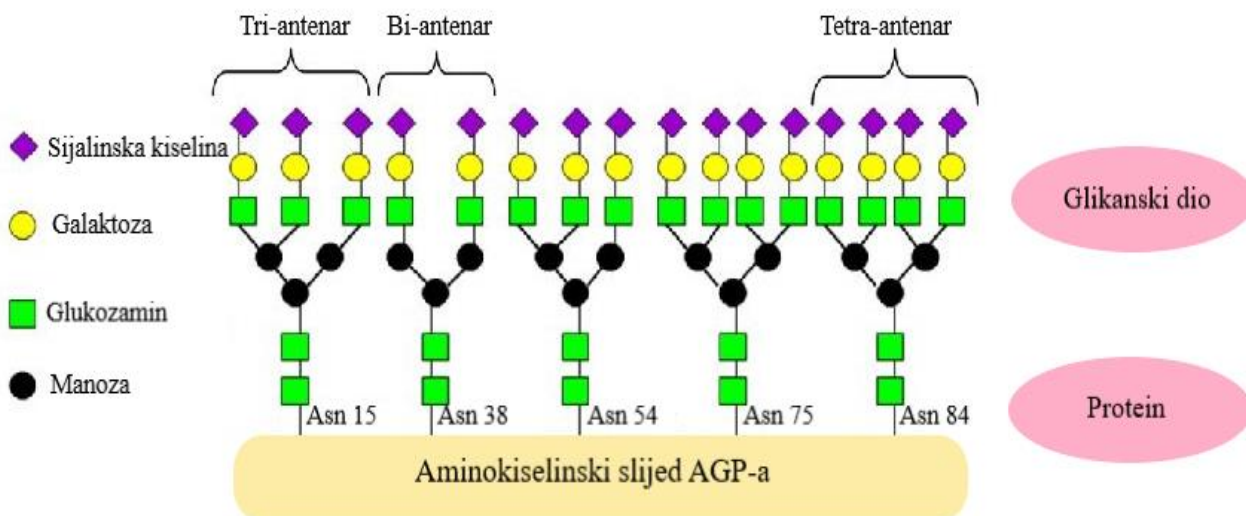
*Slika 1: molekularni model AGP-a u nativnom stanju (A) prikazuje 8 antiparalelnih  $\beta$  bačvi; vezanjem progesterona  $\alpha$  heliks postaje antiparalelna  $\beta$  ploča (Kopecky, Etrich, Hofbauerova i Baumruk, 2002)*

## ii. GLIKANSKI DIO

Peptidni dio AGP-a može biti modificiran glikozilacijom i/ili fosforilacijom. AGP sadrži osam mogućih fosforilacijskih mjesta, ali opseg fosforilacije i njezina uloga u funkciji AGP-a nisu opsežno istraživani (Huang i Ung, 2013). Glikozilacija to jest dodatak oligosaharidnih lanaca (glikana) je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija s učestalošću od 50% kod eukariotskih proteina. Glikoziltransferaze i glikozidaze su zaslužne za sintezu prekursora glikana, proces koji je jako osjetljiv na promjene za vrijeme bolesti. Oligosahariltransferaze mogu prenositi glikane na polipeptidni lanac na asparaginske (N-vezanje) ili serinske/treoninske (O-vezanje) ostatke. Glikanske veze mogu poprimiti  $\alpha$  ili  $\beta$  konfiguraciju što omogućuje veću strukturalnu raznolikost. Postoji visok stupanj raznolikosti što za posljedicu ima jako nizak, ali velik raspon  $pK_a$  koji iznosi između 2,8 i 3,8. Desijalinizacija može uzrokovat povećanje  $pK_a$  na 4,2-4,7 (Waters i Smith, 2019).

Postoji pet strukturalno heterogenih ugljikohidratnih entiteta (pet N-glikana) s mono-, bi-, tri- i tetra-antenarnim glikanima kovalentno vezanima na pet asparaginskih (Asn) ostataka, koji formiraju N-glikozilacijska mjesta (Asn-15, Asn-38, Asn-54, Asn-75, Asn-85) (Bteich, 2019).

Glikanski lanci vezani na AGP se sastoje od N-acetil-D-glukozamina (GlcNAc), D-manoze (Man), L-fukoze (Fuc), D-galaktoze (Gal) i  $\alpha$ -D-neuraminske kiseline (NeuAc) (Fernandes, Ligabue-Braun i Verli, 2015).



Slika 2. Di-, tri- i tetra- antenarni N-glikanski kompleks ljudskog AGP-a (Smith, Behan, Matthews-Smith i Magliocco, 2012 prema Mustač, 2020)

Ovi glikani su strukturalno heterogeni zahvaljujući velikoj raznolikosti završnih šećera. Sijalinska kiselina je jedan od najčešćih završnih šećera te može biti vezana na galaktozu putem  $\alpha$ 2-3 ili  $\alpha$ 2-6 veze. Dodatno, fukoza je također prepoznat završni šećer, koji povećava ekspresiju četiri sijalinska Lewis epitopa (Lewis<sup>X</sup>) u akutnim i kroničnim upalama. Postojanje epitopa ukazuje na sudjelovanje AGP-a u više fizioloških procesa. Primjerice, sijalinizirani-Lewis X epitop, ili SLe<sup>x</sup> ( $\alpha$ -NeuAc-(2→3)- $\beta$ -Gal-(1→4)-( $\alpha$ -Fuc-(1→3)) $\beta$ -GlcNAc) je vezni epitop za E- i P-selektine, koji sudjeluju u o upali ovisnoj adheziji neutrofila, monocita i trombocita. U metastazi tumora, ovo vezanje može utjecati na migraciju tumorskih stanica u udaljena tkiva (Fernandesa i sur. 2015). Nedavnim istraživanjima kristalne strukture AGP-a su pokazala da se barem dva N-glikana, vezana na Asn38 i Asn 75, nalaze na ulazu u džep u koji se smještaju ligandi te imaju potencijala utjecati na pristup liganada džepu (Huang i Ung, 2013). Ugljikohidratni dio doprinosi stabilnosti proteina, nativnoj konformacijskoj strukturi i topljivosti (Bteich, 2019).

### c. POLIMORFIZMI

Genski polimorfizam AGP-a, pojava koja označava postojanje najmanje dva alela na jednom genskom lokusu te posljedično i postojanje glikoproteina u dvije ili više forme, uočena je izolacijom različitih formi AGP-a te kasnije i detekcijom gena za AGP. Heterogenost AGP-a, kao što je već ukratko spomenuto u prethodnom tekstu, nije uočena samo na peptidnoj razini već i u ugljikohidratnom dijelu molekule te je posljedica pozicije vezanja sijalinske kiseline, abnormalne glikozilacije i/ili genskog polimorfizma (Israili i Dayton, 2013).

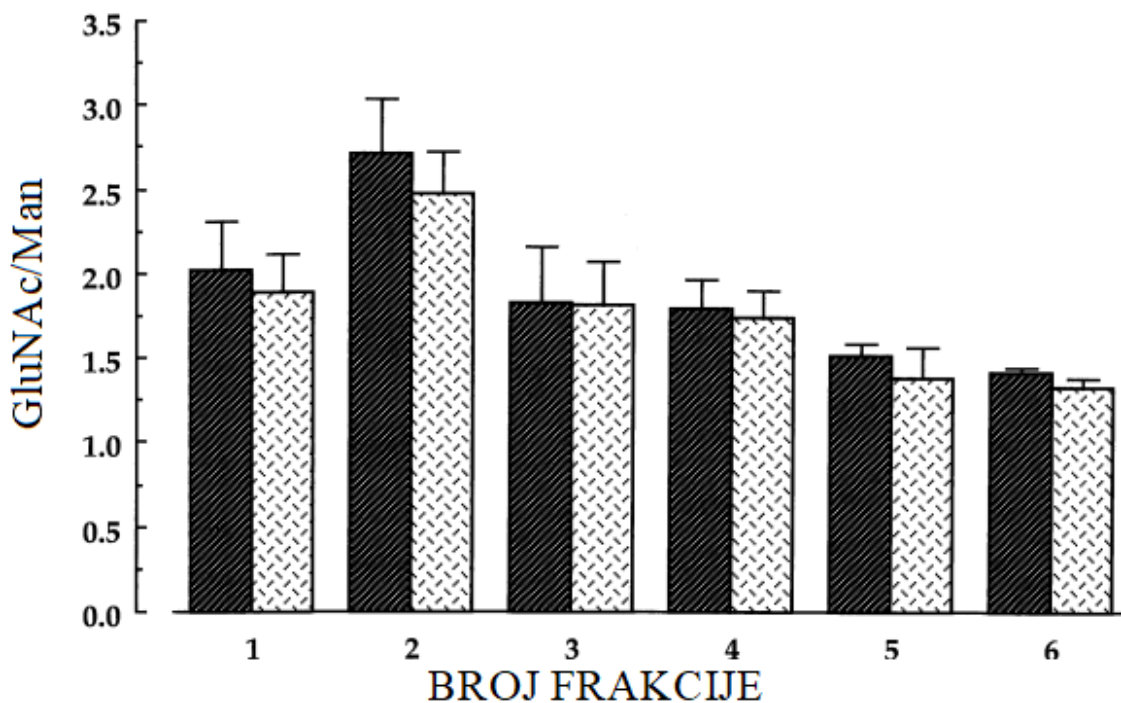
Postoje dvije glavne genske varijante AGP-a, F1\*S i A, dok podvarijante čine F1, F2, S i A. Razlika u aminokiselinskom slijedu između ove dvije varijante je posljedica supstitucije otprilike 20 aminokiselina, koja utječe na afinitet i stereoselektivnost vezanja AGP-a i liganda. Varijanta F1\*S je dominantna i u normalnim uvjetima njezina ekspresija je dva do tri puta veća od varijante A. Ekspresija AGP-a je pod kontrolom tri susjedna gena koji su locirani na kromosomu 9, AGP-A kodira F1, F2 i S varijantu dok AGP-B i AGP-B' kodiraju A varijantu. Sva tri navedena gena su strukturno slična jedan drugome, AGP B/B' geni su identični dok AGP A gen sadrži 22 kodon/baza supstitucije. F1 i S varijante su rasprostranjene po cijelom svijetu, dok je F2 varijanta pronađena samo kod Europljana i zapadnih Azijata. F1, F2 i S se uglavnom grupno nazivaju F1\*S zato što su kodirani dvama alelima AGP-A gena, razlikujući se u manje od pet aminokiselina (F1 ima Gln-38/Val-174; F2 ima Gln-38/Met-174; S ima Arg-38/Val-174). Nasuprot navedenim varijantama, varijanta A kodirana je AGP-B/B' genom (Taguchi i sur., 2013). Većina pojedinaca posjeduje mješavinu ovih varijanti. F1+S+A je najčešći fenotip (50%), nakon kojeg slijede F1+A (35%) i S+A (15%). Nisu uočene razlike u ekspresiji ovih varijanti između spolova (Waters i Smith, 2019). Ove dvije varijante pokazuju drugačije afinitete za određene lijekove; diizopiramid, amitriptilin i deramciklan pokazuju veći afinitet za A varijantu, dok imatinib, dipiridamol i varfarin imaju veći afinitet za F1\*S varijantu (Huang i Ung, 2013).

Različit broj grananja i vrsta terminalnih šećera uzrokuju heterogenost AGP-a, s najmanje 20 opisanih glikanskih struktura. Fiziološki ili okolišni uvjeti utječu na varijabilnost u glikanskom grananju. Heterogenost glikozilacije ne utječe samo na vezanje ksenobiotika, već i na kinetiku samog proteina (njegovo poluvrijeme, katabolizam, unos) (Bteich, 2019). Biološka sinteza i procesiranje ugljikohidratnog dijela glikoproteina rezultira mikroheterogenošću, a posljedica različite glikozilacije različitih glikozilacijskih mjesta rezultira mjesnom heterogenošću (Imre,

Schlosser, Pocsfalvi, Siciliano, Molnar-Szollosi, Kremmer, Malorni i Vekey, 2005). Za vrijeme upale, glikanski lanci vezani na Asn54, Asn75 i Asn85 mogu podlijeći fukozilaciji, stvarajući sijalinski-Lewis X epitop (Fernandes i sur. 2015). Halsall i sur. (1992) istraživali su raspodjelu oligosaharida na pet glikozilacijskih mjesta u određenim varijantama AGP-a koristeći konkanavalin A afinitetnu kromatografiju, razdvajanje obrnuto faznom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (RP-HPLC) i MALDI-masenu spektrometrijsku analizu te su otkrili da je postotak kompleksnih glikanskih lanaca na svakoj poziciji različit. Imre i sur. (2005) su pronašli da triantenarni tip kompleksa oligosaharida prevladava na poziciji I (Asn-15) i II (Asn-54), IV (Asn-75) i V (Asn-85) te da pozicije IV i V također pokazuju veći stupanj grananja i/ili dužih grana. Pronađeno je da se glikozilacija AGP-a mijenja tijekom različitih fizioloških i patoloških procesa. Primjerice, znatan porast biantenarnih glikoformi u pacijenata s karcinomom te porast u stupnju 3-fukozilacije se događa u ranim fazama akutne reakcije. AGP u pacijenata s rakom (limfom, rak jajnika itd.) ima veći stupanj sijalinizacije i fukozilacije te različite relativne omjere ukupnih bi-, tri- i tetra-antenarnih nizova. Nadalje, druga patološka stanja kao što su kronična upala, trudnoća, reumatoidni artritis, alkoholna ciroza jetre, sepsa također mogu biti uzrok promjene u glikozilaciji AGP-a (Taguchi i sur., 2013). U drugim istraživanjima pronađen je veći stupanj grananja (većinom diantenarnih glikana) kod pacijenata s karcinomom, također i kod pacijenata s astmom je uočena promjena u grananju glikana, bez porasta koncentracije AGP-a (Huang i Ung 2013). Nije poznato imaju li promjene u glikozilaciji AGP-a utjecaj na njegovu biološku funkciju. Međutim, prisutnost glikana utječe na konformacijsku stabilnost i posttranslacijsku modifikaciju procesa slaganja glikoproteina, uključujući HIV-1 tip-glikoprotein 123, kvercetin 2, 3-dioksidgenaza,  $\alpha_1$ -antitripsin i prion protein. Dakle, moguće je da promjene u glikozilaciji AGP-a, koje se događaju za vrijeme različitih patoloških stanja, služe obrani AGP-a od egzogenog stresa ili olakšanju različitih imunomodulatornih ili protuupalnih događaja (Taguchi i sur., 2013).

Što se tiče razlika u koncentraciji i strukturi AGP-a ovisno o spolu, izvještaji su različiti. Postoji statistička razlika, ali je relativno mala u usporedbi s razlikama uočenima u bolesti ili za vrijeme razvoja. Booker, Taylor i Saba (1996) su pronašli statistički značajnu razliku u koncentraciji AGP-a između muške i ženske novorođenčadi, a koja iznosi 0,42 mg/ml i 0,33 mg/ml. Neka istraživanja su pokazala da je koncentracija niža kod ženskih ispitanika nego kod muških što se objašnjava supresivnim djelovanjem estrogena na ekspresiju AGP-a (Huang i Ung,

2013). Također, pronađeno je da je stupanj grananja glikanskih lanaca niži kod žena nego kod muškaraca (omjer GluNAc/Man je veći u AGP-u muških ispitanika što je indikator razgranosti lanca), ali ugljikohidratni udio je veći kod žena nego kod muškaraca (Kishino, Nomura, Itoh, Nakagawa, Takekuma, Sugawara, Furukawa, Todo i Miyazaki, 2002).



Slika 3: Usporedba stupnja grananja glikanskih lanaca (GluNAc/Man) u frakcijama dobivenima kromatografijom pročišćenog AGP-a između muških (n=5, crni stupci) i ženskih (n=5, bijeli stupci s kratkim crtama) ispitanika (Kishino, Nomura, Itoh, Nakagawa, Takekuma, Sugawara, Furukawa, Todo i Miyazaki, 2002)

Koncentracija AGP-a raste tijekom razvoja od neprimjetnih vrijednosti u fetusu, preko 0,1-0,2 mg/ml u pupčanoj vrpici, sve do 0,3 mg/ml pri porodu te raste do 0,4-0,7 mg/ml u dobi od 2-3 mjeseca i dostiže koncentraciju kao i u odrasle osobe u dobi od 10-12 mjeseci (Smith i Waters, 2019). Trudnoća također može utjecati na razinu AGP-a u krvi. Za vrijeme trudnoće razina AGP-a je niža te pada tijekom trudnoće sve do poroda, a nakon poroda ponovno počinje rasti do vrijednosti prije trudnoće. Wood i Wood (1981) su pronašli iste vrijednosti kod žena koje jesu i nisu trudne, ali broj ispitanica je bio relativno nizak (n=10) (Smith i Waters, 2019). U istraživanju Shiyan i Bovina (1997), proučavane su glikoforme AGP-a dobivenog iz različitih izvora, AGP zdravih donora (nAGP), AGP donora koji boluju od karcinoma dojke (cAGP), AGP donora koji boluju od karcinoma želuca (dobiven iz ascitične tekućine) (sAGP) i AGP dobiven iz fetalne krvi



tijekom pobačaja (fAGP). Ova četiri glikoproteina su imali sličan aminokiselinski sastav, slične molekulske mase, ali su se razlikovali u izoelektričnim točkama, koje su iznosile za nAGP 2,7-3,4, cAGP 2,7-3,1, sAGP 2,7-3,2 i fAGP 2,8-3,0. fAGP je jedini sadržavao O-vezane glikane (sadržavao je tri N-vezana i tri O-vezana glikana) (Shiyan i Bovin, 1997).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

AGP je protein plazme čija je heterogenost prepoznata na više razina; glikanskoj i peptidnoj. Spoznaja o njegovoj heterogenosti je pokrenula istraživanja o utjecaju različitih varijanti na fiziološki učinak AGP-a. Kako bi uopće bilo moguće otkriti različit utjecaj varijanti, potrebno je pronaći metode koje ih efikasno razdvajaju. Smjesa AGP-a sadrži varijante različitih izoelektričnih točaka (pI, pH otopine pri kojem je naboj molekule jednak nuli) (Herve, Gomas, Duche i Tillement 1993 i Shiyan i sur. 1997). Zbog navedenog moguće je koristiti metode razdvajanja koje se temelje na razdvajanju molekula različitih izoelektričnih točaka. Jedna od tih metoda je kromatografija ionske izmjene koja predstavlja jednostavan i jeftin način razdvajanja varijanti AGP-a te bi olakšala daljnja istraživanja utjecaja heterogenosti AGP-a na njegovu funkciju. Cilj ovog istraživanja je razdvojiti forme nativnog (sijaliniziranog) i desijaliniziranog AGP-a različitih izoelektričnih točaka koristeći niskotlačnu kromatografiju ionske izmjene u pH gradijentu.

### 3. MATERIJALI I METODE

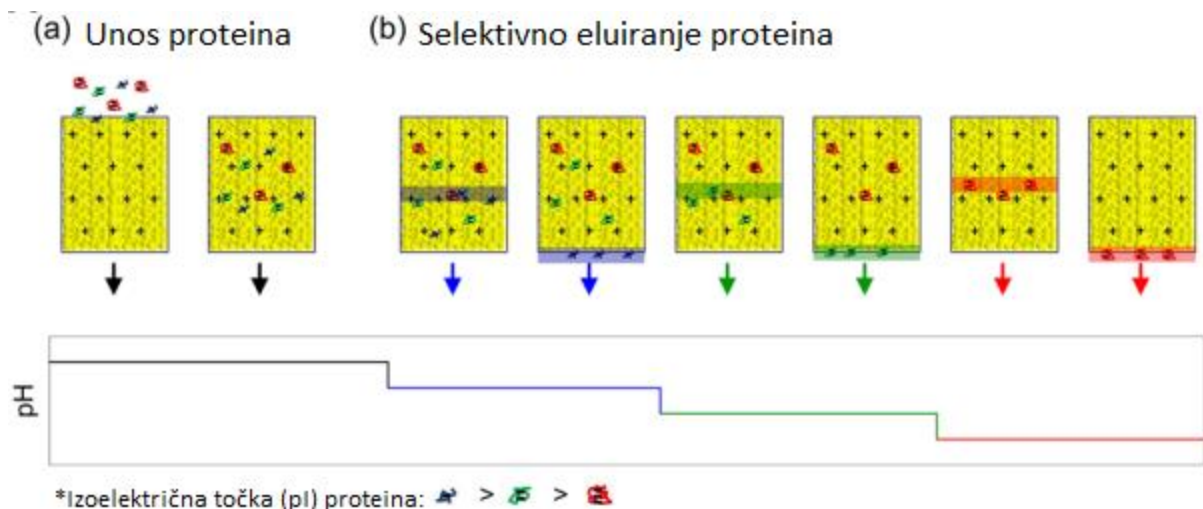
#### 3.1. DESIJALINIZACIJA

Desijalinizirani AGP je pripremljen inkubacijom nativnog AGP-a u imobiliziranim SialEXO Microspin kolonama (Genovic, AB, Švedska) miješanjem na sobnoj temperaturi. SialEXO je komercijalna neuraminidaza ili sialidaza, enzim koji katalizira reakciju hidrolize terminalnih sialinskih kiselina. Enzim je aktivan na N- ili O-vezanim glikanima prisutnim na nativnim glikoproteinima ili oslobođenim glikanskim strukturama.

Postupak desijalinizacije se odvija u tri koraka: uravnoteženje, desijalinizacija te sakupljanje desijaliniziranog glikoproteina. U prvom koraku, kolona se prvo centrifugira pri 200 g jednu minutu kako bi se uklonila otopina za pohranu. Zatim se kolona ekvilibrira dodajući 300  $\mu$ L reakcijskog pufera (20 mM Tris pufer, pH 6,8) te se centrifugira pri 200 g što se ponovi ukupno tri puta. U drugom koraku, desijalinizacija, AGP (maksimalno 0.5 mg po koloni) se dodaje u 100-300  $\mu$ L pufera za digestiju. Otopina se inkubira na sobnoj temperaturi 30 minuta te se neprestano miješa koristeći automatsku miješalicu. Sakupljanje desijaliniziranog AGP se radi centrifugiranjem otopine pri 1000 g.

#### 3.2. KROMATOFOKUSIRANJE

Kromatofokusiranje je metoda razdvajanje proteina koju su prvi put opisali Sluyterman i suradnici između 1977. i 1981. (Li i Hutchens, 1992). Tijekom kromatofokusiranja, naboj molekule (u ovoj analizi molekule AGP-a) se kontinuirano mijenja promjenom pH pufera. U silaznom pH gradijentu, naboj molekule se mijenja od negativnog preko neutralnog do pozitivnog. Na početku analize dolazi do vezanja proteina za pozitivno nabijenu kolonu. Smanjenjem pH pufera dolazi do eluiranja sada negativno nabijenog proteina s pozitivno nabijene kolone (Giri, 1990).



Slika 4: princip kromatofokusranja (Suk Rho, Hanke, Ottens i Gardeniers, 2018)

Razdvajanje formi je obavljeno koristeći puferne pH gradijentu kromatografiju (pIsep, CryoBioPhysica Inc., SAD). Isprva su pripremljeni puferi pH 2,4 i 10,8. Puferi navedenih pH vrijednosti pripremljeni su koristeći pIsep koncentrate A i B (CryoBioPhysica Inc., SAD). Pufer pH 2,4 pripremljen je dodavanjem 5mL koncentrata A i 1mL koncentrata B u 400 mL vode. Pufer pH 10,8 pripremljen je dodavanjem 5mL koncentrata B u 400 mL vode. Mjerenjem električnog potencijala otopine odrađena je provjera pH otopina. U slučaju za potrebom korekcije pH otopine dodani su 1M ili 5M NaOH ili 1M ili 5M HCl. Pripremljeni pufer pH 2,4 korišten je dalje u analizi. Za daljnju analizu pripremljen je pufer pH 4 miješanjem prethodno pripremljenih pufera pH 2,4 i 10,8. Volumni udjeli pufera pH 2,4 i 10,8 za dobivanje pufera pH 4 dobiveni su korištenjem pIsep pH Gradient Maker Software-a (2.0 verzija). Volumni udjeli iznose 81,4% za pufer pH 2,4 i 18,6% za pufer pH 10,8. Potenciometrijski je provjeren točan pH pufera te je u slučaju potrebe za korekcijom pH dodan 1M NaOH ili 1M HCl. Također, za analizu sijaliniziranog AGP-a, pripremljen je pufer pH 6. Pripremljen je miješanjem pufera pH 2,4 i 10,8 u volumin omjerima dobivenim pIsep pH Gradient Maker Software-a (2.0 verzija). Volumni omjeri iznose 57,1% za pufer pH 2,4 i 42,9% za pufer pH 10,8. U slučaju potrebe za korekcijom pH nakon potenciometrijskog određivanja, otopini je dodan 1M NaOH ili 1M HCl.

AGP je otopljen u puferu pH 4. Smjesa AGP-a (pH=4) je nanjena na HiTrap Q HP 1mL anion izmjenjivačku kolonu (GE Healthcare Bio-Science AB, Švedska). Anion izmjenjivačke kolone nose pozitivan naboj na svojoj površini što je u HiTrap Q HP 1mL anion izmjenjivačkoj koloni ostvareno vezanjem kvarternih amonijevih iona na matriks kolone. HiTrap Q HP 1mL anion

izmjenjivačke kolone se mogu koristiti pojedinačno ili se mogu povezivati u seriju što je i učinjeno u ovoj analizi. Eluiranje je rađeno linearnim gradijentom u jednom koraku (0-100% pIsep B, pH=2.4), koristeći AKTA Start FPLC sistem (GE Healthcare, SAD).

### 3.3. MJERENJE APSORBANCIJE

Količina eluiranog AGP-a je određena mjerenjem apsorbancije pri 280 nm. 280 nm je valna duljina čije zračenje apsorbiraju bočni ogranci aromatskih kiselina, tirozin (Tyr), triptofan (Trp) i fenilalanin (Phe), točnije  $\pi$ -elektroni njihovih dvostrukih veza (Strelec i Kovač, 2014). Apsorbancija se može izraziti kao:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Gdje  $A$  označava apsorbanciju na određenoj valnoj duljini (280nm u ovoj analizi),  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent izražen u  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $c$  koncentracija tvari u otopini izražena u  $M$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) i  $l$  označava optički put izražen u  $\text{cm}$ .

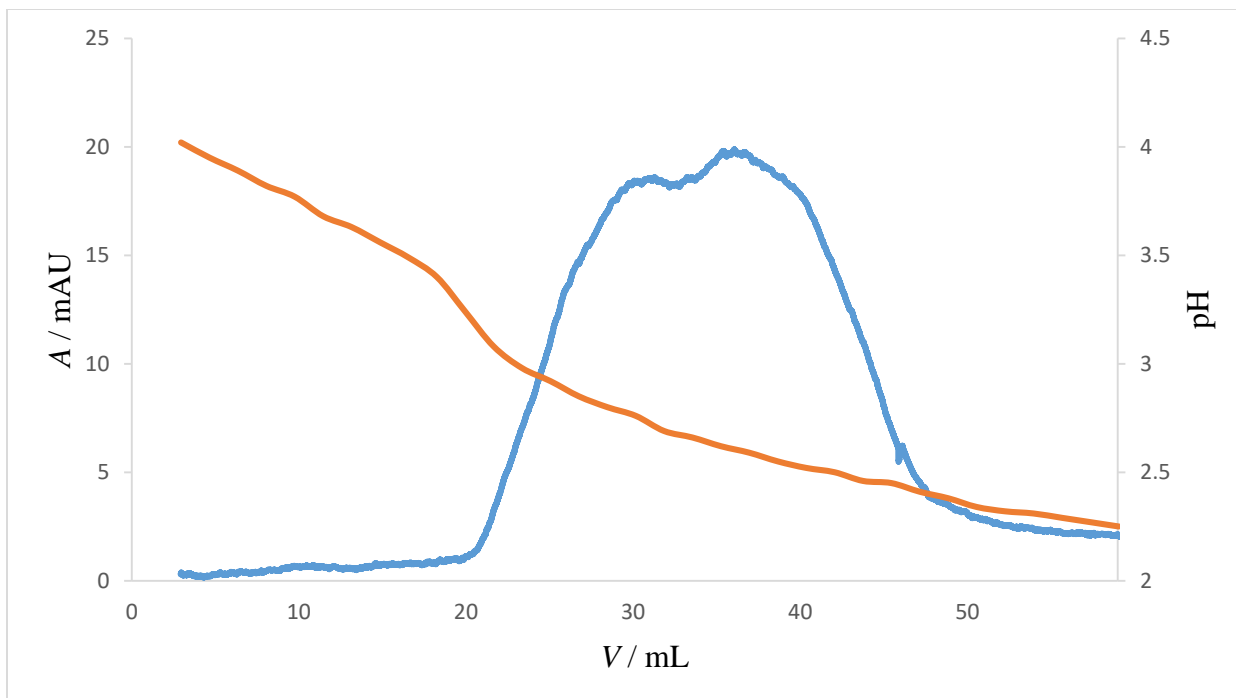
Na kraju postupka izmjeren je pH svih prikupljenih frakcija proteina.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

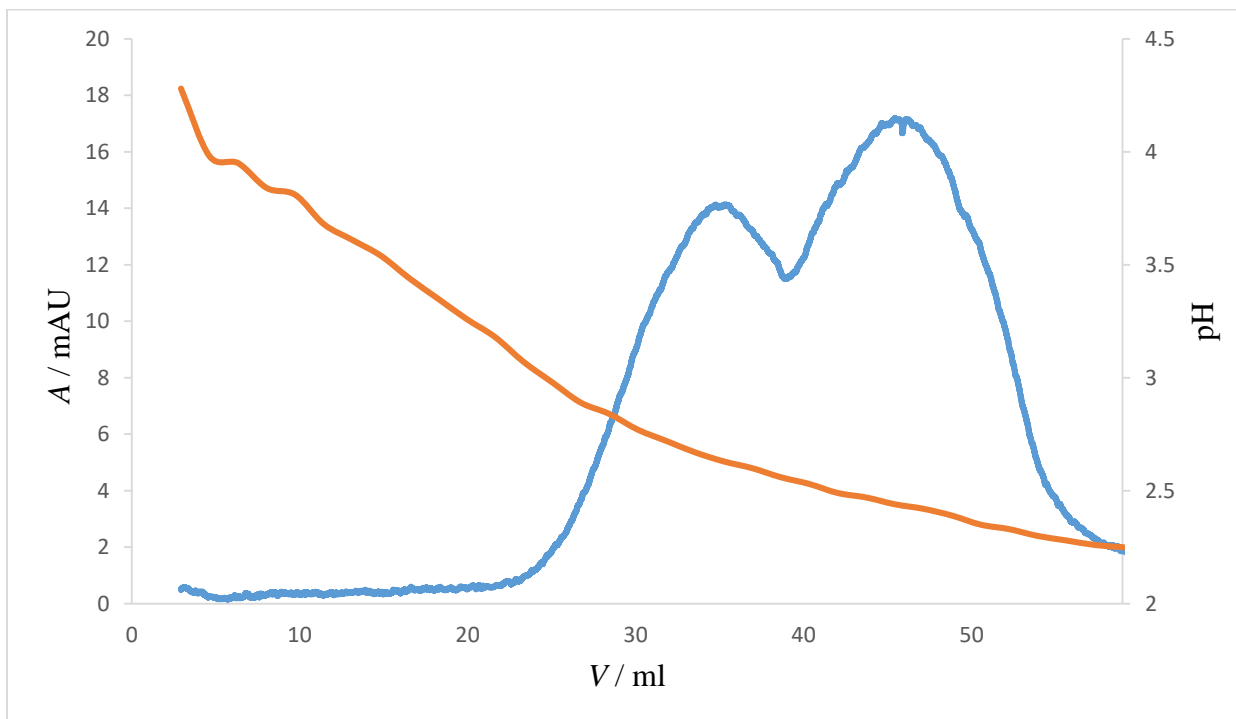
Razdvajanje AGP-a anionsko izmjenjivačkom kromatografijom učinjeno je više puta prilikom razdvajanja nativnog (sijaliniziranog) AGP-a tijekom kojih se mijenjao broj kolona (jedna kolona, tri kolone, pet kolona). Razdvajanje desijaliniziranog AGP-a učinjeno je jednom koristeći pet kolona.

Koristeći rezultate analize, napravljeni su grafovi, to jest kromatogrami (slika 5, slika 6, slika 7, slika 8) pomoću Excel programa. Apscisa grafa (x os) prikazuje volumen eluensa ( $V$ ) izražen u mililitrima (mL). Na ordinatama grafa (y os) prikazane su vrijednosti apsorbancije ( $A$ , lijeva ordinata) izražena u jedinicama mili-apsorbancije i vrijednosti pH otopine (desna ordinata). Obradom podataka dobivene su dvije krivulje koje su prikazane plavom i narančastom linijom u grafu. Plava linija prikazuje ovisnost apsorbancije o volumenu eluensa. Narančasta linija prikazuje ovisnost pH otopine o volumenu eluensa.

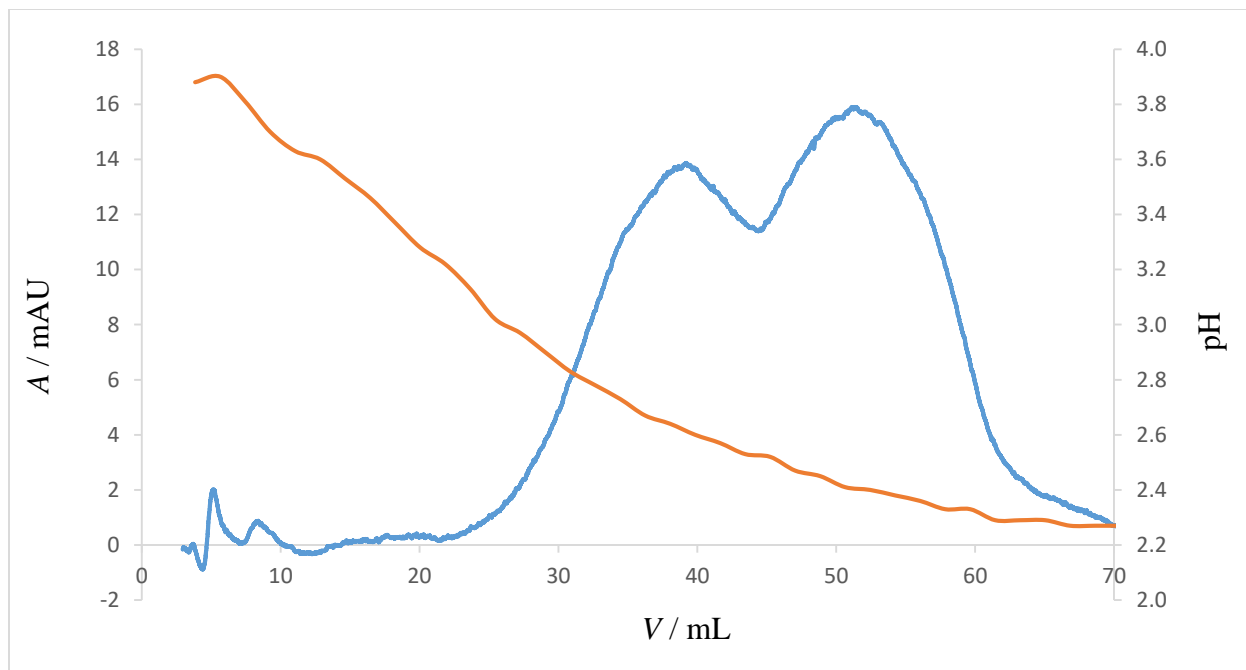
Prilikom razdvajanja nativnog (sijaliniziranog) AGP-a pH otopine se mijenjao u rasponu od 4 do 2,4. Kao što je vidljivo iz rezultata (slika 5, slika 6) povećanjem broja kolona s jedne na tri, povećava se razlučivost metode što se očituje preciznijim vrhovima u grafičkim prikazima rezultata analize. Povećanjem broja kolona s tri na pet (slika 6, slika 7) ne vidi se značajna promjena povećanja razlučivosti metode. Iz grafova je vidljivo da dolazi do nepotpunog odjeljivanja dvije frakcije AGP-a ovisno o pH otopine. Odijeljene frakcije AGP-a razlikuju se u vrijednosti  $pI$ ; prema rezultatima analize koristeći jednu kolonu  $pI$  formi iznosi 2,76 i 2,62, koristeći tri kolone 2,63 i 2,44 te koristeći pet kolona 2,60 i 2,40. Uvidom u dobivene rezultate analize nije moguće odrediti koje su razlike između nepotpuno razdvojenih frakcija AGP-a, primjerice radi li se o različitim glikoformama AGP-a ili genskim varijantama.



Slika 5.: Grafički prikaz rezultata dobivenih aninonskom izmjenom nativnog (sijaliniziranog) AGP-a koristeći jednu kolonu



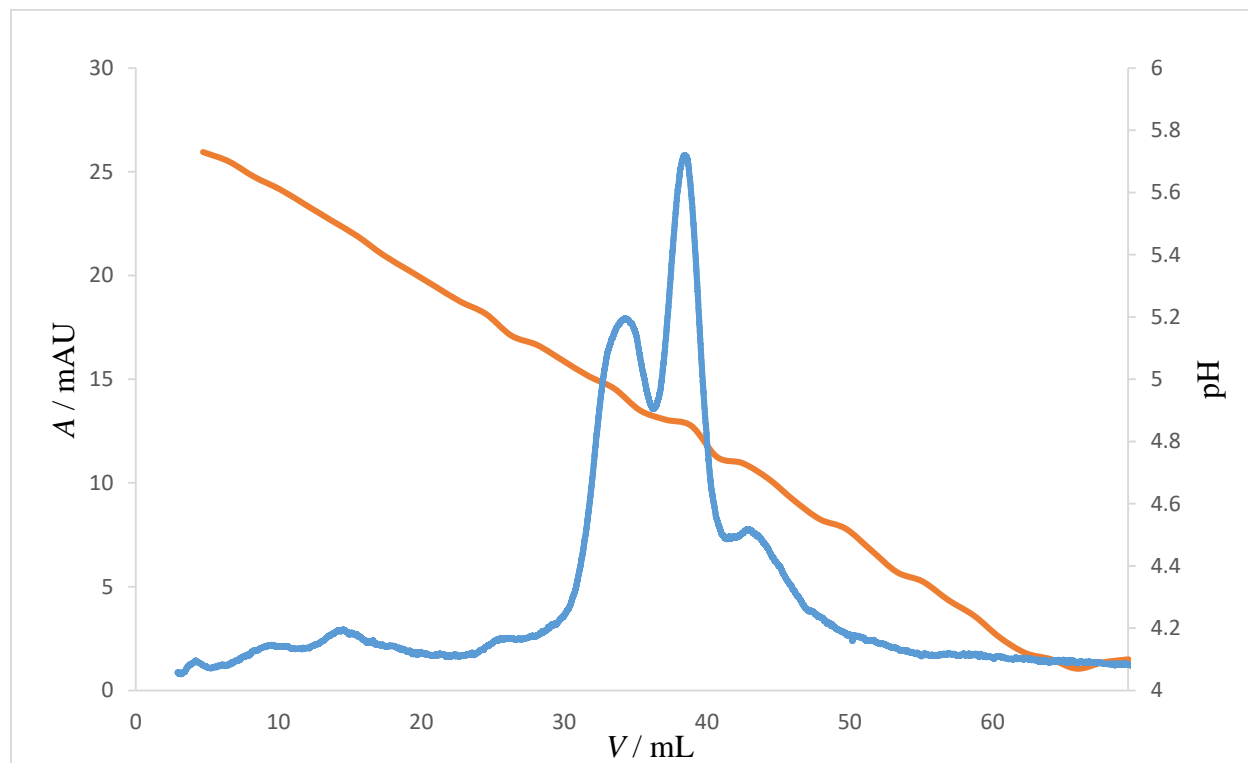
Slika 6.: Grafički prikaz rezultata dobivenih anionskom izmjenom nativnog (sijaliniziranog) AGP-a koristeći tri kolone



Slika 7.: Grafički prikaz rezultata dobivenih anionskom izmjenom nativnog (sijaliniziranog) AGP-a koristeći pet kolona



Također, analiziran je i desijalinizirani AGP, istim postupkom kao i sijalinizirani. Prilikom razdvajanja desijaliniziranog AGP-a pH otopine se mijenjao u rasponu od 6 do 4. Slično kao i u prethodnim analizama, dolazi do odjeljivanja dvije forme AGP-a ovisno o njihovom pI (4.9 i 4.85).



Slika 8.: Grafički prikaz rezultata dobivenih anionskom izmjenom desijaliniziranog AGP-a koristeći pet kolona

## 5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bio je kromatofokusiranjem analizirati, točnije odijeliti različite forme AGP-a. Kromatofokusiranje se smatra jednostavnim, brzim i ekonomičnim načinom za analizu tvari različitih  $pI$  vrijednosti te može predstavljati pogodnu metodu za odjeljivanje različitih formi AGP-a što bi olakšalo njihovu daljnju analizu.

Eksperiment je proveden s jednom, tri i pet kolona koristeći nativni (sijalinizirani) AGP te jednom analizirajući desijalinizirani AGP pomoću pet kolona. Provedenom analizom AGP-a, koristeći kromatofokusiranje, nepotpuno su odijeljene dvije frakcije prethodno desijaliniziranog i sijaliniziranog AGP-a različitih izoelektričnih točaka ( $pI$ ). Rezultati su prikazani grafički kao dva odijeljena vrha čija odijeljenost je izraženija korištenjem većeg broja kolona. Različit iznos  $pI$  vrijednosti može biti posljedica različitih genskih varijanti (što rezultira različitim aminokiselinskim slijedom peptidnog dijela AGP-a) ili različitih glikoformi AGP-a (što se može očitovati u različitom grananju glikanskih lanaca, različitom slijedu monosaharidnih jedinica ili različitom ugljikohidratnom udjelu u AGP-u).

Rezultati eksperimenta su prikazani grafovima izrađenim u Excel programu. Kao parametri su korišteni pH, volumen (mL) i apsorbanciju (mAU) čime je dobiven grafički prikaz promjene pH otopine za vrijeme analize kao i apsorbancija, a posljedično i koncentracija proteina u analiziranim uzorcima. Za vrijeme analize pH otopine, koja je dobivena koristeći pIsep pufere, mijenjao se od vrijednosti 4 prema 2.4, odnosno 6 prema 4 za analizu desijaliniziranog AGP-a, što je rezultiralo eluacijom proteina s kolone, a što je zabilježeno mjerenjem apsorbancije uzorka. Ovisno o broju kolona koje su korištene u analizi, zabilježene su različite  $pI$  vrijednosti navedenih formi AGP-a.

Odijeljene forme ovim načinom bi se mogle koristiti za daljnja istraživanja o utjecaju različitih genskih varijanti ili glikoformi na fiziološki učinak AGP-a.

## 6. LITERATURA

Acikara, O. B. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. U: Martin, D. F. , Martin, B. B. Column Chromatography. London: IntechOpen; 2013. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/44033> doi: 10.5772/55744

Azuma, M., Nishioka, Y., Aono, Y., Inayama, M., Makino, H., Kishi, J., Shono, M., Kinoshita, K., Uehara, H., Ogushi, F., Izumi, K. i Sone, S. Role of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib with macrolides in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2007, 176, 1243-1250.

Bolanča, T. i Ukić, Š. Ionska kromatografija, FKIT, Zagreb, 2013, 1-2.

Booker, P. D., Taylor, C., i Saba, G. Perioperative changes in alpha 1-acid glycoprotein concentrations in infants undergoing major surgery. *British journal of anaesthesia*, 1996, 76, 365-368.

Bteich, M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon*, 2019, 5, 2-8.

Fernandes, C. L., Ligabue-Braun, F. i Verlia, H. Structural glycobiology of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and its implications for pharmacokinetics and inflammation. *Glycobiology*, 2015, 25, 1125-33.

Fournier, T., Bouach, N., Delafosse, C., Crestani, B., i Aubier, M. Inducible Expression and Regulation of the  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein Gene by Alveolar Macrophages: Prostaglandin E2 and Cyclic AMP Act as New Positive Stimuli. *The Journal of Immunology*, 1999, 163(5), 2883-2890.

Giri, L. Chromatofocusing. In *Methods in enzymology*. Academic Press, 1990, 182, 380-392.

Herve, F., Gomas, E., Duche, J. C. i Tillement, J. P. Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Br J clin Pharmac*, 1993, 36, 241-249.

Huang, Z. i Ung, T. Effect of Alpha-1-Acid Glycoprotein Binding on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Current Drug Metabolism*, 2013, 14, 226-238.

Imre, T., Schlosser, G., Pocsfalvi, G., Siciliano, R., Molnár-Szöllősi, É., Kremmer, T., Malorni, A. i Vékey, K. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography—electrospray mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 2005, 40, 1472-1483.

Israili, Z. H. i Dayton, P. G. Human Alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug metabolism reviews*, 2002, 33, 161-235.

Kishino, S., Nomura, A., Itoh, S., Nakagawa, T., Takekuma, Y, Sugawara, M, Furukawa, H., Todo, S. i Miyazaki, K. Age- and gender-related differences in carbohydrate concentrations of a1-acid glycoprotein variants and the effects of glycoforms on their drug-binding capacities. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2002, 58, 621–628.

Kopecky Jr., V., Ettrich, R., Hofbauerova, K. i Baumruk, V. Structure of human a1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 300, 41–46.

Li, C. M., i Hutchens T. W. "Chromatofocusing." *Practical Protein Chromatography*. Humana Press, 1992, 237-248.

Mustać K. Kompeticijsko određivanje konstante vezanja propranolola na alfa-1 kiseli glikoprotein polarizacijskom fluorescencijom [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2020 [pristupljeno 15.08.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:194444>

Rho, H. S., Hanke, A. T., Ottens, M., i Gardeniers, H. J. A microfluidic chip with a staircase pH gradient generator, a packed column and a fraction collector for chromatofocusing of proteins. *Electrophoresis*, 2018, 39, 1031-1039.

Schmid, K. Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma. *Journal of the american chemical society*, 1950, 72(6), 2816-2816.

Shiyan, S. D. i Bovin, N. V. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of a1-acid glycoprotein. *Glycoconjugate Journal*, 1997, 14, 631—638.

Smith, S. A. i Waters, N. J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein. *Pharm Res*, 2019, 36, 30.

Strelec, I., i Kovač, T. (2013). Praktikum iz biokemije. *PTF Osijek, Osijek*.

Taguchi, K., Nishi, K. , Chuang, V. T. G. , ToruMaruyama, T. i Otagiri, M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function. U: Janciauskiene, S. , editor. *Acute Phase Proteins* London: IntechOpen; 2013.

Treuheit, M. J., Costello, C. E., i Halsall, H. B. Analysis of the five glycosylation sites of human  $\alpha$  1-acid glycoprotein. *Biochemical Journal*, 1992, 283, 105-112.

Vasson, M. P., Roch-Arveiller, M., Couderc, R., Baguet, J. C., i Raichvarg, D. Effects of alpha-1 acid glycoprotein on human polymorphonuclear neutrophils: influence of glycan microheterogeneity. *Clinica chimica acta*, 1994, 224(1), 65-71.

Wood, M., i Wood, A. J. Changes in plasma drug binding and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in mother and newborn infant. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1981, 29, 522-526.

Zemek, F., Korabecny, J., Sepsova, V., Karasova Zdarova, J., Musilek, K. i Kuca, K. Albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: old acquaintances. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2013, 9, 943–954.

## 7. SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je odijeliti frakcije AGP-a različitih izoelektričnih točaka anionsko izmjenjivačkom kromatografijom. AGP je protein plazme čije su različite forme zabilježene kako u peptidnom tako i u glikanskom dijelu. Različite glikoforme i genske varijante AGP-a pokazuju različita fizikalno-kemijska svojstva, a jedno od tih svojstava je i pI molekule što otvara mogućnost analize AGP-a kromatofokusiranjem. Korištena metoda, kromatofokusiranje, bazirana je na stvaranju ionskih veza između nabijenih grupa biomolekula i ionsko-izmjenjivačkog gela/nosača koji nosi suprotan naboj. Promjenom pH otopine dolazi do promjene u naboju biomolekule te u njezinoj eluaciji s kolone. Zbog različitih izoelektričnih točaka formi, različit pH otopine će uzrokovati promjenu naboja u biomolekuli te forme što se očituje različitim retencijskim vremenom. Nativna (sijalinizirana) forma AGP-a je analizirana tri puta anionsko izmjenjivačkom kromatografijom, koristeći jednu, tri i pet kolona dok je AGP koji je prethodno desijaliniziran, analiziran anionsko izmjenjivačkom kromatografijom koristeći pet kolona. Rezultati analize su grafički prikazani koristeći Excel program, prikazujući ovisnost pH otopine i apsorbancije uzroka o volumenu otopine. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da su korištenjem metode nepotpuno odijeljene dvije frakcije AGP-a različitih izoelektričnih točaka dok se povećanjem korištenih kolona, povećala razlučivost metode.

## SUMMARY

The goal of this work was to separate fractions of AGP by using anion exchange chromatography. AGP is a plasma protein with different forms in its peptide and glycan portion of molecule. Different glycoforms and genetic variants of AGP have different physico-chemical properties.  $pI$  as one of those properties enables separation of AGP forms by using the chromatofocusing technique. Chromatofocusing is based on the formation of ionic bonds between charged groups of the biomolecule and ion-exchange gel/carrier carrying opposite charge. Changing the pH of the solution, causes the change of the molecule charge and its elution of the column. Due to the different isoelectric points of the forms, different values of pH in the solution change charge of the molecule, which leads to forms having different retention times at column. Native (sialylated) form of AGP was analyzed by using one, three or five columns in a row of anion exchange chromatography while AGP that was previously desialylated was analyzed using anion exchange chromatography only with five columns in a row. Results show the relation between pH or absorbance of the sample and volume of the solution. It can be concluded that two forms of AGP with different isoelectric points were separated, but not completely. Using a higher number of columns increased separation.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za opću i anorgansku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ODJELJIVANJE FORMI $\alpha$ -1 KISELOG GLIKOPROTEINA NISKOTLAČNOM KROMATOGRAFIJOM ANIONSKE IZMJENE

Jelena Radovčić

#### SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je odijeliti frakcije AGP-a različitih izoelektričnih točaka anionsko izmjenjivačkom kromatografijom. AGP je protein plazme čije su različite forme zabilježene kako u peptidnom tako i u glikanskom dijelu. Različite glikoforme i genske varijante AGP-a pokazuju različita fizikalno-kemijska svojstva, a jedno od tih svojstava je i pl molekule što otvara mogućnost analize AGP-a kromatofokusiranjem. Korištena metoda, kromatofokusiranje, bazirana je na stvaranju ionskih veza između nabijenih grupa biomolekula i ionsko-izmjenjivačkog gela/nosača koji nosi suprotan naboj. Promjenom pH otopine dolazi do promjene u naboju biomolekule te u njezinoj eluaciji s kolone. Zbog različitih izoelektričnih točaka formi, različit pH otopine će uzrokovati promjenu naboja u biomolekuli te forme što se očituje različitim retencijskim vremenom. Nativna (sijalinizirana) forma AGP-a je analizirana tri puta anionsko izmjenjivačkom kromatografijom, koristeći jednu, tri i pet kolona dok je AGP koji je prethodno desijaliniziran, analiziran anionsko izmjenjivačkom kromatografijom koristeći pet kolona. Rezultati analize su grafički prikazani koristeći Excel program, prikazujući ovisnost pH otopine i apsorbancije uzroka o volumenu otopine. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da su korištenjem metode nepotpuno odijeljene dvije frakcije AGP-a različitih izoelektričnih točaka dok se povećanjem korištenih kolona, povećala razlučivost metode.

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

Rad sadrži: 27 stranica, 8 grafičkih prikaza i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi:  $\alpha$ -1 kiseli glikoprotein, genske varijante, glikoforme, kromatografija anionske izmjene, kromatofokusiranje

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Tin Weitner**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Davor Šakić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2022.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of General and Inorganic Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### SEPARATION OF $\alpha$ -1 GLYCOPROTEIN FORMS USING LOW PRESSURE ANION EXCHANGE CROMATOGRAPHY

**Jelena Radovčić**

#### SUMMARY

The goal of this work was to separate fractions of AGP by using anion exchange chromatography. AGP is a plasma protein with different forms in its peptide and glycan portion of molecule. Different glycoforms and genetic variants of AGP have different physico-chemical properties. *pI* as one of those properties enables separation of AGP forms by using the chromatofocusing technique. Chromatofocusing is based on the formation of ionic bonds between charged groups of the biomolecule and ion-exchange gel/carrier carrying opposite charge. Changing the pH of the solution, causes the change of the molecule charge and its elution of the column. Due to the different isoelectric points of the forms, different values of pH in the solution change charge of the molecule, which leads to forms having different retention times at column. Native (sialylated) form of AGP was analyzed by using one, three or five columns in a row of anion exchange chromatography while AGP that was previously desialylated was analyzed using anion exchange chromatography only with five columns in a row. Results show the relation between pH or absorbance of the sample and volume of the solution. It can be concluded that two forms of AGP with different isoelectric points were separated, but not completely. Using a higher number of columns increased separation.

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

Thesis includes: 27 pages, 8 figures and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords:  $\alpha$ -1 glycoprotein, genetic variants, glycoforms, anion exchange chromatography, chromatofocusing

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

Reviewers: **Tin Weitner, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Davor Šakić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2022.