

Visokoprotlačna analiza N-glikozilacije alfa-1-kiseloga glikoproteina u identifikaciji biljega šećerne bolesti

Tijardović, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

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:163:500265>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Marko Tijardović

**VISOKOPROTOČNA ANALIZA
N-GLIKOZILACIJE ALFA-1-KISELOGA
GLIKOPROTEINA U IDENTIFIKACIJI
BILJEGA ŠEĆERNE BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Marko Tijardović

**VISOKOPROTOČNA ANALIZA
N-GLIKOZILACIJE ALFA-1-KISELOGA
GLIKOPROTEINA U IDENTIFIKACIJI
BILJEGA ŠEĆERNE BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Marko Tijardović

**HIGH-THROUGHPUT
N-GLYCOSYLATION ANALYSIS OF
ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN IN THE
IDENTIFICATION OF DIABETES
MELLITUS BIOMARKERS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Prof. Olga Gornik Kljaić, PhD

Zagreb, 2022

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Olge Gornik Kljaić, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran projektom Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju (#KK.01.1.1.01.0010).

ZAHVALE:

Dragoj mentorici prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić hvala na usmjeravanju s jedne, ali i povjerenju s druge strane. Hvala na brizi i svim profesionalnim i životnim savjetima koje mi je nesebično pružila. Ona nije samo voditelj, već Mentor u punom smislu te riječi.

Hvala doc. dr. sc. Tomi Keseru, mom mini-mentoru od kojeg sam naučio puno toga, od stručnih znanja, preko zanimljivih činjenica do produhovljenih pogleda.

Hvala dr. sc. Mislavu Novokmetu na prenesenom znanju i sistematičnosti, zajedničkom kopanju po spektrima, kao i pristupačnosti, mudrosti i svim slikovitim analogijama.

Hvala prof. dr. sc. Gordanu Lauču na pruženim prilikama i velikom doprinosu u stvaranju ugodne i plodonosne okoline u kojoj sam se imao sreće naći.

Junior ekipi sa zavoda hvala na izvannastavnim eksperimentima, odličnim raspravama i lošim forama.

Svim članovima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju hvala na iznimno ugodnoj radnoj, ali i kuhinjskoj atmosferi.

Mojoj najkolegici i prijateljici Ani hvala na zajedničkom bodrenju, bliskosti, svim kavama, palačinkama i pripadajućim razgovorima.

Mojim roditeljima hvala na ljubavi, žrtvama i poticanju, kako kroz studij tako i izvan njega.

Hvala i mojoj Evi na podršci, ali i svim ostalim trenucima zbog kojih je ovaj put bio lakši. <3

SAŽETAK:

N-glikozilacija, proces enzimski posredovanog vezanja šećernih struktura na asparaginske ostatke proteina, istraživana je u brojnim bolestima, u mnogima od kojih su promjene i potvrđene. Pronalazak specifičnih promjena N-glikozilacije nudi mogućnost razvoja predikcijskih, dijagnostičkih i prognostičkih alata potrebnih u sprječavanju i liječenju različitih bolesti. Studije ukupne N-glikozilacije proteina plazme provedene u istraživanju predispozicije za šećernu bolest tipa 2, kao i istraživanju šećerne bolesti zrele dobi kod mladih osoba (MODY), identificirale su promjene u glikozilaciji za koje se vjeruje da potječu s alfa-1-kiseloga glikoproteina (AGP). S ciljem detaljnijeg istraživanja ovih promjena, razvijena je metoda za visokoprotočnu analizu N-glikozilacije AGP-a koja uključuje obogaćenje ovog proteina te analizu njegovih glikopeptida metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (LC-MS). Inicijalnom analizom 14 zdravih ispitanika utvrđena je temporalna stabilnost N-glikoma AGP-a, kao općeniti preduvjet za dijagnostičku upotrebu. Novorazvijenom metodom zatim je analizirana glikozilacija AGP-a 108 ispitanika koji se razlikuju po svojoj predispoziciji za razvoj šećerne bolesti tipa 2 te je utvrđena povezanost porasta grananja i smanjenja sijalinizacije glikana AGP-a s povećanim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 2. Nadalje, kod 466 pacijenata oboljelih od različitih tipova šećerne bolesti (HNF1A-, HNF4A-MODY, šećerna bolesti tipa 1 i tipa 2) analizom fukozilacije AGP-a ustanovljeno je njezino smanjenje koje je pokazano specifično za HNF1A-MODY. Nadalje, analizom uzoraka 98 pacijenata oboljelih od šećerne bolesti ranog nastupa bez autoimunosne podloge, pokazano je da je smanjena fukozilacija prisutna samo kod pacijenata s oštećujućim *HNF1A* mutacijama – sržnim uzrokom bolesti. Također, pokazana je visoka uspješnost identifikacije HNF1A-MODY pacijenata na temelju individualnih glikopeptida AGP-a. Prikupljene spoznaje upućuju na mogućnost upotrebe glikozilacije AGP-a kao predikcijskog biljega za šećernu bolest tipa 2, kao i biljega identifikacije pacijenata oboljelih od HNF1A-MODY-a što bi dalo velik doprinos pravovremenom prepoznavanju rizika kao i diferencijalnoj dijagnostici šećerne bolesti.

Ključne riječi:

N-glikozilacija, alfa-1-kiseli glikoprotein, šećerna bolest, tekućinska kromatografija, spektrometrija masa

SUMMARY:

Introduction

N-glycosylation, an enzymatic process of covalent attachment of complex sugar molecules to asparagine residues of protein is one of the most common co- and posttranslational modifications. It is being researched in many diseases with aim of elucidating molecular mechanisms of disease development as well as discovering novel diagnostic markers. Diabetes is one of the diseases where N-glycosylation is being researched extensively with changes in total plasma N-glycosylation already described for most major and some less common types of diabetes. Interestingly, studies performed on predisposition for type 2 diabetes and studies on maturity-onset diabetes of the young (MODY), both found changes in the abundance of glycans which are believed to originate from the same plasma protein – alpha-1- acid glycoprotein. This heavily glycosylated protein is one of major acute phase proteins in human plasma, carrying different complex glycans attached to five glycosylation sites. In order to further explore mentioned findings, a method for high-throughput N-glycosylation analysis of AGP was developed and utilized on the same patient cohorts. Patients with marked hyperglycemia during critical illness are at increased risk for development of type 2 diabetes. By identifying specific N-glycosylation changes of AGP, a predictive marker could potentially be established and applied to identify patients with a predisposition for type 2 diabetes development. On the other hand, MODY is a monogenic type of diabetes, most commonly caused by *HNF1A* gene variants which are responsible for loss of beta-cell function. A path to proper diagnosis is often difficult for HNF1A-MODY. Clinical similarities with other more common types of diabetes results in HNF1A-MODY patients often receiving a misdiagnosis of type 1 or type 2 diabetes. Also, with *HNF1A* sequencing being a confirmative method for this disease, novel variants occasionally present a barrier to diagnosis, when phenotypic effect cannot be easily assessed. Development of a diagnostic tool that could help clinicians to diagnose HNF1A-MODY properly and quickly, would be of great value.

Methods

In this thesis, a high-throughput N-glycosylation AGP analysis method was developed and validated. It enables analysis of many samples in a short time and provides data on glycosylation site level. Considering two isoforms of AGP, a total of 7 glycopeptides corresponding to different glycosylation sites can be analyzed and glycans present on those glycopeptides relatively quantified. This allows for a detailed analysis and comparison of samples regarding

N-glycosylation of AGP. The samples are firstly treated with perchloric and phosphotungstic acid in a two-step precipitation process to isolate the „seromuroid“ fraction of plasma. This AGP enriched sample is further digested by trypsin and resulting glycopeptides are then purified by HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) beads to separate them from more hydrophobic peptides. Samples prepared this way are then analyzed by reverse-phase liquid chromatography coupled to mass spectrometer by electrospray ionization (RP-LC-ESI-MS). Gathered chromatograms can then be further processed by spectra summing over retention time windows for separate glycopeptides, performing quality control for signals of individual glycoforms, and finally relatively quantifying the abundance of glycoforms within each glycosylation site.

Several cohorts were analyzed by this method. A group of 108 patients gathered at the University Hospital Centre Zagreb including patients with hyperglycemia in critical illness was analyzed. Patients older than 18 years of age, with negative history of diabetes who were admitted to the ICU and discharged alive were eligible for inclusion. The cohort also included patients without hyperglycemia during critical illness as controls. N-glycosylation of AGP was compared by logistic regression between cases and controls.

For the study of N-glycosylation of AGP in HNF1A-MODY, two patient cohorts were analyzed. The first cohort included 466 patients grouped by confirmed diabetes types (HNF1A-MODY, HNF4A-MODY, type 1 diabetes, and type 2 diabetes) recruited through clinics and studies from Norway, Slovakia, and the United Kingdom. Fucosylated glycopeptides were compared between HNF1A-MODY and other types of diabetes by generalized linear regression. The second cohort included 98 patients from the United Kingdom and Croatia, with non-autoimmune diabetes characterized by preserved insulin production and diagnosed before 45 years of age. Every patient in this group had *HNF1A* gene sequenced and functionally assessed so the relative abundance of fucosylated AGP glycopeptides was compared by generalized linear regression between damaging, benign, and non-rare variant groups. Additionally, classification potential of fucosylated AGP glycopeptides for HNF1A-MODY patients was assessed by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis and compared based on area under the curve (AUC).

Results

Comparison of N-glycosylation of AGP between patients with hyperglycemia during critical illness and patients without hyperglycemia, statistically significant changes were detected.

Patients with hyperglycemia showed a shift towards more branched glycans by a decrease in biantennary glycans ($p = 0.038$) and an increase in triantennary glycans ($p = 0.037$) of the second glycosylation site. Also, reduction in sialylation was demonstrated by a decrease in fully sialylated glycans of the third glycosylation site ($p = 0.022$) and an increase in glycans with one half and one quarter of potential sialic acids on the third site, as well as glycans with one quarter of potential sialic acids on the fourth glycosylation site ($p = 0.038, 0.022$ and 0.037 respectively).

Comparing the abundance of fucosylated glycopeptides between different types of diabetes, decreased fucosylated glycopeptide levels specifically for HNF1A-MODY patients were found, as expected based on previous studies. The most pronounced difference between HNF1A-MODY and type 2 diabetes was detected on IV₁ N7H8S3F1 glycopeptide ($p = 2.34 \times 10^{-44}$). Similarly, a comparison between groups of patients with damaging, benign, and non-rare *HNF1A* variants showed decreased fucosylation only in patients with damaging, disease-causing *HNF1A* variants. Furthermore, assessment of the diagnostic potential of individual fucosylated AGP glycopeptides demonstrated a very good performance of many glycopeptides where again, IV₁ N7H8S3F1 performed the best, with an AUC of 0.94 (95 % CI = 0.90-0.99).

Conclusions

A method for high-throughput and site-specific N-glycosylation AGP analysis was successfully developed as a part of this thesis. It enables a detailed and reliable AGP N-glycoprofiling from even 5 μ L of plasma.

Patients with an increased risk for type 2 diabetes development have altered AGP N-glycosylation. It is characterized by an increase in branching and a decrease in sialylation of AGP N-glycans. Results obtained from this study suggest a model for identification of patients at increased risk of type 2 diabetes could be developed.

By comparing N-glycosylation of AGP between HNF1A-MODY, HNF4A-MODY, type 1 diabetes, and type 2 diabetes, a reduction in fucosylation was detected specifically for HNF1A-MODY patients. Reduction in fucosylation is present only in patients with damaging *HNF1A* variants. This confirms the association of AGP fucosylation with functionality of *HNF1A* gene and demonstrates this type of analysis could help in assessment of phenotypic effects for uncharacterized *HNF1A* variants. The ability of fucosylated AGP glycopeptides to successfully identify HNF1A-MODY patients from a group of patients with early-onset non-autoimmune diabetes shows a potential for screening and diagnosis of this monogenic diabetes subtype. Very

good performance of even individual fucosylated AGP glycopeptides, especially IV₁ N7H8S3F1, offers a possibility for simplification of analytical procedure which could help introduction of this type of analysis into clinical practice.

Keywords:

N-glycosylation, alpha-1-acid glycoprotein, diabetes, liquid chromatography, mass spectrometry

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Glikozilacija	2
1.1.1. N-glikozilacija	3
1.1.2. N-glikozilacija proteina plazme	4
1.2. Alfa-1-kiseli glikoprotein	5
1.2.1. N-glikozilacija alfa-1-kiseloga glikoproteina	6
1.3. Šećerna bolest	7
1.3.1. Šećerna bolest zrele dobi kod mladih osoba (MODY)	8
1.3.1.1. Dijagnostički potencijal N-glikozilacije kod HNF1A-MODY	9
1.3.2. Hiperglikemija u kritičnoj bolesti	9
1.4. Metode analize N-glikozilacije	10
1.4.1. Analiza oslobođenih N-glikana	11
1.4.2. Analiza N-glikopeptida	11
1.5. Obrazloženje istraživanja	12
2. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI	14
2.1. Ispitanici	15
2.1.1. Utvrđivanje temporalne stabilnosti N-glikozilacije AGP-a	15
2.1.2. Hiperglikemija u kritičnoj bolesti	15
2.1.3. Pacijenti oboljeli od različitih tipova šećerne bolesti	16
2.1.4. Šećerna bolest u mladoj dobi s odsustvom autoimunosti	17
2.2. Metode	17
2.2.1. Razvoj metode za visokoprotočnu analizu N-glikozilacije AGP-a	17
2.2.1.1. Potvrda detekcije glikopeptidnih struktura AGP-a	18
2.2.1.2. Spojni sistem za mikrotitarske pločice	19
2.2.2. Opis metode	20
2.2.2.1. Obogaćivanje AGP-a iz uzoraka plazme	20
2.2.2.2. Redukcija, alkilacija i razgradnja tripsinom	21
2.2.2.3. Obogaćivanje glikopeptida pomoću HILIC-SPE	21
2.2.2.4. RP-LC-ESI-MS	21
2.2.3. Intraindividualna stabilnost N-glikoma AGP-a	22
2.2.4. Obrada podataka i statistika	22
2.2.4.1. Relativna kvantifikacija glikopeptida	22

2.2.4.2.	Korekcija na razlike u serijama-----	23
2.2.4.3.	Izračun deriviranih glikozilacijskih karakteristika AGP-a-----	24
2.2.4.4.	Hiperglikemija u kritičnoj bolesti -----	24
2.2.4.5.	Usporedba fukozilacije AGP-a kod različitih tipova šećerne bolesti-----	25
2.2.4.6.	Usporedba fukozilacije AGP-a prema genskim varijantama <i>HNF1A</i> -----	25
2.3.	Materijali -----	26
2.3.1.	Kemikalije-----	26
2.3.2.	Enzimi i standardi -----	27
2.3.3.	Uređaji i oprema-----	27
2.3.4.	Računalni programi i alati-----	27
3.	REZULTATI I RASPRAVA -----	28
3.1.	Razvoj metode za visokoprotočnu analizu N-glikozilacije AGP-a -----	29
3.1.1.	Validacija metode -----	32
3.1.2.	N-glikozilacijski profil AGP-a iz standardnog uzorka plazme -----	33
3.2.	Intraindividualna stabilnost N-glikoma AGP-a -----	34
3.3.	Hiperglikemija u kritičnoj bolesti -----	37
3.4.	Usporedba fukozilacije AGP-a kod različitih tipova šećerne bolesti-----	42
3.5.	Usporedba fukozilacije AGP-a prema genskim varijantama <i>HNF1A</i> -----	48
3.5.1.	Individualni glikopeptid AGP-a kao prediktor <i>HNF1A-MODY-a</i> -----	53
3.5.2.	Višestruki glikopeptidi AGP-a kao prediktori <i>HNF1A-MODY-a</i> -----	55
4.	ZAKLJUČCI -----	56
5.	LITERATURA -----	59

1. UVOD

1.1. Glikozilacija

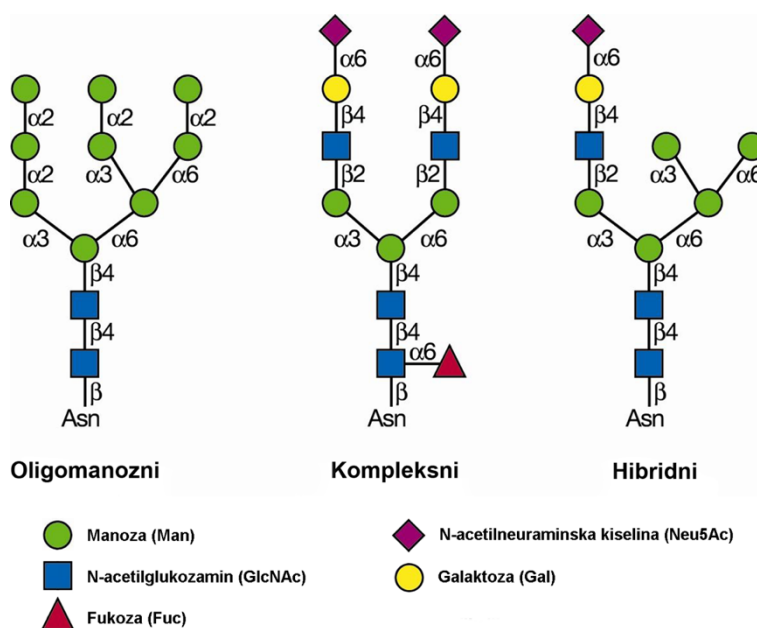
Glikozilacija, proces enzimski posredovanog kovalentnog vezanja ugljikohidratnih struktura na proteine i lipide prisutna je kod svih živućih organizama (1). Ona je među najzastupljenijim i najkompleksnijim kotranslacijskim i posttranslacijskim modifikacijama proteina, strogo regulirana sustavom enzima odgovornih za sintezu, prijenos i doradu glikana - modificirajućih ugljikohidrata. S obzirom na velik broj ugljikohidratnih monomera od kojih glikani mogu biti građeni, kao i veza između njih, kompleksnost glikoma nekoliko je redova veličine iznad kompleksnosti proteoma (2). Uzevši u obzir sveprisutnost, ali i biološki značaj glikana, možemo ih smatrati osnovnim građivnim elementima stanice, zajedno s DNA, proteinima i lipidima. Njihova kompleksnost, uz činjenicu da je konačna struktura glikana rezultat interakcije genske pozadine i okolišnih faktora (3), omogućuju modifikaciju stanične fiziologije kao odgovor na prethodna stanična zbivanja (4). Ovakvim sustavom olakšava se i ubrzava prilagodba funkcije proteina i nastanak novih struktura bez nužnosti genskih promjena (5). S druge strane, evolucijsko oslanjanje na glikane kao fiziološke modifikatore otvara mogućnost patofizioloških promjena uslijed poremećaja glikozilacije (6).

Proteine na koje su vezani glikani možemo prema strukturi i sastavu vezanih ugljikohidrata grubo podijeliti na proteoglikane i glikoproteine (1). Proteoglikani se sastoje od sržnog proteinskog dijela na koji su vezani glikozaminoglikanski lanci, dugački nerazgranati kopolimeri ponavljajućih disaharidnih jedinica. Uloge proteoglikana najčešće uključuju sudjelovanje u formiranju i održavanju izvanstaničnog matriksa. Za razliku od njih, glikoproteini sadrže kompleksnije i razgranatije ugljikohidratne strukture, noseći tako i složenije biološke uloge.

Dvije najveće skupine glikana vezanih na glikoproteine su O-glikani i N-glikani. O-glikani vezani su na polipeptidni lanac preko hidroksilne skupine bočnog ogranka serina ili treonina. Najzastupljenija skupina O-glikana su mucini, dugolančani polisaharidi na protein vezani preko N-acetilgalaktozamina (GalNAc). Oni su česti u mukoidnim sekretima zbog čega su i dobili naziv mucini. Njihove uloge uglavnom uključuju tvorbu fizičke i kemijske barijere na epitelnim stanicama, kao i posredovanje u međustaničnim interakcijama. Drugu još veću skupinu predstavljaju N-glikani, na proteine vezani preko asparaginskih ostataka pomoću N-glikozidne veze, najčešće s N-acetilglukozaminom (GlcNAc) (1). S obzirom da su znatno prisutniji na glikoproteinima kao i izravnije povezani s fiziološkim i patofiziološkim stanjima u organizmu, ujedno su i najviše proučavana skupina glikana (7).

1.1.1. N-glikozilacija

N-glikani su na protein vezani N-glikozidnom vezom između GlcNac na glikanu i asparaginskog ostatka glikoproteina (1). Kako bi N-glikan mogao biti vezan, asparagin mora biti dio peptidnog slijeda Asn-X-Ser/Thr gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu osim prolina. Takvi slijedovi u proteinu, potencijalna su glikozilacijska mjesta koja u približno dvije trećine slučajeva imaju vezan glikan. Kod ljudi, najzastupljeniji monosaharidi prisutni u N-glikanima su N-acetilglukozamin, manozna, galaktoza, N-acetilneuraminska kiselina i fukoza. N-glikani svih eukariota imaju zajedničku strukturnu jezgru koja uključuje dva N-acetilglukozamina i tri manoze i mogu se prema "antenama" koje se nastavljaju na spomenutu jezgru podijeliti u 3 osnovna tipa: oligomanozni, kompleksni i hibridni (Slika 1). Ostaci oligomanozних glikana sastoje se isključivo od manjeg broja manoznih jedinica vezanih na jezgru. Kompleksni glikani sadrže dvije ili više grana koje se sastoje od barem jednog N-acetilglukozamina i jedne galaktoze na koje dalje mogu biti vezane druge monosaharidne jedinice. Kod hibridnih glikana prisutna je kombinacija jedne složene grane i jednog ili više oligomanozних ogranaka.



Slika 1. Osnovni tipovi N-glikana

Sinteza N-glikana kod eukariota izvodi se u dvije faze. U prvoj, evolucijski vrlo očuvanoj fazi, na membrani endoplazmatskog retikula odvija se sinteza oligosaharida sastavljenog od dva N-acetilglukozamina, devet manozna i tri glukoze. Ovakav glikanski prekursor zatim se s dolikom fosfata na kojem je sintetiziran, prenosi na peptidni slijed Asn-X-Ser/Thr proteina koji se

glikozilira. Druga faza, specifična do razine glikozilacijskog mjesta danog proteina, odvija se u Golgijevom aparatu. Ovdje se pod djelovanjem velikog broja glikozidaza i glikoziltransferaza N-glikan dorađuje oduzimanjem i dodavanjem monosaharidnih jedinica do svoje konačne strukture oligomanoznog, hibridnog ili kompleksnog tipa. Enzimi odgovorni za ovu doradu različito su eksprimirani i pod utjecajem su fiziološkog statusa stanice što se odražava na strukture sintetiziranih glikana (1).

N-glikozilacija može doprinositi funkciji proteina na tri osnovna načina: (a) Kao sastavni dio proteina sudjelovati u njegovoj osnovnoj strukturi i funkciji, regulirajući smatanje, topivost i stabilnost. (b) Preciznom modulacijom strukture proteina prilagođavati njegovu funkciju specifičnim fiziološkim zahtjevima. (c) Stvarajući nova vezna mjesta za receptore koji specifično vežu glikane (7). Osim već spomenute mogućnosti uzrokovanja patofizioloških stanja kao posljedice poremećaja u glikozilaciji, s obzirom na višefaktorsku regulaciju N-glikozilacije, ona sama također može biti specifično izmijenjena kao rezultat patoloških promjena u organizmu (6, 8). Prema tome, N-glikozilacija ima potencijal služiti kao dijagnostički i prognostički biljeg različitih bolesti i patofizioloških stanja. Kao i s velikim brojem dijagnostičkih testova, krv odnosno serum i plazma predstavljaju informativan i dostupan biološki uzorak. Iz njega je moguće analizirati ukupnu glikozilaciju svih prisutnih proteina ili nešto specifičnijim metodama ciljano proučavati glikozilaciju individualnog proteina.

1.1.2. N-glikozilacija proteina plazme

Velik broj istraživanja već je proveden u potrazi za poveznicama N-glikozilacije plazmatskih proteina i različitih kroničnih poremećaja. Dosadašnje studije povezale su promjene u N-glikozilaciji s brojnim bolestima i stanjima poput šećerne bolesti tipa 2 (9, 10), upalne bolesti crijeva (11), različitih karcinoma (12), infekcije (13), pa čak i životnih navika poput pušenja (3). Proteini prisutni u plazmi različito su glikozilirani i sadrže međusobno različite glikanske strukture, zbog čega na različite načine doprinose N-glikozilacijskom profilu plazmatskih proteina (14). Prema tome, promjena u glikozilaciji pojedinog proteina može se odraziti na plazmatski profil na specifičan način. Prednost ovakve analize je sveobuhvatnost zbog koje će promjena u N-glikozilaciji nekog ili više plazmatskih proteina, ako je prisutna, vjerojatno biti i vidljiva u glikozilacijskom profilu. Osim toga, univerzalnost metode neovisno o ispitivanom stanju ili bolesti predstavlja još jednu prednost analize ukupne N-glikozilacije plazme. Ipak, promjene N-glikozilacije proteina plazme uglavnom nisu rezultat pomaka u glikozilaciji svih

proteina, već je N-glikozilacija nekih proteina znatnije promijenjena u odnosu na druge proteine plazme. Također, s obzirom da analiza N-glikozilacije svih proteina plazme u pravilu predstavlja određivanje prosječne zastupljenosti individualnih glikanskih struktura u plazmi, njome nije moguće razlikovati promjenu u glikozilaciji nekog proteina od promjene u njegovoj koncentraciji u plazmi. Ovaj pristup može pružiti nove i korisne informacije prilikom inicijalnih istraživanja N-glikozilacije u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima, ali u svrhu kreiranja novih dijagnostičkih i prognostičkih biljega za ciljane bolesti, identifikacija vodećeg glikoproteina i analiza njegove glikozilacije predstavlja put do osjetljivijih i specifičnijih biomarkera.

Analize glikozilacije ciljanog glikoproteina u kontekstu bolesti već su provedene za različite proteine od kojih je imunoglobulin G (IgG) daleko najistraženiji. Promjene u glikozilaciji IgG-a povezane su s velikim brojem poremećaja (15) od kojih su za neke predloženi i kao dijagnostički alati. Između ostalih glikoproteina koji su kroz studije glikozilacije plazmatskih proteina identificirani kao relevantni za određene bolesti, nalazi se i alfa-1-kiseli glikoprotein (AGP) kojeg karakteriziraju razgranate i kompleksne glikanske strukture.

1.2. Alfa-1-kiseli glikoprotein

AGP je visoko glikozilirani plazmatski protein akutne faze, veličine između 41 i 43 kDa, kod kojeg ugljikohidrati predstavljaju približno 45 % ukupne mase (16). AGP se primarno sintetizira u jetri i u humanoj plazmi zdravih pojedinaca prisutan je u prosječnoj koncentraciji od 0,77 mg/mL, s nešto većim koncentracijama kod muškaraca (17, 18). Jedan je od glavnih proteina akutne faze te u patološkim stanjima poput upale, infekcije i karcinoma njegove koncentracije u plazmi rastu između dva i šest puta (17). Iako je točna biološka uloga AGP-a i dalje nejasna, dokazano je njegovo sudjelovanje u regulaciji imuniteta kao i u upalnim i protuupalnim odgovorima (19–21). Osim toga, AGP može vezati i prenositi endogene ligande poput steroidnih hormona, histamina, serotonina i melatonina, ali i brojne bazične i neutralne lipofilne lijekove (22).

Humani AGP prisutan je u dva oblika, AGP1 i AGP2 koja su kodirana trima genima (*AGP-A*, *AGP-B* i *AGP-B'*) smještenih na devetom kromosomu (19). *AGP-A* kodira za AGP1, dok po strukturi identični geni *AGP-B* i *AGP-B'* kodiraju za AGP2 koji se po strukturi od AGP1 razlikuje u 22 aminokiseline. *AGP-A* je u jetri preko sto puta više eksprimiran u odnosu na *AGP-B* i *AGP-B'* zbog čega je i zastupljenost AGP1 u krvi veća (22, 23). AGP1 je polimorfan jer uključuje tri bliske genske varijante: F1, F2 i S koje se međusobno razlikuju u manje od pet

aminokiselina dok AGP2 uključuje varijantu A, četvrtu gensku varijantu AGP-a (24, 25). Većina ljudi posjeduje kombinaciju ovih varijanti od kojih su najčešće, F1+S+A (50 % slučajeva), zatim F1+A (35 % slučajeva) i S+A (15 % slučajeva). F1 i S varijante prisutne su u cijelom svijetu dok je F2 varijanta prisutna samo kod osoba porijeklom iz Europe, Sjeverne Afrike i Zapadne Azije (26–29). Kod većine osoba, koncentracija AGP1 proteina u krvi je dva do tri puta veća od koncentracije AGP2 (22, 26). Zbog inducibilnosti AGP1, odnos koncentracija u stanjima bolesti može biti i 8 : 1 (30).

1.2.1. N-glikozilacija alfa-1-kiseloga glikoproteina

Humani AGP sadrži pet N-glikozilacijskih mjesta u svojem polipeptidnom slijedu (Asn-33, -56, -72, -93, -103) na svako od kojih može biti vezan biantenarni, triantenarni ili tetraantenarni glikan različitog stupnja fukozilacije i sijalinizacije (24, 31). Sijalinska kiselina u obliku N-acetilneuraminske kiseline predstavlja 10-12 % ukupnog broja monosaharidnih jedinica što je i razlog niske vrijednosti izoelektrične točke AGP-a, između 2,8 i 3,8 (19). Osim toga, bitno je spomenuti kako je AGP jedan od malobrojnih serumskih glikoproteina koji nose tetraantenarne N-glikane (14).

Iako određivanje koncentracije AGP-a u krvi nije dijagnostički informativno za individualna patološka stanja, promjena u njegovoj glikozilaciji pokazuje obećavajući biomarkerski potencijal i već je potvrđena kod brojnih patofizioloških promjena. Opisane promjene u glikozilaciji nisu ograničene na akutna upalna stanja već se pojavljuju i u širokom rasponu ostalih fizioloških i patofizioloških stanja poput trudnoće, teških oblika reumatoidnog artritisa, ciroze jetre, hepatitisa, astme, šećerne bolesti tipa 1 kao i karcinoma (32–41). Općenito, smanjena razgranatost glikana prisutnih na AGP-u potvrđena je kod akutnih upalnih stanja, dok je u kroničnim upalnim stanjima karakterističan pomak u drugom smjeru, prema većem broju grana (39, 43–46). Osim toga, kod velikog broja upalnih bolesti prisutan je porast u stupnju antenarne fukozilacije AGP-a, tj. prisutnosti fukoze na granama njegovih N-glikana (40, 42, 47–52), kao i porasta sijalinizacije (50, 53, 54). Također, stupanj fukozilacije pokazao je prognostički potencijal kod pacijenata oboljelih od karcinoma (40, 55, 56). Prednost N-glikozilacije AGP-a kao dijagnostičkog markera je specifičnost promjena prema nekim upalnim bolestima, dok kod drugih bolesti te promjene nisu prisutne (34, 44).

Iako je N-glikozilacija AGP-a već proučavana u mnogim bolestima, istraživanja su uglavnom provedena na malom broju uzoraka koristeći metode temeljene na lektinima kojima je moguća tek približna kvantifikacija nekoliko glikoformi AGP-a. U posljednje vrijeme u analizi češće se

koristi spektrometrija masa, iako pretežito na komercijalnim uzorcima AGP-a (57–60) ili na uzorcima dobivenim afinitetnom kromatografijom čija cijena je visoka. Također, neke od analiza temelje se na proučavanju oslobođenih glikana gdje je informacija o glikozilacijskom mjestu izgubljena, a moguće je i onečišćenje glikanima poteklih s drugih proteina zaostalih u postupku izolacije AGP-a (34, 50, 52, 61). Spomenute do sad dostupne metode ograničavale su analizu brojem uzoraka koji je moguće obraditi u razumnom vremenu, cijenom obrade ili specifičnošću dobivenih rezultata. U sklopu ovog doktorskog rada razvijena je metoda za visokoprotočnu analizu N-glikozilacije AGP-a koju ne prati niti jedan od navedenih problema.

1.3. Šećerna bolest

Šećerna bolest obuhvaća skupinu metaboličkih poremećaja karakteriziranih hiperglikemijom kao posljedicom nedostatnog lučenja inzulina, izostanka njegovog djelovanja ili kombinacijom oba faktora (62). Simptomi izražene hiperglikemije su poliurija, polidipsija, gubitak na težini, zamagljenje vida, dok u akutnim slučajevima nekontrolirane hiperglikemije posljedice mogu biti ketoacidoza ili aketotični hiperosmolarni sindrom. Ovisno o tipu šećerne bolesti ovi simptomi često mogu biti blaži ili čak odsutni. Kronična hiperglikemija s druge strane povezana je s oštećenjima, disfunkcijom i zatajenjem organa, posebno očiju, bubrega, živaca, srca i krvnih žila (62). Globalna prevalencija šećerne bolesti među starijima od 18 godina porasla je s 4,7 % u 1980. na 8,5 % u 2014. čime je ukupan broj oboljelih prešao 420 milijuna (63).

Različite oblike šećerne bolesti moguće je podijeliti u četiri skupine redom po učestalosti: šećerna bolesti tipa 2, šećerna bolest tipa 1, šećerna bolest u trudnoći i ostali specifični tipovi šećerne bolesti (62). Šećerna bolesti tipa 2 obuhvaća 90-95 % svih slučajeva šećerne bolesti i karakterizirana je prisutnošću inzulinske rezistencije i posljedičnog relativnog nedostatka inzulina uz čestu pretilost oboljelih pacijenata. Šećerna bolest tipa 1, prisutna kod 5-10 % slučajeva najčešće je uzrokovana autoimunom reakcijom na β -stanice gušterače ili sam inzulini. Antitijela usmjerena na β -stanice gušterače, inzulini, glutamat dekarboksilazu (GAD) ili tirozini fosfataze IA-2 i IA-2 β moguće je detektirati kod 85-90 % pacijenata šećerne bolesti tipa 1. Za razliku od šećerne bolesti tipa 2, ovaj oblik nastupa relativno naglo uz intenzivnije simptome. Šećerna bolest u trudnoći prisutna kod približno 7 % svih trudnoća, definirana je pojavom intolerancije na glukozu za vrijeme trajanja trudnoće. Kod većine pacijentica ona se povlači završetkom trudnoće, iako predstavlja povećani rizik za razvoj nekog drugog oblika šećerne bolesti kasnije u životu. Ostali specifični tipovi šećerne bolesti potaknuti su različitim uzrocima, od genskih i hormonalnih poremećaja, do podtipova uzrokovanih primjenom lijekova ili čak

virusnim infekcijama. Najčešći podtip šećerne bolesti u ovoj skupini su monogeniski uzrokovane šećerne bolesti kao posljedica poremećaja u funkciji β -stanica gušterače. Nekoliko je oblika ovog podtipa, a obično ih se skupno naziva šećernom bolešću zrele dobi kod mladih osoba, (engl. *Maturity-onset diabetes of the young*, MODY) (62).

1.3.1. Šećerna bolest zrele dobi kod mladih osoba (MODY)

Monogenska šećerna bolest, za razliku od ostalih češćih oblika šećerne bolesti, uzrokovana je poremećajem jednog gena koji obično dovodi do smanjenja funkcije β -stanice gušterače, rezultirajući umjerenom do jakom hiperglikemijom (64). Među monogeniski uzrokovanim šećernim bolestima, HNF1A-MODY najčešći je oblik. Uzrokovan je mutacijom u *HNF1A*, genu odgovornom za HNF1A transkripcijski faktor prisutan u mnogim tkivima čiji nedostatak dovodi do progresivnog gubitka funkcije β -stanice gušterače i posljedične hiperglikemije (64). Karakterističnu kliničku sliku opisuje pojava u mladoj dobi, autosomno nasljeđivanje, odsutnost autoimunosne podloge i zadržana sposobnost lučenja inzulina (65). S obzirom na relativno malu učestalost kao i kliničke sličnosti s češćim oblicima šećerne bolesti, HNF1A-MODY često je krivo dijagnosticiran. Rana dob nastupa i povremeno dobar odgovor na terapiju inzulinom u niskim dozama otežava razlikovanje od šećerne bolesti tipa 1 (66). S druge strane, visoka nasljednost i odsutnost autoimunosne podloge predstavlja sličnost sa šećernom bolešću tipa 2. Također, sve češća pojava šećerne bolesti tipa 2 u mladoj populaciji kao i autoimunog oblika kod starijih ljudi dodatno otežava diferencijalnu dijagnostiku (67). Procjenjuje se da ova preklapanja u kliničkim obilježjima dovode do krive inicijalne dijagnoze MODY-a u 80 % slučajeva, odgađajući tako ispravnu dijagnozu i liječenje (68).

Za razliku od drugih najčešćih tipova šećerne bolesti s kojima se HNF1A-MODY zamjenjuje, moguće ga je uspješno liječiti niskim dozama sulfonilureja. One omogućuju bolju glikemijsku kontrolu i posljedično kvalitetu života u odnosu na druge farmakološke pristupe poput inzulina (69). Također, autosomno dominantno nasljeđivanje uz visoku gensku penetrantnost znače visoku vjerojatnost da su ostali članovi obitelji zahvaćeni ili imaju povišen rizik za HNF1A-MODY (70). Prema tome, pravodobno postavljanje ispravne dijagnoze ključno je za kako za same pacijente, tako i za članove njihovih obitelji.

Potvrдна dijagnoza za HNF1A-MODY trenutno uključuje izravno sekvenciranje *HNF1A* gena, što u pravilu pruža visoku osjetljivost, iako u nekim slučajevima interpretacija rezultata je otežana ili čak nemoguća. Ako pronađena genska varijanta nije prethodno opisana i karakterizirana, za potvrdu ili odbacivanje dijagnoze potrebna je daljnja procjena fenotipskog

učinka. Ovi postupci ponekad završavaju nejasnim rezultatima i posljedičnom nemogućnošću potvrde ili odbacivanja HNF1A-MODY dijagnoze (71).

1.3.1.1. Dijagnostički potencijal N-glikozilacije kod HNF1A-MODY

Kao i kod velikog broja drugih bolesti, HNF1A-MODY moguće je povezati s promjenama u N-glikozilaciji. Cjelogenomska asocijacijska studija (engl. *Genome-Wide Association Study*, GWAS) provedena na N-glikomu svih proteina plazme, identificirala je ključnu ulogu *HNF1A* gena u regulaciji fukozilacije, dijela N-glikozilacije koji se odnosi na uključivanje fukoze u glikansku strukturu (72). Potaknuta tom spoznajom, provedena su istraživanja usmjerena na analizu N-glikozilacije kod HNF1A-MODY pacijenata. Istraživanja su otkrila da je razina fukozilacije plazmatskih proteina značajno snižena kod HNF1A-MODY pacijenata i da ih može razlikovati od zdravih kontrola i drugih tipova šećerne bolesti (73, 74). Time je analiza N-glikozilacije proteina plazme predložena kao temelj budućih biomarkera i prognostičkih biljega za HNF1A-MODY.

U obje studije koje su potvrdile promjenu u N-glikozilaciji proteina plazme kod HNF1A-MODY pacijenata, najveće razlike uočene su na kompleksnim triantenarnim glikanskim strukturama, zbog čega su one imale i najveći dijagnostički potencijal. Na temelju prethodnih spoznaja o tome koje strukture vidljive u plazmatskom glikanskom profilu dominantno potječu s kojih proteina plazme, ustanovljeno je da u HNF1A-MODY-u najviše promijenjene triantenarne strukture dominantno potječu s alfa-1-kiseloga glikoproteina (14). Ovaj skup spoznaja upućuje na zaključak da je kod HNF1A-MODY pacijenata N-glikozilacija AGP-a posebno izraženo promijenjena. Iako bi biljezi temeljeni na analizi N-glikozilacije svih proteina plazme prema spomenutim istraživanjima pružali značajan doprinos u dijagnostičkom postupku, ciljana analiza N-glikozilacije AGP-a kao pokretača promjena vidljivih u plazmatskom glikanskom profilu, trebala bi omogućiti razvoj još specifičnijih i informativnijih dijagnostičkih alata. Prednosti ciljane analize izdvojenog glikoproteina u odnosu na kumulativnu analizu glikozilacije svih proteina plazme, već je objašnjena u odjeljku 1.1.2.

1.3.2. Hiperglikemija u kritičnoj bolesti

Još jedan oblik poremećaja metabolizma glukoze povezan s promjenama u N-glikozilaciji je i hiperglikemija u kritičnoj bolesti. Ovaj specifični oblik akutne hiperglikemije javlja se relativno često za vrijeme kritičnih stanja, u 40 do 90 % slučajeva, ovisno o tome kako je definiran (75).

Među uzrocima ovog poremećaja, pretpostavlja se da najveću ulogu ima oslobađanje hormona stresa (kortikosteroida i katekolamina), proupalnih medijatora kao i primjene egzogenih kortikosteroida, vazopresora i otopina koje sadrže dekstrozu (75). Iako je pojava akutne hiperglikemije za vrijeme kritične bolesti povezana s lošijim ishodom liječenja, ona također predstavlja i povećan rizik za razvoj šećerne bolesti tipa 2 kasnije u životu. Pacijenti s prisutnom hiperglikemijom u kritičnoj bolesti imaju 5 puta povećan rizik od šećerne bolesti tipa 2 u petogodišnjem periodu nakon oporavka od akutnog stanja (76, 77).

Istraživanje N-glikozilacije pacijenata nakon oporavka od hiperglikemije u kritičnoj bolesti, kao i same kritične bolesti, pokazalo je povećanu prisutnost razgranatih struktura na proteinima plazme. Zbog povezanosti akutne hiperglikemije sa rizikom za razvoj šećerne bolesti tipa 2, povećana prisutnost razgranatih glikanskih struktura prema tome također predstavlja faktor rizika za razvoj šećerne bolesti tipa 2. Slično kao i kod HNF1A-MODY-a, najvjerojatniji protein nositelj promjena uočenih u plazmatskom profilu N-glikana je AGP, s obzirom da se na njemu nalazi većina razgranatih glikanskih struktura prisutnih u plazmi (14). Okretanjem prema ciljanoj analizi N-glikozilacije AGP-a kod ovih pacijenata u odnosu na analizu ukupne glikozilacije proteina plazme, moguće je dobiti bolji uvid u poveznicu N-glikozilacije i povećanog rizika za razvoj šećerne bolesti tipa 2, kao i približiti se razvoju specifičnijeg biljega za praćenje rizika.

1.4. Metode analize N-glikozilacije

Velika raznolikost glikana znatno povećava strukturalnu kompleksnost proteina na kojima se nalaze, što ujedno zahtijeva i kompleksne analitičke pristupe u njihovu istraživanju. Trenutno dostupne analitičke metode ugrubo se mogu podijeliti na tri razine (78). Analiza oslobođenih glikana najrašireniji je pristup koji u pravilu podrazumijeva enzimsko odcjepljivanje glikana od proteinskog dijela glikopeptida i njihovu analizu, obično nakon kemijskog obilježavanja (79). Drugi čest pristup analize izvodi se na razini glikopeptida, dobivenih enzimskom razgradnjom glikoproteina koji se istražuju. Konačno, moguća je i analiza cjelovitih glikoproteina koja pruža informaciju o interakciji glikanskog i proteinskog dijela kao i mogućnost proučavanja distribucije glikanske prisutnosti na izoformama proteina (80). Prepoznavanje važnosti N-glikozilacije potaknulo je razvoj visokoprotocinskih analitičkih metoda koje su u mogućnosti uz prihvatljive troškove analizirati velik broj uzoraka u relativno kratkom vremenu, što je i uvjet za velika klinička istraživanja potrebna u razvoju dijagnostičkih i prognostičkih biljega.

1.4.1. Analiza oslobođenih N-glikana

Analiziranje glikana oslobođenih s proteina predstavlja ponovljiv i robustan pristup. Prednost ovakve analize je njezina neovisnost o proučavanim glikoproteinima i njihovu izvoru zbog kemijskog ili enzimskog odcjepljivanja glikana prije analize (79). Najčešće korišten pristup otpuštanju N-glikana s glikoproteina je pomoću endoglikozidaze - PNGaza F (peptidil-N4-(N-acetil- β -glukozaminil) asparagin amidaza F) zbog njezine neselektivnosti, efikasnosti i jednostavnosti primjene (81). Ovako oslobođeni N-glikani najčešće se analiziraju tekućinskom kromatografijom temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC) povezanom s fluorescentnom detekcijom (FLD). Osim ove metode, često je u primjeni i kapilarna gel elektroforeza (CGE) uz lasersku detekciju (LIF) kao i spektrometrija masa uz matricom potpomognutu lasersku desorpciju/ionizaciju (MALDI).

HILIC-FLD metoda izvodi se pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) kao i ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) gdje se N-glikani razdvajaju na temelju hidrofilnosti odnosno njihove veličine, strukture i naboja. Kako bi fluorescentna detekcija bila moguća, reducirajući kraj slobodnih N-glikana je prethodno potrebno fluorescentno obilježiti (82).

Identifikacija N-glikana najčešće se temelji na retencijskom vremenu u kombinaciji s bazama podataka, vanjskim standardima i slično, dok je kvantifikacija moguća na temelju intenziteta signala s fluorescentnog detektora. Osim toga, HILIC-UHPLC sustav moguće je putem elektrosprej ionizatora (ESI) povezati na spektrometar masa s ciljem karakterizacije glikanskih struktura u nepoznatim uzorcima (82).

1.4.2. Analiza N-glikopeptida

Za razliku od oslobođenih glikana, analiza N-glikopeptida podrazumijeva zadržavanje N-glikozidne veze kao i polipeptidnog segmenta proteina na kojem se glikan nalazio, čime se zadržava informacija o glikozilacijskom mjestu proučavanog glikoproteina. Prvi korak u analizi glikopeptida je izdvajanje i pročišćavanje glikoproteina od interesa postupcima selektivnog taloženja, imunoprecipitacije, elektroforeze ili uz pomoć lektinske kromatografije (83). Sljedeći korak podrazumijeva proteolitičku razgradnju glikoproteina primjenom proteaza, od kojih je tripsin zbog svoje specifičnosti, efikasnosti i dostupnosti najčešće korištena proteaza u glikoproteomici (84, 85). Nakon razgradnje, nastale glikopeptide potrebno je pročitati od ostalih peptida prisutnih u smjesi za što se često koriste fizikalno-kemijske metode temeljene na hidrofobnosti, veličini, naboju ili kemijskim osobinama prisutnih monosaharida. Također, korištene su i metode temeljene na vezanju epitopa glikopeptida, poput lektina i antitijela (83).

Konačno, pročišćeni glikopeptidi u pravilu se analiziraju tekućinskom kromatografijom obrnutih faza (RP-LC), povezanoj sa spektrometrijom masa, nakon čega je računalna obrada podataka uobičajen korak (83).

Za razliku od oslobođenih glikana, u analizi glikopeptida potrebno je prilagoditi metodu svakom novom glikoproteinu. Ipak, ovakva analiza može dati više informacija o pojedinostima glikozilacije proučavanog proteina. Zadržavanjem peptidnog dijela moguće je analizirati glikane koji potječu isključivo s proteina od interesa, što je znatno zahtjevnije u proučavanju oslobođenih glikana. Osim toga, informacija je dostupna na razini glikozilacijskog mjesta, što može biti važno s obzirom na potencijalne razlike u prisutnim glikanima između glikozilacijskih mjesta (1).

1.5. Obrazloženje istraživanja

N-glikozilacija već je na primjerima brojnih bolesti i patofizioloških stanja pokazala dijagnostički, prognostički i prediktivni potencijal. Među njima su i različiti oblici šećerne bolesti za koje su pokazane karakteristične promjene u N-glikozilaciji proteina plazme ili imunoglobulina G. Istraživanja ukupne N-glikozilacije svih proteina plazme kod pacijenata s povećanim rizikom za razvoj šećerne bolesti tipa 2, kao i kod pacijenata oboljelih od HNF1A-MODY-a, identificirala su promjene u udjelima visoko razgranatih N-glikana prisutnih u plazmi. S obzirom da se za spomenute glikane vjeruje kako dominantno potječu s AGP-a, pretpostavljeno je da su upravo promjene u njegovoj N-glikozilaciji u pozadini promjena utvrđenih u plazmi. S obzirom da je plazmatski profil N-glikana rezultat doprinosa većeg broja proteina za istu glikansku strukturu, ali i odnosa koncentracija proteina u plazmi, stvarni razlog opaženih promjena ponekad je nemoguće razlučiti. Prema tome, analiza individualnih glikoproteina, put je prema daljnjem rasvjetljavanju pozadina ispitivanih stanja, ali i otkrivanja i uspostavljanja dijagnostičkih alata.

Oslanjajući se na dosadašnja istraživanja, u sklopu ovog doktorskog rada razvijena je metoda za visokoprotočnu analizu na razini glikozilacijskog mjesta N-glikozilacije AGP-a kojom su ispitani uzorci pacijenata s povećanim rizikom za razvoj šećerne bolesti tipa 2, kao i pacijenti oboljeli od HNF1A-MODY-a.

S obzirom na konstantno povećanje broja osoba oboljelih od šećerne bolesti tipa 2, kao i njezina sve ranijeg nastupa, identifikacija povećanog rizika za razvoj bio bi vrijedan doprinos u kontroli i suzbijanju ove bolesti. Analiza N-glikozilacije AGP-a predstavlja korak prema uspostavi testa koji bi omogućio takvu identifikaciju rizika.

Zbog kliničkih sličnosti s drugim oblicima šećerne bolesti, pogrešne dijagnoze HNF1A-MODY-a vrlo su česte. Definitivna dijagnoza postavlja se sekvenciranjem *HNF1A* gena, no jednoznačna procjena kliničkog značaja identificiranih genskih varijanti nije uvijek moguća, što ponekad zaustavlja put do prihvatanja ili odbacivanja HNF1A-MODY dijagnoze. Uspostavom modela koji bi na temelju N-glikozilacije AGP-a mogao izdvojiti HNF1A-MODY pacijente i uz to pomoći u procjeni fenotipskog efekta mutacije u slučajevima kad je ona otežana, doprinio bi dijagnostičkom procesu i time kvaliteti života ovih pacijenata.

Konačno, detaljniji uvid u N-glikozilacijska zbivanja na AGP u ovim stanjima moglo bi pomoći u razjašnjavanju njihove etiologije, bioloških uloga AGP-a i samog procesa N-glikozilacije općenito.

2. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI

2.1. Ispitanici

U sklopu ovog doktorskog rada korištene su četiri skupine ispitanika. Nakon uspješnog razvoja i validacije metode za visokoprotočnu analizu N-glikozilacije AGP-a, a prije njezine primjene, bilo je nužno utvrditi temporalnu stabilnost N-glikoma AGP-a u zdravih pojedinaca. Ovaj preduvjet za biomarkersku primjenu potvrđen je na prvoj skupini ispitanika.

Druga skupina ispitanika uključivala je pacijente s pojavom hiperglikemije u kritičnoj bolesti kao skupine ispitanika povećanog rizika za razvoj šećerne bolesti tipa 2 i kontrolnu skupinu pacijenata bez pojave hiperglikemije. Između ovih ispitanika provedena je usporedba N-glikozilacije AGP-a.

Posljednje dvije skupine ispitanika odnose se na istraživanje HNF1A-MODY-a. Treća skupina ispitanika predstavlja uzorak pacijenata oboljelih od različitih tipova šećerne bolesti između kojih je N-glikozilacija AGP-a mogla biti uspoređena. Nakon potvrde razlika i identifikacije značajno promijenjenih glikopeptida kod HNF1A-MODY pacijenata u odnosu na ostale tipove šećerne bolesti, dijagnostički potencijal N-glikozilacije AGP-a ispitan je u četvrtoj skupini.

Svi ispitanici dali su pisani pristanak na sudjelovanje u studijama koje su provedene u skladu s načelima Helsinške deklaracije i odobrene od strane nadležnih etičkih povjerenstava.

2.1.1. Utvrđivanje temporalne stabilnosti N-glikozilacije AGP-a

U ovoj skupini sudjelovalo je 14 muških ispitanika, studenata kineziologije (dob $19 \pm 0,7$ godina). Prije uključanja u studiju, svim ispitanicima potvrđena je odsutnost kardiovaskularnih oboljenja, muskulturnih ozljeda i bilo kojeg oblika medicinskog liječenja. Također, ispitanici su upućeni na izbjegavanje konzumacije alkohola, duhana i suplementacije antioksidansima za vrijeme trajanja studije. Uzorci krvi uzeti su u tri vremenske točke, od kojih su druga i treća bile udaljene 6 i 10 tjedana od prve točke uzorkovanja. Krv antekubitalnom venepunkcijom skupljena u epruvete s EDTA antikoagulansom. Odmah nakon uzorkovanja, centrifugiranjem (10 minuta na 1370 g) plazma je odvojena i zatim podijeljena u seriju 1 mL alikvota. Uzorci su do analize pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.2. Hiperglikemija u kritičnoj bolesti

Pacijenti primljeni u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL) Kliničkog bolničkog centra Zagreb uključivani su u ovu skupinu u periodu od 6 mjeseci (od veljače do srpnja 2013. godine). Uključni kriteriji bili su dob starija od 18 godina, negativna povijest šećerne bolesti i uspješan završetak liječenja i otpuštanje iz bolnice. Osobe s dijagnosticiranom šećernom bolešću ili

narušenom tolerancijom na glukozu, osobe s dokumentiranim gestacijskim dijabetesom, trudnice kao i osobe na terapiji glukokortikoidima za vrijeme ili tri mjeseca prije boravka u JIL, isključene su iz studije. Sudionici koji su pristali na ispitivanje, pozvani su na dodatno testiranje 6 do 8 tjedana nakon otpuštanja iz bolnice, s ciljem potvrde uključnih i isključnih kriterija. Prisutnost zaostalog upalnog procesa ispitana je hematološkim pretragama i određivanjem razine C-reaktivnog proteina. U slučaju povišenih biljega upale, pacijenti su ponovno testirani dva tjedna kasnije. Svi sudionici izveli su test oralnog opterećenja glukozom, te im je izmjerena razina glikiranog hemoglobina A1c (HbA1c) s ciljem pronalaska potencijalno prisutne šećerne bolesti. Primjenom smjernica Američkog udruženja za dijabetes, pacijenti sa šećernom bolešću ili narušenom tolerancijom na glukozu isključeni su iz studije. Visina, težina i indeks tjelesne mase zabilježeni su zajedno s obiteljskom anamnezom o šećernoj bolesti. Svim ispitanicima uzorak krvi uzet je natašte u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Plazma je odmah odvojena centrifugiranjem (10 minuta na 1370 g) i zamrznuta na -20 °C do analize. U ovu skupinu uključeno je ukupno 108 ispitanika, a opisna statistika prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Opisna statistika skupine ispitanika s i bez hiperglikemije za vrijeme kritične bolesti

	Hiperglikemija	Kontrolna skupina	p-vrijednost*
Broj pacijenata (N)	59	49	
Dob (god)	58 (25 - 79)	54 (18 - 75)	0,388
Ženski spol (N,%)	18 (30,5 %)	14 (28,6 %)	0,826
BMI (kg/m ²)	24,2±4,1	23,1±3,9	0,734
Obiteljska povijest š.b. (N,%)	19 (32,2 %)	8 (16,3 %)	0,039

*p-vrijednosti (usporedba hiperglikemijske i kontrolne skupine) izračunate su pomoću Mann-Whitney U testa (granica značajnosti $\alpha = 0,05$). Kategorijske varijable uspoređene su χ^2 testom

2.1.3. Pacijenti oboljeli od različitih tipova šećerne bolesti

U ovoj skupini ispitanika sudjelovalo je 466 pacijenata grupiranih prema tipu šećerne bolesti. Uključeno je 109 HNF1A-MODY pacijenata, 17 HNF4A-MODY pacijenata, 69 pacijenata sa šećernom bolešću tipa 1 i 271 pacijenata oboljelih od šećerne bolesti tipa 2. Ispitanici su regrutirani u Norveškoj (Norveški registar MODY pacijenata), Slovačkoj (ambulantne klinike za šećernu bolest diljem Slovačke) i Ujedinjenom Kraljevstvu (studija „Dijabetes mladih u Oxfordu“). Kod HNF1A- i HNF4A-MODY pacijenata, mutacije su potvrđene sekvenciranjem u certificiranim dijagnostičkim centrima. Šećerna bolesti tipa 1 dijagnosticirana je temeljem koncentracije C-peptida < 0,1 nmol/L ili prisutnim antitijelima na glutamat dekarboksilazu uz kontinuiranu terapiju inzulinom od trenutka dijagnoze. Pacijenti oboljeli od šećerne bolesti tipa

2 dijagnosticirani su prije dobi od 45 godina na temelju odsutnosti antitijela na glutamat dekarboksilazu, prisutnih C-peptida i odsutne potrebe za trajnom terapijom inzulinom 3 mjeseca od dijagnoze.

2.1.4. Šećerna bolest u mladoj dobi s odsustvom autoimunosti

Ukupno 98 ispitanika regrutirano je iz Ujedinjenog Kraljevstva (48 ispitanika) i Hrvatske (50 ispitanika). Pacijenti iz Ujedinjenog Kraljevstva regrutirani su kroz studiju „Dijabetes mladih u Oxfordu“, bez preklapanja s pacijentima u prethodnoj skupini ispitanika. Pacijenti iz Hrvatske prikupljeni su kroz Nacionalni registar osoba sa šećernom bolešću (CroDiab). Uključni kriteriji bili su dob starija od 18 godina s dijagnozom prije dobi od 45 godina, očuvano lučenje inzulina (C-peptid $\geq 0,2$ nmol/L) i odsutna antitijela na glutamat dekarboksilazu. Svim ispitanicima u ovoj skupini sekvenciran je *HNF1A* gen, a utvrđenim genskim varijantama procijenjen funkcionalni značaj. Na temelju prisutnosti i procijenjenog fenotipskog efekta varijanti pacijenti su podijeljeni u tri skupine: štetne varijante, benigne varijante i bez rijetkih varijanti. Štetnost utvrđene varijante ujedno je predstavljala i HNF1A-MODY dijagnozu.

2.2. Metode

2.2.1. Razvoj metode za visokoprotlačnu analizu N-glikozilacije AGP-a

Za razvoj i optimizaciju metode korištena su dva seta standarada. Prvi je bio standard krvne plazme sačinjen od smjese uzoraka plazme iz skupine ispitanika korištene za analizu temporalne stabilnosti N-glikozilacije AGP-a i skupine ispitanika korištenih za istraživanje hiperglikemije u kritičnoj bolesti. Drugi korišten standard je komercijalni standard AGP-a (≥ 99 %) izoliran iz humane plazme. Ponovljivost metode procijenjena je izračunom koeficijenta varijacije (CV, omjer standardne devijacije i aritmetičke sredine seta) tehničkih replikata standarda plazme. Ponovljivost unutar serije mjerena je pomoću 10 replikata nasumično razmještenih po mikrotitarskoj pločici od 96 jažica, dok je ponovljivost između serija određena koristeći 10 replikata nasumično raspoređenih između dvije mikrotitarske pločice od 96 jažica. Isti replikati korišteni su za procjenu ponovljivosti između serija nakon korekcije na razlike u serijama (detalji korekcije objašnjeni su u odjeljku 2.2.4.2.). U procjeni učinka protokola za obogaćivanje AGP-a na ponovljivost rezultata korištena su dva seta tetraplikata komercijalnog standarda AGP-a. Na prvi set tetraplikata primijenjen je protokol za obogaćivanje, dok je drugi set ostavljen netretiran. Ostali koraci analize oba seta uzoraka bili su jednaki, nakon čega su

CV vrijednosti uspoređene. Za testiranje osjetljivosti metode, obrađeni su i analizirani uzorci standarda plazme u seriji početnih volumena od 50, 20, 10, 5, 2,5 i 1 μL , izvedeni u triplikatima. Sve glikoforme identificirane i anotirane iz standarda plazme uključene su u kvantifikaciju i analizu podataka u narednim eksperimentima.

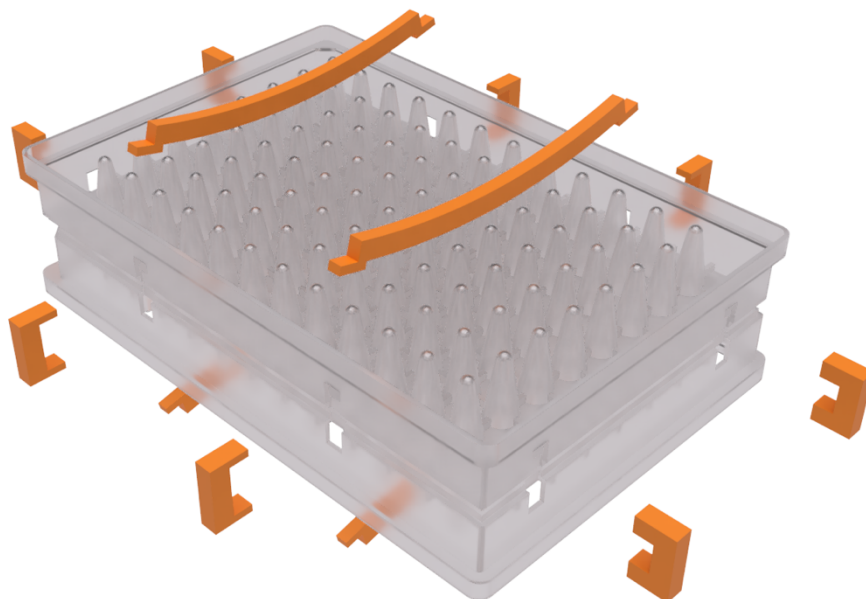
2.2.1.1. Potvrda detekcije glikopeptidnih struktura AGP-a

Glikopeptidi AGP-a anotirani su koristeći MS i MS/MS spektre snimljene u modu akvizicije ovisne o podacima. Prekursorski ioni selektirani su automatski gdje su 3 najintenzivnija signala u MS spektru odabrana za daljnju fragmentaciju. Uz to, napravljena je lista uključenja za glikopeptide AGP-a koji nisu automatski odabrani za fragmentaciju. Prilikom analize snimljenih spektara, nekoliko kromatograma izoliranih iona (engl. *Extracted ion chromatogram*, EIC) kreirano je s ciljem određivanja vremena eluiranja glikopeptida: 366^{1+} za LacNAc; 657^{1+} za LacNAc sa sijalinskom kiselinom; 292^{1+} i 274^{1+} za sijalinsku kiselinu; 204^{1+} za GlcNAc; Y1 ion svakog glikopeptida (peptid samo s vezanim nutarnjim GlcNAc-om). Za vremenske raspone eluiranja svakog identificiranog glikopeptida, odabrane su m/z vrijednosti najzastupljenije glikoforme i uspoređene s vrijednostima interne baze podataka kreirane pretraživanjem literature o pronađenim glikanskim strukturama AGP-a (57, 58). Za sva potvrđena preklapanja, MS/MS spektri su ručno anotirani koristeći Compass DataAnalysis, GlycoWorkbench (86) i GlycoMod (87) računalne programe. Tijekom anotacije, dostupni literaturni podaci o glikanskim strukturama AGP-a, kao i potencijalnim izazovima njihove analize uzeti su obzir (88). Aminokiselinski slijed i glikanski sastav najzastupljenijih glikopeptida AGP-A provjeren je temeljem MS/MS spektara. Potvrda struktura dobivena je korištenjem specijaliziranog računalnog programa za pretraživanje i identifikaciju glikopeptida – Byonic. Unutar Byonic pretraživača, baza podataka uključivala je krnju sekvencu AGP1 (UniProtKB unos: P02763; verzija 2020_04) kao i sekvencu AGP2 (UniProtKB unos: P19652; verzija 2020_04) iz UniProt baze podataka. Parametri razgradnje odgovarali su tripsinu, bez dozvoljene nespecifičnosti i preskočenih razgradnji. Vrsta fragmentacije označena je kao fragmentacija potaknuta sudarima (engl. *collision-induced dissociation*, CID) niske energije, dok je tolerancija mase prekursora i fragmenta postavljena na 20 i 30 ppm redom. Proteinske modifikacije, osim glikozilacije, uključivale su karbamidometilsku modifikaciju cisteinskih ostataka. Prilagođena glikanska baza podataka uključivala je kompozicije glikanskih struktura prethodno identificiranih na temelju MS spektara. Analiza je izvedena na nekoliko MS/MS datoteka generiranih iz standardnog uzorka plazme. Pomoću Byonic računalnog programa

potvrđeno je 87 od 96 struktura pronađenih analizom MS spektara bez fragmentacije. Preostalih 9 glikopeptidnih struktura potvrđeno je samo na temelju MS spektara uslijed niskog intenziteta signala zbog kojih fragmentacijske spektre nije bilo moguće generirati. Kriteriji korišteni za potvrdu ovih glikopeptida bili su sljedeći: Eluiranje u istom rasponu vremena zadržavanja kao prethodno potvrđeni glikopeptidi AGP-a, slaganje u m/z vrijednostima iz interne baze podataka, prisutnost više od jednog stanja naboja i konačno udaljenost od MS/MS potvrđenih glikopeptida u m/z vrijednosti koja odgovara razlici mase jedne ili više monosaharidnih jedinica.

2.2.1.2. Spojni sistem za mikrotitarske pločice

U prvom dijelu obrade uzoraka u kojem se izvodi obogaćivanje AGP-a, potrebno je provesti dva koraka precipitacije i odvajanja supernatanta od taloga. Kvantitativno odvajanje supernatanta u mikrotitarskoj jažici iz ukupnog volumenu od približno tek 100 μ L koristeći standardnu višekanalnu pipetu dugotrajan je i zahtjevan proces koji bi znatno narušio visokoprotočnost metode. Ovaj problem riješen je korištenjem dodatne mikrotitarske pločice, naopako pozicionirane na originalnu pločicu s precipitiranim uzorcima. Dvije pločice fiksirane su i međusobno pritisnute pomoću 8 kopči i 4 opruge za ovu potrebu dizajniranih i izrađenih metodom trodimenzionalnog ispisa (Slika 2). Nakon toga, pločice je bilo moguće okrenuti i kratko centrifugirati na niskoj brzini (15 g) kako bi supernatant prešao u prazne jažice u tom trenutku pozicionirane na donjoj strani. Prethodno centrifugiranje na relativno visokoj brzini (2250 g), dovoljno stabilizira talog da tijekom procedure zaostane u originalnim jažicama. Oba koraka odvajanja potrebna u metodi moguće je izvesti na ovaj način, čime se osigurava brža, jednostavnija i pouzdanija, visokoprotočna priprema uzoraka.



Slika 2. Eksplozirani prikaz spojnog sistema s dvjema mikrotitaskim pločicama. Spojne kopče pozicionirane su po obodu, a spojne opruge iznad i ispod pločica.

2.2.2. Opis metode

2.2.2.1. Obogaćivanje AGP-a iz uzoraka plazme

Iz uzoraka plazme AGP je obogaćen taloženjem seromukoidne frakcije (89). Početni volumen od 20 μL plazme pomiješan je s 80 μL 0,75 M perklorne kiseline u mikrotitarskoj pločici od 96 jažica. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 2250 g supernatant je prenesen u novu pločicu pomoću prethodno razvijenog spojnog sustava za mikrotitarske pločice, a talog je odbačen. Supernatantu je dodano 9 μL (1/10 volumena supernatanta) 2 % fosfovolframove kiseline u 2 M HCl, nakon čega je pločica ponovno centrifugirana 10 minuta na 2250 g. Nakon odvajanja taloga pomoću spojnog sustava za mikrotitarske pločice, supernatant je odbačen. Talog koji predstavlja seromukoidnu frakciju plazme u kojoj je AGP obogaćen, otopljen je dodavanjem 30 μL 0,1 M NaOH.

2.2.2.2. Redukcija, alkilacija i razgradnja tripsinom

Otopljenoj seromukoidnoj frakciji dodano je 2,5 μL RapiGest SF surfaktanta u 30 mM amonijevom bikarbonatu i smjesa inkubirana 5 minuta na 60 °C. Uzorcima je zatim dodano 5 μL 60 mM ditioneitolata nakon čega su inkubirani 30 minuta na 60 °C. U uzorke ohlađene na sobnu temperaturu dodano je 5 μL 160 mM jodoacetamida i uzorci su inkubirani na tresilici u mraku 30 minuta. Nakon inkubacije dodan je 1 μL 200 mM ditioneitolata kako bi izreagirao s viškom jodoacetamida i zatim pH podešen za razgradnju tripsinom dodavanjem 2 μL 1 M amonijevog bikarbonata. Nakon dodavanja 2 μL 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ TPCK-tretiranog tripsina u 50 mM octenoj kiselini svakom uzorku, inkubirani su preko noći na 37 °C. Po završetku razgradnje tripsinom 3 μL 1 M HCL dodano je uzorcima te su inkubirani 45 minuta na 37 °C kako bi se RapiGest SF razgradio.

2.2.2.3. Obogaćivanje glikopeptida pomoću HILIC-SPE

Glikopeptidi dobiveni razgradnjom tripsinom su pročišćeni pomoću ekstrakcije na krutoj fazi po principu tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography – solid phase extraction*, HILIC-SPE) koristeći polipropilenske filter pločice s 96 jažica. U svaku jažicu dodano je 5 mg Chromabond HILIC zrnaca u 0,1 % trifluoroctenoj kiselini (TFA) (suspenzija 50 mg/mL). Na vakuumskom postolju prvo je uklonjena 0,1 % TFA u kojoj su HILIC zrnca nanosena, zatim su jažice oprane s 2 x 250 μL 0,1 % TFA a potom i ekvilibrirane uz 2 x 250 μL 90 % acetonitrila s 0,01 % TFA. Uzorci su razrijeđeni s 450 μL 0,1 % TFA u acetonitrilu i preneseni u jažice koje su zatim oprane s 2 x 250 μL 90 % acetonitrila s 0,01 % TFA. Pročišćeni i obogaćeni glikopeptidi zatim su isprani u mikrotitarsku pločicu uz 200 μL 0,1 % TFA. Eluati su odmah osušeni u SpeedVac vakuumskoj centrifugi i pohranjeni na -20 °C do analize.

2.2.2.4. RP-LC-ESI-MS

Razdvajanje i analiza glikopeptida izvedena je na tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza preko elektrosprej ionizatora povezanoj na spektrometar masa (engl. *Reverse phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*, RP-LC-ESI-MS). Primijenjena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography*, UPLC) Osušeni uzorci rekonstituirani su u 30 μL ultračiste vode i dodatno razrijeđeni 10 puta prije injektiranja. Nakon nanošenja uzoraka na predkolonu ispirani su 3 minute otapalom A (0,1 % TFA) uz protok od 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. Separacija triptičkih glikopeptida AGP-a temeljena je na njihovom peptidnom dijelu i izvedena na C18 koloni. U prvih 5 minuta

separacije, udio otapala B (80 % acetonitril i 0,02 % TFA) povećano je od 0 do 20 %, a kroz narednih 11,5 do 50 % što je činilo gradijent u trajanju od 16,5 minuta. Protok otapala postavljen je na 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, a temperatura kolone na 30 °C. Spektri masa snimani su u rasponu od 100 m/z do 4000 m/z. Kolizijska energija i energija iona postavljene su na 4 eV, uz argon u ulozi kolizijskog plina.

Za anotaciju glikopeptida AGP-a, fragmentacijski spektri glikanskog i peptidnog dijela svakog analita snimani su u stupnjevitom načinu kao što je ranije opisano, uz neke preinake (90). Podaci su prikupljeni uz fiksiranu frekvenciju snimanja MS-a od 1 Hz dok je brzina snimanja fragmentacijskog spektra bila varijabilna između 1 i 2 Hz, ovisno o intenzitetu roditeljskog iona. Prekursori su odabirani automatski, a lista uključenja napravljena je za slabije zastupljene glikopeptide koji nisu automatski uključeni. Rasponi izolacije ostavljeni su na zadanim vrijednostima ovisnim o m/z vrijednosti prekursora.

2.2.3. Intraindividualna stabilnost N-glikoma AGP-a

Ovaj eksperiment proveden je s ciljem ispitivanja stabilnosti N-glikoma AGP-a kroz vrijeme kod zdravih pojedinaca. Uzorci 14 zdravih muških ispitanika iz triju vremenskih točaka (0, 6 i 10 tjedana) analizirani su razvijenom metodom. Svi uzorci su nasumično postavljeni na mikrotitarsku pločicu od 96 jažica zajedno s 8 nasumičnih tehničkih duplikata. Duplikati su služili za izračun osnovnog CV-a same metode. Iz triju vremenskih točaka svakog ispitanika izračunat je intraindividualni CV dok je interindividualni CV izračunat iz uzoraka svih ispitanika unutar iste vremenske točke. Izračunate vrijednosti tad su mogle biti međusobno uspoređene.

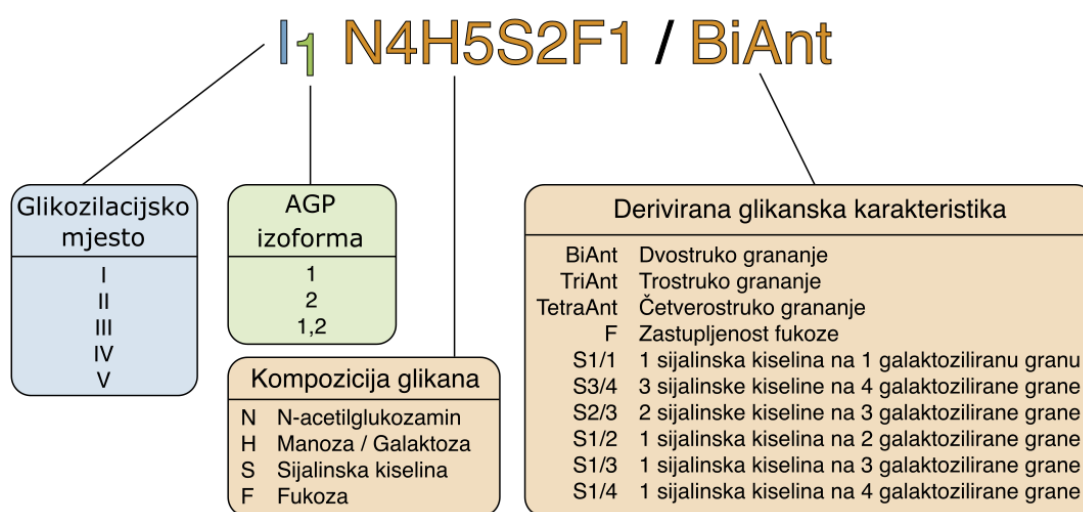
2.2.4. Obrada podataka i statistika

Vizualizacije i sva statistička obrada rezultata napravljeni su uz R programski jezik (verzija 3.6.3).

2.2.4.1. Relativna kvantifikacija glikopeptida

Prvi korak u obradi podataka bio je pretvorba originalnih datoteka Bruker formata u otvoreni mzXML format pomoću MSConvert alata. Automatizirana relativna kvantifikacija MS podataka izvedena je pomoću LacyTools računalnog programa (91). Kromatogrami su poravnati na temelju pet najintenzivnijih signala glikopeptida nakon čega je ciljano integriranje signala izvedeno na trostruko i četverostruko nabijenim molekulskim ionima analita. Signali su integrirani na temelju liste potvrđenih glikoformi peptida AGP-a i pripadajućih vremena

zadržavanja na koloni, do minimalno 90 % površine teorijske izotopne razdiobe. Ukupno 7 glikopeptida odnosno glikozilacijskih mjesta na izoformama AGP1 i AGP2 potvrđeno je i analizirano (detaljnije objašnjenje nalazi se u odjeljku 3.1). Parametri kontrole kvalitete integriranih signala automatski su izračunati za svaki pretraživani glikopeptid svakog uzorka i uključivali su: točnost mase, odstupanje od teorijske izotopne razdiobe i omjer intenziteta signala i šuma. Kvaliteta signala pojedinih glikopeptida provjeravana je na razini individualnih eksperimenata korištenjem prosječnih vrijednosti navedenih parametara između svih analiziranih uzoraka. Za daljnu obradu, kriteriji koje su signali glikopeptida morali zadovoljiti bili su točnost mase unutar odstupanja od 30 ppm-a, odstupanje od teorijske izotopne razdiobe ispod 25 % i omjer intenziteta signala i šuma veći od 15. Integrirani signali zbrojeni su za trostruka i četverostruka stanja naboja temeljem rezultata kontrole kvalitete i normalizirani prema ukupnom signalu pojedinog glikozilacijskog mjesta. Normalizacija služi uklanjanju varijacija u intenzitetu signala između uzoraka, čime se omogućuje njihova usporedba. Nazivlje korišteno za kompozicijski prikaz glikoformi nalazi se na slici 3.



Slika 3. Nazivlje korišteno za glikoforme i derivirane glikanske karakteristike, prema glikozilacijskim mjestima i doprinosećim izoformama AGP-a.

2.2.4.2. Korekcija na razlike u serijama

Varijacije u laboratorijskim uvjetima prisutnim za vrijeme pripreme i analize uzoraka mogu dovesti do pomaka u prikupljenim rezultatima. Iz ovog razloga provedena je korekcija na razlike u serijama (engl. *batch correction*) s ciljem prikupljanja preciznijih i točnijih mjerenja. Prethodno normalizirani podaci su zbog svoje desno pomaknute distribucije prvo logaritamski transformirani nakon čega je izvedena korekcija pomoću ComBat metode (R paket „sva“).

Redni broj mikrotitarske pločice s uzorcima predstavljao je izvor laboratorijske varijacije i prema tome modeliran je kao kovarijat serije. Procijenjeni efekt serije tad je oduzet od logaritamski transformiranih podataka, umanjujući tako eksperimentalni šum. Nakon izvođenja korekcije, podaci su vraćeni iz logaritamske transformacije.

2.2.4.3. Izračun deriviranih glikozilacijskih karakteristika AGP-a

Svi uzorci analizirani su na razini pojedinačnih glikopeptida, generirajući tako velik set podataka zbog višestrukih glikopeptida na svakom od 7 identificiranih glikozilacijskih mjesta. Razumijevanje i interpretacija ovolikog broja individualnih parametara je izazovno, zbog čega su izračunate derivirane glikozilacijske karakteristike AGP-a. One predstavljaju grupiranja originalnog seta svih glikopeptida prema zajedničkim kompozicijskim svojstvima. Tri izračunate skupine deriviranih karakteristika bile su broj grana glikana, prisutnost fukoze i broj vezanih sijalinskih kiselina. S obzirom da su sijalinske kiseline u pravilu vezane samo na galaktozilirane grane, njihov broj prikazan je kao omjer broja sijalinskih kiselina prema broju galaktoza. Derivirane karakteristike računane su sumiranjem normaliziranih signala za svaki glikopeptid pojedinog glikozilacijskog mjesta koji odgovara zadanoj karakteristici. Npr. za izračun biantenarnih glikana, zbrojeni su signali svih glikopeptida čiji glikani imaju točno dvije grane u svojoj strukturi i to je ponovljeno za svako od 7 glikozilacijskih mjesta. Na 7 analiziranih glikozilacijskih mjesta izdvojeno je ukupno 60 deriviranih karakteristika u studiji intraindividualne stabilnosti N-glikoma AGP-a i 63 derivirane karakteristike u studiji hiperglikemije u kritičnoj bolesti. Razlika od 3 derivirane karakteristike proizlazi iz različitog broja glikopeptida koji su zadovoljili kriterije kontrole kvalitete. Opis nazivlja korištenog za prikaz deriviranih karakteristika nalazi se na slici 3. U dvjema studijama vezanim uz HNF1A-MODY nisu računane derivirane karakteristike jer su zbog prethodno potvrđene povezanosti promatrani samo fukozilirani glikopeptidi.

2.2.4.4. Hiperglikemija u kritičnoj bolesti

Za procjenu povezanosti glikanskih karakteristika i hiperglikemije korištena je logistička regresija. Glikanska karakteristika smatrana je nezavisnom varijablom, a podatak o prisutnosti hiperglikemije zavisnom varijablom. Kako bi učinak razlika u dobi i spolu između skupine pacijenata s hiperglikemijom i kontrolne skupine bio uklonjen, ove varijable uključene su kao dodatni kovarijati. Time je isključen njihov doprinos u izračunatim koeficijentima za pojedine derivirane karakteristike. Izračunati koeficijenti predstavljaju promjenu u log-relativnom riziku (prirodni logaritam omjera vjerojatnosti da će pacijent razviti hiperglikemiju i vjerojatnosti da

ju neće razviti) za svaku jedinicu derivirane karakteristike. U modelu, umjesto originalno izračunatih vrijednosti deriviranih karakteristika, vrijednosti su transformirane na standardnu normalnu distribuciju (srednja vrijednost = 0, standardna devijacija = 1) pomoću inverzne transformacije rankova do normalnosti (R paket „GenABEL“). Varijable transformirane na ovaj način uvijek imaju istu standardiziranu varijancu, pa procijenjeni relativni rizik može biti uspoređen između različitih deriviranih karakteristika. U primjeru to znači da izračunati B koeficijent predstavlja promjenu u vjerojatnosti da pacijent razvije hiperglikemiju (izraženu u jedinicama log-relativne skale) za svaki pomak vrijednosti derivirane karakteristike u iznosu jedne standardne devijacije. S obzirom na višestruka testiranja (pojedine derivirane karakteristike), Benjamini-Hochberg metoda korištena je za kontrolu stope lažno pozitivnih rezultata (engl. *false discovery rate*, FDR) uz granicu statističke značajnosti od $p = 0,05$.

2.2.4.5. Usporedba fukozilacije AGP-a kod različitih tipova šećerne bolesti

Za usporedbu razina fukoziliranih glikopeptida AGP-a između skupina pacijenata oboljelih od različitih tipova šećerne bolesti korištena je generalizirana linearna regresija. Logaritamski transformirane relativne zastupljenosti pojedinačnih glikopeptida postavljeni su kao zavisne varijable. Nezavisnu varijablu predstavljao je tip šećerne bolesti (HNF1A-MODY, HNF4A-MODY, šećerna bolest tipa 1 ili šećerna bolest tipa 2). Po jedan statistički model napravljen je za svaki analizirani fukozilirani glikopeptid. Izračunata veličina efekta predstavlja prirodni logaritam razlike u relativnoj zastupljenosti odgovarajućeg glikopeptida između odabranih skupina pacijenata. Kao kontrola stope lažno pozitivnih rezultata primijenjena je Benjamini-Hochberg metoda, a p -vrijednost $< 0,05$ smatrana je značajnom.

2.2.4.6. Usporedba fukozilacije AGP-a prema genskim varijantama *HNF1A*

Za usporedbu razina fukoziliranih glikopeptida AGP-a između skupina pacijenata podijeljenih prema prisutnosti i procijenjenom fenotipskom efektu *HNF1A* genskih varijanti korištena je generalizirana linearna regresija. Logaritamski transformirane relativne zastupljenosti pojedinačnih glikopeptida postavljene su kao zavisne varijable. Nezavisne varijable predstavljala je skupina kojoj pacijent pripada (štetne varijante, benigne varijante ili bez rijetkih varijanti) kao i spol pacijenta. Po jedan statistički model napravljen je za svaki analizirani fukozilirani glikopeptid. Izračunata veličina efekta predstavlja prirodni logaritam razlike u relativnoj zastupljenosti odgovarajućeg glikopeptida između odabranih skupina pacijenata. Kao kontrola stope lažno pozitivnih rezultata primijenjena je Benjamini-Hochberg metoda, a p -vrijednost $< 0,05$ smatrana je značajnom.

Procjena potencijala fukoziliranih glikopeptida AGP-a u identificiranju HNF1A-MODY pacijenata ispitana je ROC krivuljom (engl. *receiver operating characteristic curve*). ROC krivulja predstavljena je odnosom specifičnosti (udio stvarno negativnih rezultata među svim negativnim rezultatima testa) na apscisi i osjetljivosti (udio stvarno pozitivnih rezultata među svim pozitivnim rezultatima testa) na ordinati, za niz graničnih vrijednosti (R paket „pROC“). Učinkovitost različitih modela uspoređena je temeljem površine ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC). Modeli logističke regresije napravljeni su za svaki analizirani fukozilirani glikopeptid uz prisutnost HNF1A-MODY dijagnoze kao zavisnom varijablom i normaliziranim mjerenjima glikopeptida kao nezavisnom varijablom. Glikopeptidi s najboljom učinkovitošću u razlikovanju HNF1A-MODY pacijenata izabrani su na temelju AUC vrijednosti. Za ispitivanje klasifikacijske učinkovitosti modela s uključenim višestrukim fukoziliranim glikopeptidima kao nezavisnim varijablama, primijenjen je regularizirani logistički regresijski model (R paket „glmnet“). Prije treninga i validacije modela, parametar regularizacije alfa, optimiziran je na 0.45, dok je lambda odabrana na temelju najmanje stope pogreške predviđanja kod unakrsne validacije (engl. *cross validation*). Za evaluaciju diskriminacijske točnosti regulariziranog logističkog modela, korištena je procedura deseterostruke unakrsne validacije nakon čega je izračunata AUC vrijednost. Usporedba AUC vrijednosti između jednostruke logističke regresije na temelju individualnog glikopeptida i regularizirane logističke regresije s višestrukim glikopeptidima napravljena je pomoću *bootstrap* metode ponovnog uzorkovanja s 2000 replikata (R paket „pROC“).

2.3. Materijali

2.3.1. Kemikalije

Za provedbu istraživanja u sklopu ovog doktorskog rada korištene su sljedeće kemikalije: Acetonitril (VWR international, SAD), amonijev bikarbonat (NH_4HCO_3) (Acros Organics, Belgija), ditiotreitrol (Sigma-Aldrich, SAD), fosfovolframova kiselina ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) (Sigma-Aldrich, SAD), HILIC zrnca Chromabond (Macherey-Nagel, Njemačka), jodoacetamid (Sigma-Aldrich, SAD), klorovodična kiselina (HCl) (VWR International, SAD), natrijev hidroksid (NaOH) (Sigma-Aldrich, SAD), perklorna kiselina (HClO_4) (Merck, Njemačka), RapiGest SF surfaktant (Waters, SAD), trifluoroctena kiselina ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) (Sigma-Aldrich, SAD).

2.3.2. Enzimi i standardi

Za provedbu istraživanja u sklopu ovog doktorskog rada korišteni su sljedeći enzimi i standardi: AGP standard (Sigma-Aldrich, SAD), TPCK-tretirani tripsin u 50 mM octenoj kiselini (Promega, SAD).

2.3.3. Uređaji i oprema

Za provedbu istraživanja u sklopu ovog doktorskog rada korišteni su sljedeći uređaji i oprema: ABgene 96-jažična mikrotitarska pločica (Thermo Scientific, SAD), centrifuga (Eppendorf, Njemačka), inkubator (MRC, Izrael), kolona Halo C18 nano-LC (150 mm × 75 μm i.d., 2.7 μm HALO fused core particles) (Advanced Materials Technology, SAD), mikropipete (Rainin, SAD), nastavci za mikropipete (Rainin, SAD), polipropilenske filter pločice s 96 jažica (OrochemA, SAD), predkolona Acclaim PepMap100 C8 (5 mm × 300 μm i.d.) (Thermo Fisher Scientific, SAD), spektrometar masa Compact (Bruker Daltonics, SAD), tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC) nanoACQUITY (Waters, SAD), treskalica (GFL, Njemačka), trodimenzionalni pisač (Anycubic, Kina), vakuumska centrifuga SpeedVac (Thermo Scientific, SAD), vakuusko postolje (Millipore Corporation, SAD).

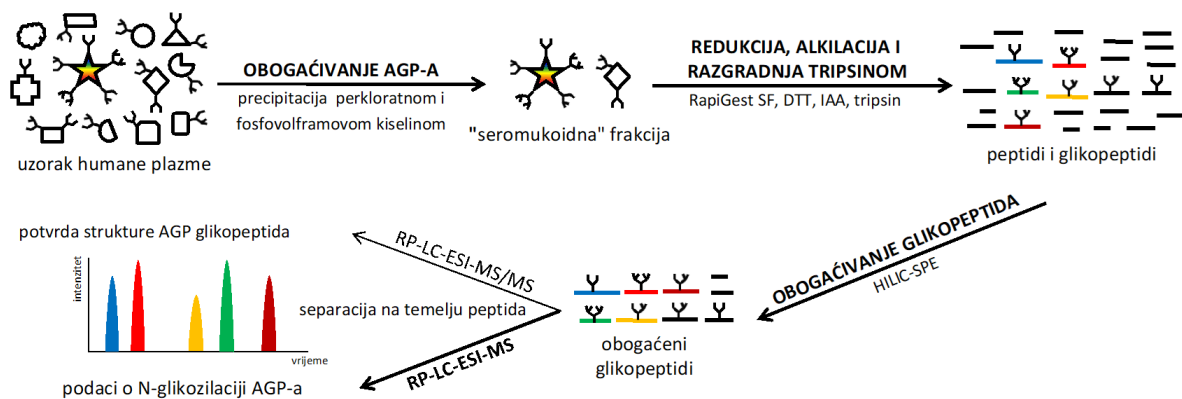
2.3.4. Računalni programi i alati

Za provedbu istraživanja u sklopu ovog doktorskog rada korišteni su sljedeći računalni programi i alati: Byonic search engine version 3.9.6 (Protein Metrics, SAD), Compass DataAnalysis (Bruker Daltonics, SAD), GlycoMod (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska), GlycoWorkbench (GNU licenca), HyStar version 4.2 (Bruker Daltonics, SAD), LaCyTools version 1.0.11.0.1b.9 (Apache licenca), MSConvert tool version 3. (ProteoWizard, SAD), Otof control (Bruker Daltonics, SAD), R programski jezik (verzija 3.6.3).

3. REZULTATI I RASPRAVA

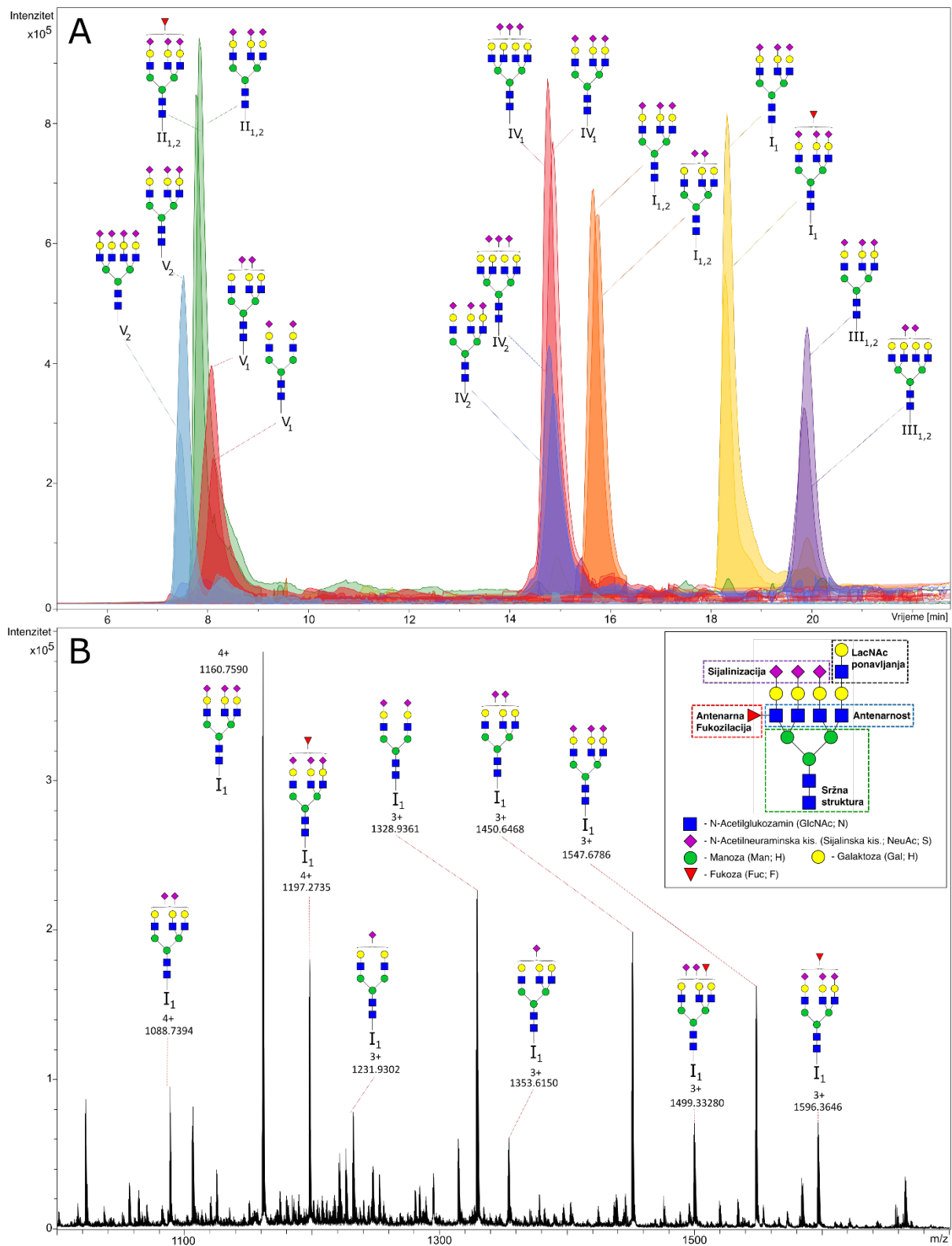
3.1. Razvoj metode za visokoprotlačnu analizu N-glikozilacije AGP-a

Niske koncentracije AGP-a u plazmi kod ljudi predstavljaju izazov u analizi njegove N-glikozilacije. Uobičajen pristup bio bi pročišćavanje proteina pomoću afinitetne kromatografije, što je često dugotrajan i skup postupak. Ovaj problem riješen je pripremom seromukoidne frakcije plazme dvostrukom precipitacijom uz perklornu i fosfovolframovu kiselinu (89), u formatu pločice s 96 jažica. To je omogućilo pristupačnu i visokoprotlačnu pripremu uzoraka s obogaćenim udjelom AGP-a (Slika 4). Zahtjevni koraci odvajanja malih volumena supernatanta pojednostavljeni su i ubrzani primjenom spojnog sistema za mikrotitarske pločice (Slika 2). Kako bi se nečistoće iz uzorka dodatno uklonile, uključen je i postupak HILIC-SPE pročišćavanja kojim se uklanjaju hidrofobniji neglikozilirani peptidi zaostali nakon razgradnje tripsinom.



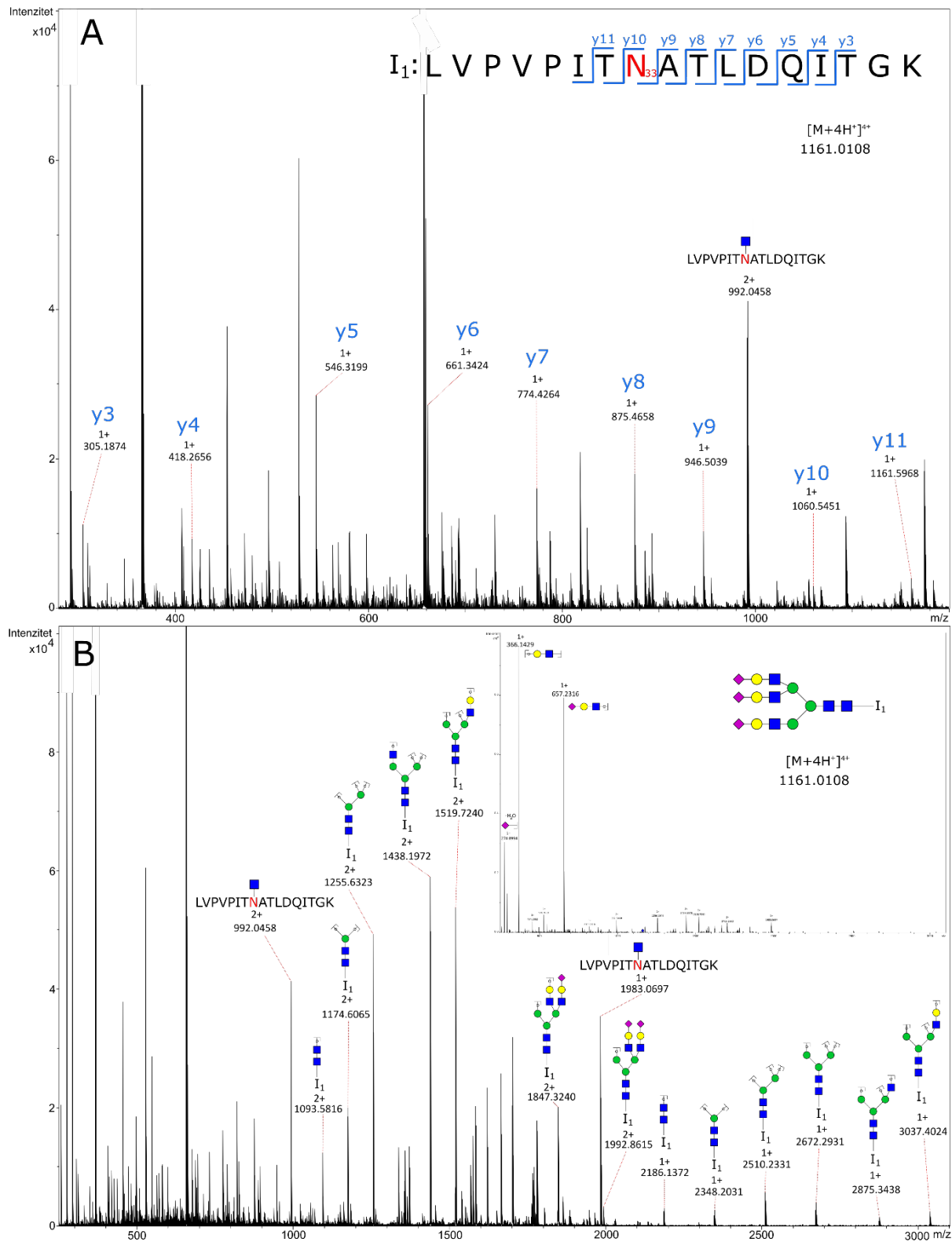
Slika 4. Shematski prikaz metode za visokoprotlačnu analizu N-glikozilacije AGP-a. Preuzeto i prilagođeno iz Keser i sur., 2021. (92).

Analizu N-glikozilacije APG-a iz još uvijek vrlo kompleksnog uzorka sastavljenog od glikopeptida velikog broja proteina bilo je moguće provesti uz RP-LC-ESI-MS. Jedan od izazova u razvoju metode bio je ostvariti dobro odvajanje na LC koloni u trajanju gradijenta dovoljno kratkom da metoda zadrži visokoprotlačnost i omogući analizu stotina uzoraka u prikladnom vremenu. Uz tri gena koji kodiraju za dvije izoforme (AGP1 i AGP2), razgradnja AGP-a daje kompleksan uzorak koji unatoč pet glikozilacijskih mjesta pojedine izoforme, s obzirom na razlike u njihovom aminokiselinskom slijedu, može sadržavati ukupno osam različitih glikoziliranih peptida. Opis nazivlja korištenog za glikopeptide AGP-a prikazan je na slici 3. Karakterističan kromatogram s iscertanim tragovima izoliranih iona najzastupljenijih glikopeptida svakog glikozilacijskog mjesta prikazan je na slici 5 (A), a primjer kroz vrijeme izlaska s kolone sumiranog MS spektra I₁ glikozilacijskog mjesta na slici 5 (B).



Slika 5. Rezultati LC-MS analize glikopeptida AGP-a. (A) karakteristični kromatogram s prikazima izoliranih iona za najzastupljenije glikopeptide svakog glikozilacijskog mjesta. (B) Sumirani spekatar za I_1 s anotiranim najzastupljenijim glikanskim strukturama. Preuzeto i prilagođeno iz Keser i sur., 2021. (92).

Slika 6 (A i B) pokazuje redom primjer fragmentacije peptidnog i glikanskog dijela I₁ N5H6S3, najzastupljenije glikoforme ovog glikozilacijskog mjesta.



Slika 6. Rezultati LC-MS analize glikopeptida AGP-a. (A) Fragmentacijski spektar peptidnog dijela I₁ N5H6S3, najzastupljenijeg glikopeptida ovog glikozilacijskog mjesta. (B) Fragmentacijski spektar glikanskog dijela I₁ N5H6S3, najzastupljenijeg glikopeptida ovog glikozilacijskog mjesta. Preuzeto i prilagođeno iz Keser i sur., 2021. (92).

3.1.1. Validacija metode

Glikopeptidi različitih glikozilacijskih mjesta kromatografski se uspješno odjeljuju ili se razlikuju u m/z vrijednostima pa je njihova detekcija i kvantifikacija moguća. Najhidrofilniji glikopeptidi koji se prvi ispiru s kolone i odgovaraju glikozilacijskim mjestima II i V kromatografski se preklapaju, ali razlika između njihovih m/z vrijednosti omogućuje analizu. Jedini glikopeptidi koji se nedovoljno odvajaju u obje dimenzije su glikopeptidi IV₁ i IV₂. Njihov aminokiselinski slijed se razlikuje u samo 4 aminokiseline i ta razlika je nedovoljna za efikasnu separaciju za vrijeme kromatografskog odjeljivanja. Također, razlika u masama ova dva glikopeptida je 5 Da (1914,889 Da i 1919,858 Da za peptidni dio IV₁ i IV₂ redom) što uzrokuje djelomično preklapanje u masama njihovih izotopa. S obzirom na visokoprotočnost metode, glikopeptidi IV₂ glikozilacijskog mjesta koji se počinju preklapati sa šestim izotopom glikopeptida IV₁, isključeni su iz kvantifikacije. Glikopeptidi IV₁ glikozilacijskog mjesta kvantificirani su samo do šestog izotopa, kako bi se smanjio efekt potencijalno koeluirajućih glikopeptida IV₂ glikozilacijskog mjesta. Time je i dalje pokriveno više od 90 % izotopne razdiobe IV₁ glikopeptida.

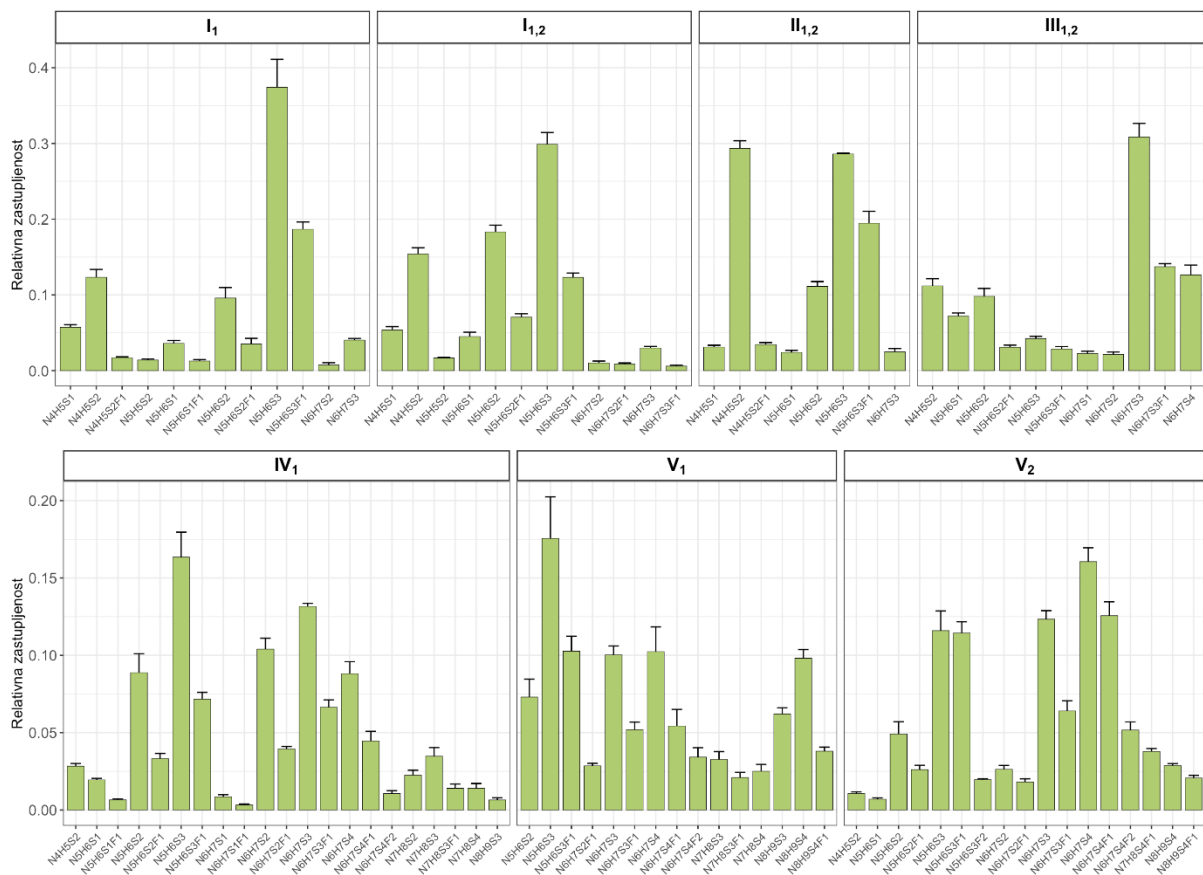
Primjenom protokola za obogaćivanje na standardnim uzorcima AGP-a, medijan CV vrijednosti svih analiziranih glikopeptida porastao je s 2 % (interkvartilni raspon, IQR = 1-4 %) za netretirane uzorke na 8 % (IQR = 5-13 %). Ovo znači da je protokol unio nešto varijacije, ali ponovljivost metode i dalje je na prihvatljivoj razini nakon obogaćivanja. Nadalje, analizom dviju serija uzoraka standarda plazme ispitana je ponovljivost unutar serija (10 replikata nasumično postavljenih na jednoj mikrotitarskoj pločici) i između serija (dva puta po 5 replikata nasumično raspoređenih na dvjema pločicama). Medijan CV vrijednosti bio je 10 % (IQR = 8-15 %) za unutarserijske i 15 % (IQR = 10-22 %) za međuserijske replikate. U usporedbi s ponovljivosti kod komercijalnih uzoraka AGP-a, može se zaključiti da prisutnost ostalih proteina u matrici uzorka ne povećava znatno varijaciju mjerenja, iako je efekt serije u određenoj mjeri prisutan, slično kao i kod drugih visokoprotočnih metoda analize glikozilacije. Provedena korekcija na efekt serija smanjila je međuserijski CV na 12 % (IQR = 9-16 %) i dalje je primjenjivana u svim skupinama uzoraka.

Za procjenu minimalnog početnog volumena plazme iz kojega puni N-glikozilacijski profil AGP-a može biti određen, postupak obogaćivanja primijenjen je na seriju triplikata standardnog uzorka plazme različitih volumena. Profili dobiveni iz 50, 20, 10 i 5 μ L uzorka bili su usporedivi (CV = 3,8 %, 4,2 %, 2,7 % i 4,2 % redom) i svi glikopeptidi zadovoljili su kriterije kvalitete. Za razliku od njih, profil dobiven iz 2,5 μ L plazme nosio je znatno veći prosječni CV od 22,9

% uz nedostupno treće glikozilacijsko mjesto uslijed niskog intenziteta signala. Kromatogrami dobiveni iz uzoraka volumena 1 μL bili su nedovoljne kvalitete za daljnju obradu. Iz ovih rezultata vidljivo je da je puni N-glikanski profil AGP-a moguće dobiti iz samo 5 μL uzorka.

3.1.2. N-glikozilacijski profil AGP-a iz standardnog uzorka plazme

S ciljem ispitivanja zastupljenosti različitih N-glikanskih struktura vezanih na AGP, analiziran je standardni uzorak plazme pripremljen spajanjem alikvota plazme 122 ispitanika. Od ukupno 8 potencijalnih glikozilacijskih mjesta AGP1 i APG2, 7 ih je uzeto u obzir prilikom relativne kvantifikacije prisutnih glikoformi, čime je pokriveno svih 5 N-glikozilacijskih mjesta AGP-a. Ukupan broj od 96 glikoformi anotiran je i relativno kvantificiran prema glikozilacijskim mjestima (Slika 7).



Slika 7. Reativne zastupljenosti svih glikopeptida AGP analiziranih iz standardnog uzorka plazme podijeljenih prema glikozilacijskim mjestima. Stupci pogreške prikazuju standardnu devijaciju dekaplikata.

Na svim glikozilacijskim mjestima identificirane su kompleksne, gotovo isključivo visoko razgranate i sijalinizirane N-glikanske strukture. Glikozilacijsko mjesto IV₁ (N93) karakterizira najveća raznolikost s 21 identificiranom glikanskom strukturom. Za razliku od IV₁, samo osam glikanskih struktura potvrđeno je na II_{1,2} (N56) glikopeptidu. Glikozilacijska mjesta I₁, I_{1,2},

III_{1,2}, V₁ i V₂ opisana su s 12, 12, 11, 15 i 17 glikanskih struktura redom. Triantenarni glikan s tri sijalinske kiseline (N5H6S3) bio je najzastupljenija struktura prvog glikozilacijskog mjesta AGP1 kao i AGP2 izoforme. Glikopeptidi s dodatnom fukozom (N5H6S3F1) kao i oni s jednom sijalinskom kiselinom manje (N5H6S2) također su zastupljeni na ovom glikozilacijskom mjestu AGP1 i AGP2. Na drugo glikozilacijsko mjesto II_{1,2} (N56) najviše su bili vezani trostruko razgranati glikani s tri sijalinske kiseline s i bez fukoze (N5H6S3, N5H6S3F1) kao i dvostruko razgranati s dvije sijalinske kiseline (N4H5S2). Glikozilacijsko mjesto III_{1,2} pokazalo je nešto veću zastupljenost visoko sijaliniziranih struktura među kojima je dominirala tetraantenarna struktura s tri sijalinske kiseline (N6H7S3). Peptidi s najvećom raznolikosti glikanskih struktura odgovarali su glikozilacijskom mjestu IV₁ (N93). Strukture od jednostavnih biantenarnih (N4H5S2) do visoko kompleksnih struktura s četiri sijalinske kiseline i ponavljanjima N-acetilaktozaminskih sljedova potvrđene su na ovom glikozilacijskom mjestu. Najzastupljenija struktura bio je triantenarni glikan s tri sijalinske kiseline (N5H6S3). Peto glikozilacijsko mjesto nešto više se razlikovalo između AGP1 i AGP2. Najzastupljeniji glikani V₁ mjesta bili su trostruko razgranati s tri sijalinske kiseline (N5H6S3), dok su na V₂ dominirali četverostruko razgranati glikani od kojih je struktura s četiri sijalinske kiseline bila najzastupljenija (N6H7S4). Na ovom glikozilacijskom mjestu obje izoforme AGP proteina identificirani su visoko kompleksni glikani s ponavljanjima N-acetilaktozaminskih sljedova uz do četiri sijalinske kiseline i dvije fukoze. Iako je u prethodnim studijama korištenjem drugih analitičkih pristupa na komercijalnom standardu AGP-a potvrđen znatno veći broj glikopeptida (do 268 struktura) (59), prikupljeni rezultati pokazuju da je ovom metodom moguća visokoprotlačna karakterizacija glikanskih profila uz i dalje velik broj glikanskih struktura na AGP-u.

3.2. Intraindividualna stabilnost N-glikoma AGP-a

Za analizu N-glikozilacije AGP-a u svrhe razvoja dijagnostičkih biljega bilo je važno provjeriti njezinu varijaciju kroz vrijeme unutar pojedinca, kao i usporediti ju s varijacijom između pojedinaca. Analit koji je stabilan u zdravom stanju ima veću vjerojatnost postati dijagnostičkim biljegom od analita čije vrijednosti znatno variraju. Iz tog razloga proveden je eksperiment u kojem je uspoređena intraindividualna i interindividualna varijacija N-glikozilacije AGP-a kod zdravih pojedinaca. Uključivala je 14 zdravih ispitanika usklađenih po dobi i spolu kroz tri vremenske točke u razmacima od 6 i 4 tjedana redom. S obzirom da je vrijeme poluživota AGP-a u plazmi kraće od tjedan dana (93, 94) može se pretpostaviti da je u

svakoj vremenskoj točki analiziran novosintetizirani protein. Zbog jednostavnije usporedbe, eksperiment je proveden na razini deriviranih glikanskih karakteristika AGP-a

Podaci prikupljeni u ovom istraživanju obrađeni su s ciljem izračuna tri kategorije CV vrijednosti za svaku deriviranu glikansku karakteristiku. Iz vremenskih točaka svakog ispitanika, izračunat je intraindividualni CV. Interindividualna CV vrijednost izračunata je usporedbom uzoraka svih pacijenata unutar iste vremenske točke, dok je osam nasumičnih duplikata uzoraka korišteno za procjenu CV vrijednosti same metode. Podaci prikazani u tablici 2 pokazuju da je medijan CV-a između ispitanika (10,4 %) veći od varijacije unutar ispitanika (4,7 %), kao i između duplikata uzoraka (2,4 %) kod svih deriviranih karakteristika. Također, vidljivo je da je intraindividualna varijacija usporediva s varijacijom proizašlom iz samog analitičkog postupka ili nešto veća od nje, ali je i dalje manja od intraindividualne varijacije.

Tablica 2. Procjena temporalne stabilnosti N-glikoma AGP-a kroz varijacije između duplikata (varijacija metode), intraindividualne varijacije i interindividualne varijacije prikazane medijanima i interkvartilnim rasponima CV vrijednosti.

Derivirana karakteristika	Varijacija duplikata (CV, %)	Intraindividualna varijacija (CV, %)	Interindividualna varijacija (CV, %)
I ₁ BiAnt	2,2 (1,6 - 3,8)	5,5 (4 - 6,8)	10 (8,9 - 11,3)
I ₁ TriAnt	0,6 (0,5 - 1,3)	1,8 (1,1 - 2,2)	3 (2,7 - 3,5)
I ₁ F	1,9 (1,1 - 3)	6,2 (4,6 - 8,1)	25,2 (24,2 - 26,3)
I ₁ S1/1	0,6 (0,2 - 0,7)	1,6 (0,7 - 2)	1,6 (1,4 - 1,9)
I ₁ S2/3	0,5 (0,4 - 0,9)	2,3 (1,5 - 4)	4,2 (4 - 4,8)
I ₁ S1/2	7 (4,6 - 8,9)	9,4 (9,1 - 9,7)	17 (13,6 - 17,8)
I ₁ S1/3	5,5 (2,3 - 9,9)	7,8 (4 - 14,8)	11,4 (10,4 - 15,1)
I _{1,2} BiAnt	6,5 (4,2 - 9,6)	8,2 (7,5 - 13)	18,1 (14,8 - 18,5)
I _{1,2} TriAnt	1 (0,7 - 3,7)	2,4 (1,7 - 4,8)	5,4 (4,8 - 5,9)
I _{1,2} TetraAnt	17,9 (6,2 - 25)	23,8 (13,8 - 50,9)	49,2 (35,6 - 52,3)
I _{1,2} F	6,4 (3,9 - 8,7)	8,6 (6,2 - 16,6)	24,1 (20,8 - 25,1)
I _{1,2} S1/1	1,8 (1,2 - 3,5)	2,4 (1,7 - 6,4)	5,3 (4,5 - 6,7)
I _{1,2} S3/4	17,6 (3,9 - 26,9)	21,7 (12,9 - 51,5)	54,8 (39,4 - 57,2)
I _{1,2} S2/3	3 (1,5 - 4,7)	3,4 (3 - 6)	5,6 (5,4 - 6,8)
I _{1,2} S1/2	7,9 (6,5 - 14,6)	8,4 (5 - 14,6)	15,9 (12,8 - 22,9)
I _{1,2} S1/3	6,9 (3,3 - 7,7)	6,8 (3,3 - 10,1)	13,4 (12,7 - 13,9)
II _{1,2} BiAnt	0,3 (0,2 - 0,8)	2,1 (1,2 - 2,6)	7,2 (6,4 - 7,6)
II _{1,2} TriAnt	0,2 (0,1 - 0,3)	1,1 (0,8 - 1,6)	4,1 (3,9 - 4,4)
II _{1,2} TetraAnt	6,4 (2,5 - 11,9)	11,4 (8,8 - 23,3)	22,5 (22,2 - 26,4)
II _{1,2} F	0,4 (0,2 - 1,2)	4,3 (2,7 - 4,7)	20,4 (19,4 - 20,5)
II _{1,2} S1/1	0,2 (0,1 - 0,4)	0,7 (0,4 - 1,2)	2,1 (2,1 - 2,3)
II _{1,2} S3/4	6,4 (2,5 - 11,9)	11,4 (8,8 - 23,3)	22,5 (22,2 - 26,4)
II _{1,2} S2/3	1,6 (1,3 - 2,9)	3,6 (2,1 - 5,9)	13,5 (13,3 - 13,9)
II _{1,2} S1/2	7,1 (3,3 - 9,8)	6,9 (5,3 - 8,9)	10,5 (9,8 - 11,4)
II _{1,2} S1/3	6,6 (1,8 - 10,7)	11,1 (5,4 - 15)	17,4 (14,1 - 21,9)
III _{1,2} BiAnt	3 (1,9 - 4,3)	12,6 (6,9 - 17)	24,2 (19,6 - 25)
III _{1,2} TriAnt	1,1 (0,4 - 2)	2,1 (1,4 - 3,4)	5,4 (5,4 - 6)

III _{1,2} TetraAnt	1,7 (0,7 - 3,9)	4,7 (1,7 - 5,9)	10,3 (8,8 - 11)
III _{1,2} F	10 (3,3 - 11,6)	7,8 (4,7 - 10,9)	23,7 (20 - 23,9)
III _{1,2} S1/1	1,1 (0,8 - 1,5)	1,9 (1,3 - 2,5)	5,7 (5,3 - 6,4)
III _{1,2} S3/4	2,2 (0,9 - 4,2)	2,8 (2,1 - 4,3)	11,5 (10,7 - 12,4)
III _{1,2} S2/3	3 (1 - 5,3)	7,5 (2,8 - 10,6)	10,7 (8,7 - 11,1)
III _{1,2} S1/2	3,4 (1,3 - 5,1)	4,6 (3,5 - 7,4)	9,7 (9 - 11)
III _{1,2} S1/3	5,9 (2,2 - 10,9)	7,4 (4,8 - 10,5)	9,1 (8,7 - 10)
IV ₁ BiAnt	1,7 (1 - 3,4)	5,4 (4,2 - 6,4)	11,4 (9,8 - 11,9)
IV ₁ TriAnt	3,9 (1,8 - 6,3)	4 (2,7 - 5,7)	10,3 (9,9 - 10,9)
IV ₁ TetraAnt	2,1 (1,3 - 3,5)	2,3 (2,2 - 3,6)	7 (6,4 - 7,2)
IV ₁ F	2 (1,7 - 3,9)	5,3 (2,7 - 7,2)	21,2 (19,4 - 21,4)
IV ₁ S1/1	1,1 (0,4 - 1,6)	1,3 (0,7 - 2,4)	5,7 (5,4 - 5,8)
IV ₁ S3/4	1,7 (0,8 - 3,5)	2,3 (2,1 - 3,8)	7,6 (6,9 - 7,8)
IV ₁ S2/3	6,7 (2,7 - 8,6)	5,8 (3,3 - 7,3)	10,3 (9,8 - 10,5)
IV ₁ S1/2	2,6 (1,9 - 3,4)	4,2 (2,5 - 5,2)	10,2 (9,9 - 10,8)
IV ₁ S1/3	1,7 (0,9 - 3,3)	2,7 (1,7 - 3,8)	4,8 (4,5 - 4,9)
IV ₁ S1/4	6 (2,5 - 10,7)	7,4 (4,6 - 9,4)	19,9 (16,5 - 20,1)
V ₁ TriAnt	3,6 (1,6 - 5,6)	5,1 (3,2 - 5,9)	9,3 (9,2 - 11,1)
V ₁ TetraAnt	1,6 (0,6 - 3)	2,1 (1,5 - 2,9)	4,5 (4,3 - 5,2)
V ₁ F	1,2 (0,7 - 2,2)	2,5 (1,7 - 3,9)	14,4 (13,9 - 14,8)
V ₁ S1/1	1,1 (0,3 - 1,3)	1,1 (0,6 - 1,7)	3,1 (3 - 3,2)
V ₁ S3/4	0,3 (0,2 - 0,6)	1,4 (1,2 - 2,3)	7,6 (7,4 - 8,2)
V ₁ S2/3	7,1 (1,8 - 9,8)	6,1 (4,7 - 11,1)	13,4 (11,7 - 14,3)
V ₁ S1/2	5,5 (3,4 - 12,1)	7,7 (3,6 - 10,1)	16,2 (15,3 - 16,6)
V ₂ BiAnt	3,2 (2,6 - 6,6)	10,9 (9,6 - 12,1)	30,4 (25,8 - 31,6)
V ₂ TriAnt	3,4 (1,5 - 5,1)	4,4 (1,5 - 6,9)	9,9 (9,5 - 11,3)
V ₂ TetraAnt	1,2 (0,7 - 2,3)	1,7 (0,8 - 2,8)	4,5 (4,2 - 5)
V ₂ F	1,6 (0,3 - 2,6)	3,9 (2 - 5,3)	20,3 (19,1 - 20,4)
V ₂ S1/1	1,4 (0,9 - 1,9)	1,4 (0,7 - 1,8)	2,2 (2,1 - 2,4)
V ₂ S3/4	1,6 (1,1 - 1,9)	2,1 (1,7 - 3)	6,6 (6,3 - 6,9)
V ₂ S2/3	5,2 (2 - 7,9)	5,6 (2,2 - 8,9)	13,2 (12,8 - 14,1)
V ₂ S1/2	6,5 (4,2 - 9,1)	8,5 (5,7 - 9,8)	11,3 (11 - 13)
V ₂ S1/3	5,5 (2,6 - 8,1)	4,9 (2,7 - 8,5)	10,8 (10 - 10,9)
Sve derivirane karakteristike	2,4 (1,4 - 6,1)	4,7 (2,3 - 7,5)	10,4 (5,7 - 17,1)

Kao preduvjet za potencijalnu biomarkersku upotrebu, ovdje je potvrđena načelna stabilnost N-glikozilacije AGP-a kroz vrijeme unutar zdravih pojedinaca, kao i to da je varijacija unutar ispitanika manja od varijacije između ispitanika. Nadalje, činjenica da su ispitanici usklađeni po dobi i spolu, omogućila je promatranje interindividualne varijacije gdje očekujemo da je najmanja. Iz tog razloga, dodatni faktori poput prisutnosti patofizioloških stanja, trebali bi razliku između ovih dviju varijacija dodatno povećati. Slično ovoj spoznaji, prethodne studije ispitivanja N-glikoma svih proteina plazme i IgG-a pokazale su intraindividualnu temporalnu stabilnost (95, 96). To dodatno upućuje na zaključak kako su opažene razlike u glikanskim

profilima posljedica okolišnih utjecaja i fizioloških odgovora, a s obzirom da se često povećavaju uslijed patofizioloških procesa, nose i velik dijagnostički potencijal.

3.3. Hiperglikemija u kritičnoj bolesti

U ovom istraživanju analizirana je skupina ispitanika koja je uključivala pacijente oboljele od hiperglikemije za vrijeme kritične bolesti, čimbenika koji pet puta povećava rizik za kasniji razvoj šećerne bolesti tipa 2 (76, 77). Ukupno 108 pacijenata u dobi između 18 i 79 godina uključeno je u istraživanje. Uzorci su obrađeni razvijenom metodom za analizu N-glikozilacije AGP-a i rezultati statistički obrađeni. Analizom su dobivene 63 derivirane glikanske karakteristike za svaki uzorak koje su uspoređene između pacijenata s pojavom hiperglikemije i kontrolnih pacijenata bez hiperglikemije. Logističkom regresijom identificirano je šest deriviranih glikanskih karakteristika statistički značajno promijenjenih kod pacijenata sa zabilježenom hiperglikemijom u odnosu na kontrole (Tablica 3 i Slika 8).

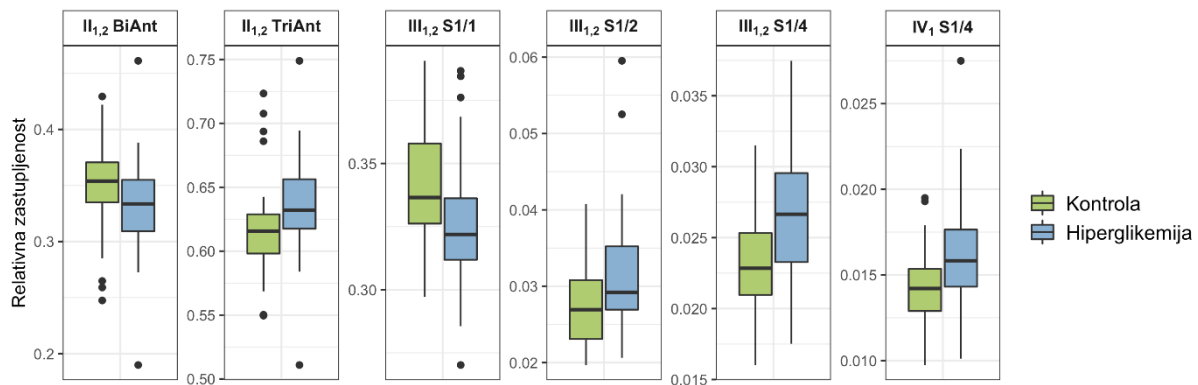
Tablica 3. Izračunati koeficijenti učinka deriviranih glikanskih karakteristika na rizik od razvoja hiperglikemije za vrijeme kritične bolesti s pripadajućim nekorigiranim i korigiranim p-vrijednostima. Koeficijent B predstavlja promjenu u vjerojatnosti da pacijent razvije hiperglikemiju, izraženu u jedinicama log-relativne skale.

Derivirana karakteristika	Koeficijent (B)	p-vrijednost	Korigirana p-vrijednost
I ₁ BiAnt	-0,336	0,179	0,388
I ₁ TriAnt	0,314	0,211	0,429
I ₁ TetraAnt	0,133	0,558	0,718
I ₁ F	0,055	0,822	0,893
I ₁ S1/1	-0,273	0,241	0,463
I ₁ S3/4	0,076	0,742	0,835
I ₁ S2/3	0,314	0,185	0,388
I ₁ S1/2	-0,113	0,650	0,799
I ₁ S1/3	0,275	0,251	0,464
I _{1,2} BiAnt	-0,369	0,090	0,320
I _{1,2} TriAnt	0,213	0,317	0,525
I _{1,2} TetraAnt	0,549	0,014	0,107
I _{1,2} F	-0,141	0,515	0,705
I _{1,2} S1/1	-0,298	0,159	0,386
I _{1,2} S3/4	0,491	0,025	0,131
I _{1,2} S2/3	0,177	0,403	0,609
I _{1,2} S1/2	-0,005	0,979	0,979
I _{1,2} S1/3	0,194	0,365	0,575
II_{1,2} BiAnt	-0,726	0,004	0,038
II_{1,2} TriAnt	0,791	0,002	0,037
II _{1,2} TetraAnt	0,302	0,159	0,386
II _{1,2} F	0,026	0,904	0,918
II _{1,2} S1/1	-0,148	0,487	0,682

II _{1,2} S3/4	0,302	0,159	0,386
II _{1,2} S2/3	0,307	0,168	0,388
II _{1,2} S1/2	-0,482	0,034	0,152
II _{1,2} S1/3	0,129	0,541	0,711
III _{1,2} BiAnt	-0,575	0,023	0,130
III _{1,2} TriAnt	0,177	0,416	0,609
III _{1,2} TetraAnt	0,183	0,432	0,618
III _{1,2} F	0,093	0,674	0,799
III_{1,2} S1/1	-0,965	0,001	0,022
III _{1,2} S3/4	0,252	0,284	0,497
III _{1,2} S2/3	0,090	0,676	0,799
III_{1,2} S1/2	0,720	0,004	0,038
III _{1,2} S1/3	0,329	0,129	0,370
III_{1,2} S1/4	0,893	0,001	0,022
IV ₁ BiAnt	-0,245	0,264	0,475
IV ₁ TriAnt	-0,378	0,105	0,320
IV ₁ TetraAnt	0,386	0,105	0,320
IV ₁ F	-0,058	0,792	0,875
IV ₁ S1/1	-0,593	0,016	0,115
IV ₁ S3/4	0,293	0,183	0,388
IV ₁ S2/3	-0,111	0,613	0,772
IV ₁ S1/2	0,566	0,021	0,129
IV ₁ S1/3	0,086	0,685	0,799
IV₁ S1/4	0,767	0,002	0,037
V ₁ TriAnt	-0,365	0,100	0,320
V ₁ TetraAnt	0,358	0,107	0,320
V ₁ F	-0,031	0,886	0,916
V ₁ S1/1	-0,182	0,408	0,609
V ₁ S3/4	0,399	0,079	0,313
V ₁ S2/3	-0,197	0,361	0,575
V ₁ S1/2	0,265	0,242	0,463
V ₂ BiAnt	-0,634	0,011	0,099
V ₂ TriAnt	-0,484	0,040	0,170
V ₂ TetraAnt	0,515	0,031	0,152
V ₂ F	-0,084	0,699	0,801
V ₂ S1/1	-0,038	0,858	0,901
V ₂ S3/4	0,222	0,308	0,525
V ₂ S2/3	-0,319	0,142	0,386
V ₂ S1/2	0,137	0,532	0,711
V ₂ S1/3	0,038	0,853	0,901

Na glikozilacijskom mjestu II_{1,2} prisutan je pomak prema većem broju antena kojeg pokazuje smanjenje relativnog udjela biantenarnih glikana (BiAnt -0,726, $p = 0,0376$) i povećanje udjela triantenarnih glikana (TriAnt 0,791, $p = 0,0329$). Nadalje, promjene na III_{1,2} glikozilacijskom mjestu uključuju smanjenje potpuno sijaliniziranih glikana (S_{1/1} -0,965, $p = 0,0218$), povećanje u udjelu glikana s jednom polovinom potencijalnih sijalinskih kiselina (S_{1/2} 0,720, $p = 0,0376$)

kao i povećanje u udjelu glikana s prisutnom samo jednom četvrtinom potencijalnih sijalinskih kiselina ($S_{1/4}$ 0,893, $p = 0,0218$). Konačno, IV_1 glikozilacijsko mjesto demonstriralo je povećanje u relativnom udjelu glikana s jednom četvrtinom potencijalno sijaliniziranih grana ($S_{1/4}$ 0,780, $p = 0,0329$). Treba spomenuti da je osim statistički značajne promjene prema povećanju broja grana na $II_{1,2}$ glikozilacijskom mjestu, unatoč izostanku statističke značajnosti, sličan trend prisutan i na drugim glikozilacijskim mjestima. Ipak, kao što je vidljivo iz rezultata logističke regresije, promjene u N-glikozilaciji AGP-a u različitim mjerama su bile prisutne između glikozilacijskih mjesta i izoformi AGP-a, pokazujući tako značaj analize na razini glikozilacijskog mjesta.



Slika 8. Kutijasti dijagram koji prikazuje statistički značajno promijenjene derivirane glikanske karakteristike kod pacijenata s hiperglikemijom u kritičnoj bolesti. Linija unutar kutija predstavlja medijan, a gornji i donji rub kutije omeđuje interkvartilni raspon. Krajevi vertikalnih linija koje se pružaju iz kutija označavaju raspon vrijednosti, a kružići predstavljaju odstupajuća mjerenja.

Nedavno provedena studija analize ukupne N-glikozilacije proteina plazme na ovoj skupini ispitanika pokazala je povezanost povećanog grananja i kompleksnosti N-glikozilacijskih struktura plazme s povišenim rizikom za razvoj šećerne bolesti tipa 2 i slabljenje kontrole razine glukoze u krvi (10). S obzirom na prirodu analize ukupne N-glikozilacije proteina plazme, objašnjene u uvodu, iz spomenute studije nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi točan uzrok i značenje opaženih promjena. Ovim istraživanjem pokazano je da su promjene barem dijelom uzrokovane povećanim grananjem glikana AGP-a. Povećanje u grananju glikana AGP-a potvrđeno je i u brojnim kroničnim upalnim stanjima (39, 43–46). Isto tako, studije do sad provedene na ukupnim proteinima plazme, pokazale su povećanje u udjelu višestruko razgranatih struktura kao odgovor na kronične upalne bolesti (97–99). Prema tome, porast opažen u plazmi mogao bi zapravo biti rezultat porasta grananja glikana AGP-a uslijed kronične upale. Također, poznato je da pacijenti s metaboličkim sindromom i šećernom bolešću tipa 2

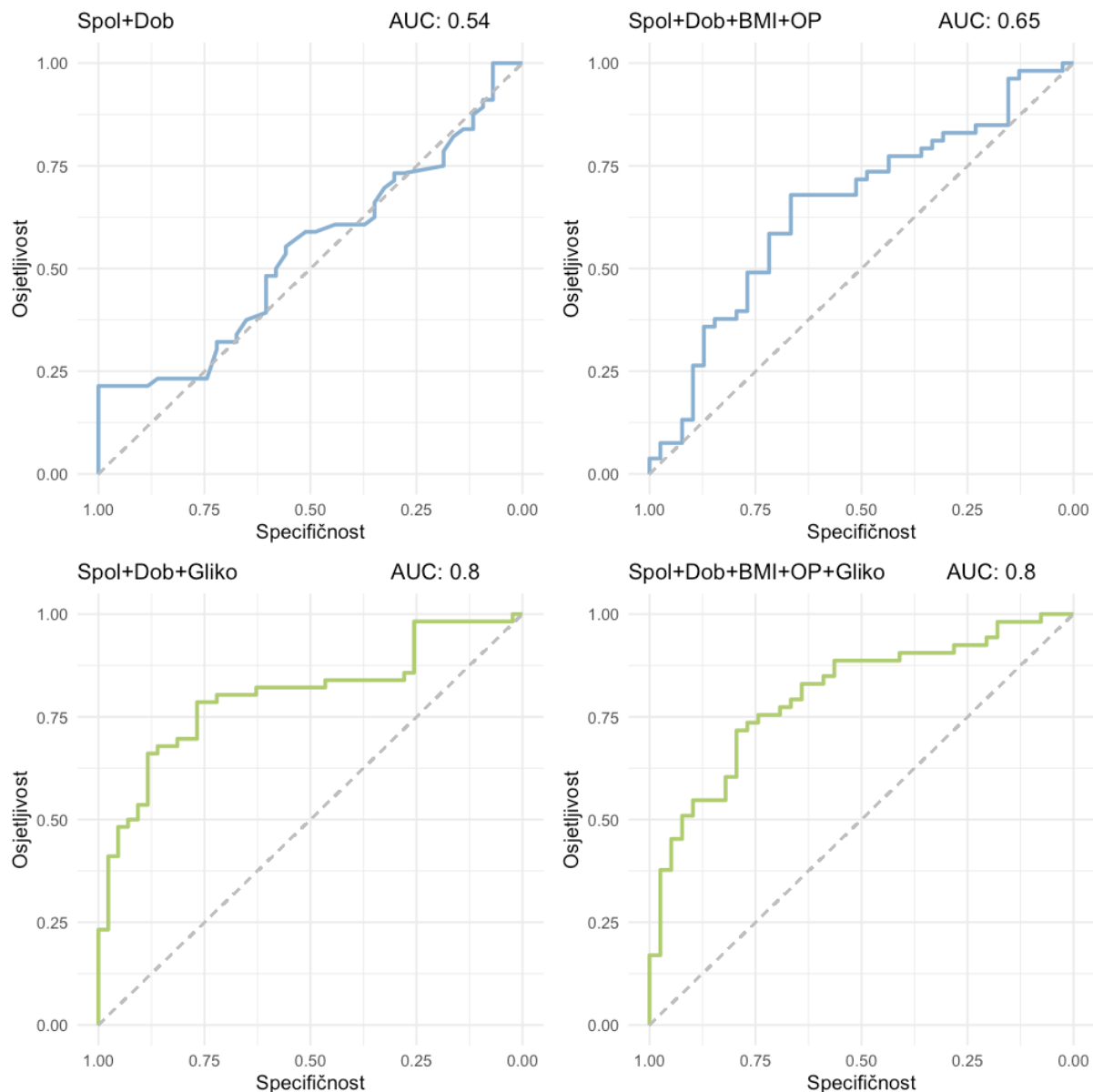
pate od blage kronične upale (100) pa bi promjene uočene u ovoj studiji isto tako mogle reflektirati njezin početak i posljedični rizik od razvoja metaboličkog sindroma.

S druge strane, u ovom istraživanju zabilježeno opadanje u sijaliniziranosti glikanskih struktura AGP-a predstavlja novu spoznaju koja nije opisana prilikom analize ukupne N-glikozilacije proteina plazme. Vjerojatan razlog za to je maskiranje efekta prisutnošću drugih proteina plazme čiji glikani su drukčije ili nisu uopće promijenjeni. Pretraživanjem literature nije pronađeno ranije opisano opadanje sijaliniziranosti AGP-a u bilo kojem patofiziološkom procesu zbog čega bi ono moglo biti specifično za šećernu bolest tipa 2. Ako bi to bilo potvrđeno u većim prospektivnim studijama, moglo bi pomoći u razvoju glikopeptidnog, specifičnog dijagnostičkog biljega za ranu detekciju povećanog rizika od šećerne bolesti tipa 2.

U ranijim studijama nije pronađena poveznica šećerne bolesti tipa 2 i glikozilacije AGP-a (61), ali povišene koncentracije AGP-a potvrđene su kod pretilih miševa i ljudi s metaboličkim sindromom i šećernom bolešću tipa 2 (101–103). Postoji mogućnost da AGP igra ulogu u unosu hrane i energetske homeostazi preko leptinskih receptora kao odgovor na nutritivni status organizma (101). Nadalje, predložen je mehanizam indukcije sinteze AGP-a selektivno u adipoznom tkivu pretilih miševa s ciljem suprimiranja prekomjerne upale i posljedične metaboličke disfunkcije (104). Ove spoznaje čine vjerojatnijim postojanje uloge AGP-a u odgovoru na metaboličku disfunkciju i iz nje proizašle šećerne bolesti tipa 2. S obzirom na vrlo visok udio glikana u ukupnoj masi AGP-a, za pretpostaviti je i njihovo sudjelovanje u ovom mehanizmu. Specifičnost interakcije AGP-a i njegovog potencijalnog receptora prema tome mogla bi biti modulirana promjenama u glikozilaciji.

U nastavku istraživanja, primjenom multivarijatne logističke regresije, ispitana je uspješnost glikopeptida u predviđanju predispozicije za šećernu bolest tipa 2. Samo šest prethodno identificiranih statistički značajnih deriviranih glikanskih svojstava uvršteno je u logističke modele. Modeli temeljeni na N-glikanima AGP-a kao i drugim kliničkim parametrima uspoređeni su pomoću ROC krivulja i njihovih AUC vrijednosti (Slika 9). Nulti model temeljen na dobi i spolu nije pokazao značajnu diskriminacijsku moć (AUC = 0,54), što je i očekivano s obzirom na usklađenost ispitanika prema dobi i spolu. Dodavanjem glikanskih varijabli dobi i spolu, diskriminacijska točnost modela znatno raste (AUC = 0.80). S druge strane, primjenom samo kliničkih parametara (dob, spol, indeks tjelesne mase (BMI) i obiteljska povijest šećerne bolesti) diskriminacijski model ima umjerenu učinkovitost (AUC = 0,65), no ona uključivanjem glikanskih podataka opet raste na istu razinu (AUC = 0.80) kao model temeljen na dobi, spolu i glikanima. Također, to znači da priključivanjem podataka o BMI-u i obiteljskoj povijesti

šećerne bolesti u model s glikanima ne dolazi do povećanja AUC vrijednosti, iz čega je moguće zaključiti da glikanski podaci već obuhvaćaju informaciju sadržanu u ovim kliničkim parametrima. Prikazani rezultati pokazuju da je kombiniranjem ovih šest glikanskih karakteristika moguće dobiti dobru prediktivnu učinkovitost za povećan rizik od razvoja šećerne bolesti tipa 2, iako je dobivene rezultate potrebno potvrditi prospektivnom studijom na većem broju ispitanika.



Slika 9. Usporedba ROC krivulja četiri modela za predikciju povećanog rizika od šećerne bolesti tipa 2. Površine ispod krivulja (AUC) i kombinacije predikcijskih varijabli prikazane su iznad svake krivulje. (BMI - indeks tjelesne mase, OP - obiteljska povijest šećerne bolesti, Gliko - glikopeptidi koji su pokazali statističku značajnost razlike između hiperglikemijske i kontrolne skupine)

3.4. Usporedba fukozilacije AGP-a kod različitih tipova šećerne bolesti

U ovom i sljedećem dijelu fokus istraživanja je HNF1A-MODY, monogeniski uzrokovan podtip šećerne bolesti. Analizom N-glikozilacije AGP-a iz uzoraka 466 pacijenata grupiranih prema tipovima dijagnosticiranih šećernih bolesti uspoređena je razina fukozilacije AGP-a kod HNF1A-MODY pacijenata u odnosu na druge tipove šećerne bolesti. S obzirom na iz prethodnih istraživanja poznatu povezanost *HNF1A* gena i fukozilacije proteina plazme, najveće promjene očekivane su u fukozilaciji AGP-A kod HNF1A-MODY pacijenata. Iz tog razloga, samo fukozilirani glikopeptidi AGP-a uspoređeni su između skupina pacijenata različitih tipova šećerne bolesti, dok su glikopeptidi bez prisutnosti fukoze isključeni iz analize. Zbog analiziranja isključivo fukoziliranih glikopeptida, nije bilo potrebe za računanjem deriviranih glikanskih karakteristika nego su relativni udjeli pojedinih glikopeptida direktno uspoređeni.

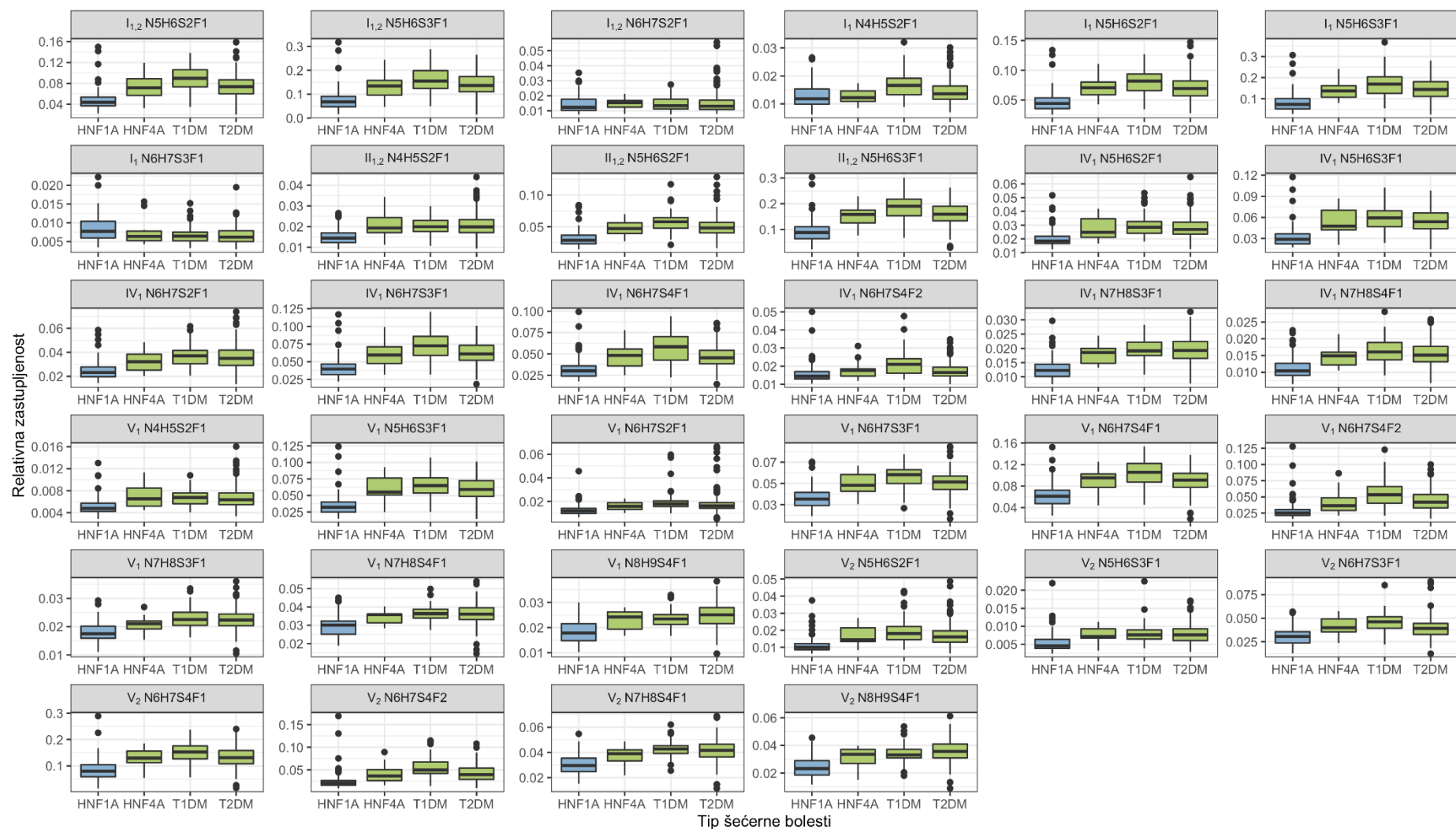
Analizom ukupno 34 fukozilirana glikopeptida i njihovom usporedbom pomoću linearne regresije, ustanovljene su značajne razlike između HNF1A-MODY pacijenata i pacijenata drugih tipova šećerne bolesti (Tablica 4).

Tablica 4. Razlike u relativnoj zastupljenosti individualnih glikopeptida između HNF1A-MODY-a i drugih tipova šećerne bolesti. Koeficijenti predstavljaju prirodni logaritam razlike u zastupljenosti glikopeptida između uspoređenih skupina.

Mjesto	Glikan	Koeficijent HNF4A	p-vrijednost HNF4A	Korigirana p-vrijednost HNF4A	Koeficijent T1DM	p-vrijednost T1DM	Korigirana p-vrijednost T1DM	Koeficijent T2DM	p-vrijednost T2DM	Korigirana p-vrijednost T2DM
II _{1,2}	N4H5S2F1	0,324	3,00E-07	8,50E-07	0,304	1,50E-15	1,76E-15	0,320	2,97E-28	4,80E-28
II _{1,2}	N5H6S2F1	0,446	6,03E-09	6,83E-08	0,618	5,62E-37	9,56E-36	0,472	3,66E-39	2,07E-38
II _{1,2}	N5H6S3F1	0,560	6,25E-10	1,06E-08	0,739	6,67E-38	2,27E-36	0,583	3,31E-42	3,75E-41
I ₁	N4H5S2F1	0,021	7,79E-01	7,79E-01	0,262	3,61E-08	3,84E-08	0,110	1,52E-03	1,56E-03
I ₁	N5H6S2F1	0,404	2,07E-07	6,41E-07	0,553	7,82E-27	1,90E-26	0,400	5,70E-26	7,75E-26
I ₁	N5H6S3F1	0,595	8,08E-08	3,43E-07	0,750	7,79E-25	1,56E-24	0,606	8,82E-29	1,58E-28
I ₁	N6H7S3F1	-0,113	2,27E-01	2,41E-01	-0,170	3,57E-03	3,68E-03	-0,179	3,79E-05	4,03E-05
I _{1,2}	N5H6S2F1	0,425	5,98E-08	2,90E-07	0,630	1,19E-36	1,35E-35	0,448	1,48E-34	6,30E-34
I _{1,2}	N5H6S3F1	0,613	1,85E-08	1,26E-07	0,796	1,88E-31	1,07E-30	0,674	2,11E-39	1,43E-38
I _{1,2}	N6H7S2F1	0,063	4,60E-01	4,74E-01	0,027	5,90E-01	5,90E-01	0,045	2,21E-01	2,21E-01
IV ₁	N5H6S2F1	0,313	1,86E-06	3,51E-06	0,393	1,70E-22	2,89E-22	0,351	7,87E-31	1,91E-30
IV ₁	N5H6S3F1	0,495	2,63E-08	1,49E-07	0,642	8,58E-31	3,72E-30	0,572	8,46E-42	7,19E-41
IV ₁	N6H7S2F1	0,271	1,15E-04	1,45E-04	0,411	1,67E-21	2,71E-21	0,364	3,99E-29	7,98E-29
IV ₁	N6H7S3F1	0,382	3,81E-07	9,97E-07	0,543	8,76E-31	3,72E-30	0,413	2,26E-32	6,99E-32
IV ₁	N6H7S4F1	0,371	1,86E-06	3,51E-06	0,558	2,32E-30	8,78E-30	0,379	2,02E-26	2,86E-26
IV ₁	N6H7S4F2	0,136	2,97E-02	3,26E-02	0,294	1,30E-14	1,47E-14	0,115	2,75E-05	3,02E-05
IV ₁	N7H8S3F1	0,351	1,62E-08	1,26E-07	0,435	1,80E-29	5,56E-29	0,423	6,87E-46	2,34E-44
IV ₁	N7H8S4F1	0,282	6,01E-06	9,73E-06	0,376	1,18E-22	2,11E-22	0,338	1,49E-31	4,22E-31
V ₁	N4H5S2F1	0,289	1,50E-05	2,22E-05	0,285	1,02E-12	1,11E-12	0,269	3,41E-19	4,09E-19
V ₁	N5H6S3F1	0,548	5,05E-10	1,06E-08	0,650	3,48E-32	2,36E-31	0,577	2,12E-43	3,60E-42
V ₁	N6H7S2F1	0,274	5,72E-04	6,71E-04	0,439	1,97E-19	2,68E-19	0,318	7,36E-19	8,34E-19
V ₁	N6H7S3F1	0,322	9,18E-08	3,47E-07	0,450	1,64E-32	1,40E-31	0,340	7,15E-34	2,70E-33
V ₁	N6H7S4F1	0,383	1,85E-07	6,28E-07	0,521	6,39E-30	2,17E-29	0,389	1,54E-30	3,50E-30
V ₁	N6H7S4F2	0,378	3,15E-05	4,29E-05	0,618	1,37E-27	3,57E-27	0,435	1,53E-25	2,00E-25
V ₁	N7H8S3F1	0,138	1,18E-03	1,34E-03	0,242	2,91E-20	4,30E-20	0,220	7,28E-29	1,38E-28

V ₁	N7H8S4F1	0,172	2,54E-05	3,60E-05	0,226	1,03E-19	1,46E-19	0,216	2,44E-30	5,18E-30
V ₁	N8H9S4F1	0,263	8,70E-07	1,97E-06	0,267	1,34E-16	1,75E-16	0,324	6,42E-38	3,12E-37
V _{1,2}	N5H6S2F1	0,399	1,70E-06	3,51E-06	0,541	1,02E-25	2,32E-25	0,424	1,85E-28	3,15E-28
V _{1,2}	N5H6S3F1	0,400	4,35E-06	7,39E-06	0,430	3,24E-16	4,04E-16	0,411	4,58E-25	5,77E-25
V _{1,2}	N6H7S3F1	0,305	6,77E-06	1,05E-05	0,425	3,30E-24	6,23E-24	0,273	3,49E-19	4,09E-19
V _{1,2}	N6H7S4F1	0,471	6,91E-07	1,68E-06	0,609	2,48E-25	5,27E-25	0,472	1,84E-27	2,72E-27
V _{1,2}	N6H7S4F2	0,546	3,21E-06	5,75E-06	0,814	9,96E-29	2,82E-28	0,594	3,11E-28	4,80E-28
V _{1,2}	N7H8S4F1	0,245	4,09E-05	5,35E-05	0,349	1,97E-21	3,04E-21	0,324	2,25E-31	5,89E-31
V _{1,2}	N8H9S4F1	0,258	1,80E-04	2,18E-04	0,341	3,32E-16	4,04E-16	0,387	3,20E-33	1,09E-32

Dobiveni rezultati vrlo jasno pokazuju smanjenu razinu fukoziliranih glikopeptida kod ovih pacijenata u gotovo svim analiziranim glikopeptidima i glikozilacijskim mjestima. Glikopeptid s najznačajnijom razlikom u relativnoj zastupljenosti pripada četvrtom glikozilacijskom mjestu AGP1 i nosi vezan tetraantenarni, trostruko sijalinizirani glikan, s prisutnim ponovljenim N-acetilaktozaminom i jednom fukozom (IV₁ N7H8S3F1). Iznimno niska p-vrijednost od $2,34 \times 10^{-44}$ u usporedbi sa šećernom bolešću tipa 2 upućuje na veliku izraženost ove razlike, vidljive i na grafičkom prikazu (Slika 10).



Slika 10. Relativne zastupljenosti individualnih fukoziliranih glikopeptida AGP-a prikazane kutijastim dijagramima, podijeljene prema tipu šećerne bolesti. (HNF1A i HNF4A - podtipovi MODY-a uzrokovani varijantama ovih gena, T1DM i T2DM - šećerna bolest tipa 1 i tipa 2)

Prethodna studija provedena na ovoj populaciji potvrdila je smanjenu razinu fukoziliranih glikana u plazmi pacijenata oboljelih od HNF1A-MODY-a u odnosu na pacijente ostalih analiziranih tipova šećerne bolesti (74). Prema rezultatima studije N-glikana plazme i proteina s kojih dolaze (14), moglo se pretpostaviti da je AGP nositelj opaženih promjena, ali to je bilo potrebno naknadno potvrditi. Rezultatima dobivenim u ovom istraživanju ta je pretpostavka potvrđena i moguće je zaključiti da gubitak funkcije *HNF1A* gena rezultira smanjenjem fukozilacije AGP-a. S ciljem uspostavljanja dijagnostičkog biljega, bitno je usporediti razine fukoziliranih glikopeptida AGP-a kod HNF1A-MODY-a s većim brojem različitih tipova i podtipova šećerne bolesti. Time je moguće potvrditi da promjena u fukozilaciji nije povezana sa samim poremećajem glikemijske ravnoteže ili nekim drugim zajedničkim čimbenikom, nego da je uistinu specifična za HNF1A-MODY i da prema tome može biti temelj diferencijalno dijagnostičkog procesa.

U usporedbi fukozilacije AGP-a kod HNF1A-MODY-a i drugih tipova šećerne bolesti, šećerna bolest tipa 2 ima najveći značaj. Razlog tome je činjenice da je šećerna bolest tipa 2 najčešća kriva dijagnoza HNF1A-MODY pacijenata zbog najveće sličnosti simptoma i prema tome otežanog razlikovanja (68). Činjenica da su u prosjeku najveće statističke značajnosti pronađene između ova dva tipa šećerne bolesti, kao i da je najveća statistička značajnost pojedinog glikopeptida pronađena ovdje, ide u prilog potencijalnom razvoju dijagnostičkog biljega za HNF1A-MODY.

Tip 1 šećerne bolesti iako i dalje česta kriva dijagnoza, lakše je razlikovati od HNF1A-MODY-a zbog često prisutne autoimunosti na tkivo gušterače, što je moguće rutinski utvrditi. Ipak, utvrđene razlike u razinama fukoziliranih glikopeptida AGP-a kod ova dva tipa, koje su u prosjeku i najveće u odnosu na usporedbu s drugim tipovima šećerne bolesti, dobrodošla su spoznaja jer ukazuju na mogućnost razlikovanja i u rijetkim slučajevima šećerne bolesti tipa 1 kad autoimunost ne može biti potvrđena i diferencijalna dijagnoza postaje zahtjevnija.

Transkripcijski faktori HNF4A i HNF1A reguliraju velik broj zajedničkih gena (105), zbog čega je i HNF4A potvrđen kao djelomični regulator fukozilacije proteina plazme (72). Ova činjenica mogla bi predstavljati problem u razlikovanju podtipova MODY-a jer je očekivan pomak prema manjoj zastupljenosti fukoziliranih glikopeptida AGP-a kod oba slučaja. Ipak, dobiveni rezultati pokazuju da je razlika u fukozilaciji kod HNF1A i HNF4A-MODY-a prisutna i statistički značajna, te da su medijani zastupljenosti pojedinih glikopeptida bliži onima u šećernoj bolesti tipa 1 i 2 nego kod HNF1A-MODY-a.

Ustanovljeni efekt prisutan je na svim analiziranim glikozilacijskim mjestima, potvrđujući tako snažan utjecaj *HNF1A* na fukozilaciju. Opsežnost efekta vjerojatno je i razlog njegove jasne vidljivosti na razini ukupnih glikana plazme kako je ranije pokazano. Jedini glikopeptid čija se relativna zastupljenost mijenja u smjeru suprotnom od očekivanog, tj raste kod HNF1A-MODY pacijenata, je I₁ N6H7S3F1. Ovo je opažanje, iako interesantno, teško interpretirati. S druge strane, s obzirom da se radi o najmanje zastupljenoj analiziranoj strukturi ovog glikozilacijskog mjesta, pouzdanost, a i značaj ove spoznaje mogao bi biti ograničen.

Ukupno, rezultatima ovog dijela istraživanja potvrđeno je pretpostavljeno smanjenje fukozilacije AGP-a kod HNF1A-MODY pacijenata, kao i razlika u odnosu na sve uspoređene tipove šećerne bolesti. Nakon ovako ustanovljenih preduvjeta za dijagnostičku korisnost fukoziliranih glikopeptida AGP-a, moguće je pristupiti daljnjem istraživanju.

3.5. Usporedba fukozilacije AGP-a prema genskim varijantama HNF1A

Utvrdivši razlike u fukozilaciji AGP-a kod HNF1A-MODY pacijenata u odnosu na različite druge oblike šećerne bolesti, u ovom dijelu istraživanja fukozilacija je dalje ispitana. Uspoređene su razine fukozilacije ovisne o prisutnosti i određenom fenotipskom učinku genskih varijanti, kao i procijenjen klasifikacijski potencijal fukoziliranih glikopeptida AGP-a za HNF1A-MODY pacijente.

Slučajevi šećerne bolesti ranog nastupa, karakterizirane očuvanim lučenjem inzulina i odsutnošću autoimunosti na tkivo gušterače, potencijalno pripadaju HNF1A-MODY-u, unatoč činjenici da daleko veći broj osoba sa šećernom bolešću tipa 2 također odgovara ovom kriteriju. S obzirom da su ove sličnosti u simptomima glavni izvor krivih dijagnoza kod HNF1A-MODY pacijenata, bitno je pronaći efikasan način izdvajanja HNF1A-MODY pacijenata iz velikog broja kandidata koji odgovaraju prethodno spomenutim obilježjima. Iz tog razloga, N-glikozilacija AGP-a analizirana je u skupini 98 pacijenata oboljelih od šećerne bolesti ranog nastupa, uz očuvano lučenje inzulina i odsutnost autoimunosti na gušteraču. Među tim pacijentima nalazilo se 18 pacijenata kod kojih je prethodno potvrđena oštećujuća *HNF1A* mutacija to jest HNF1A-MODY dijagnoza, ali i 9 pacijenata s benignim mutacijama. Cilj ovog eksperimenta bio je ispitati odgovaraju li promjene u fukozilaciji AGP-a funkcionalnosti *HNF1A* gena i mogu li prema tome biti temelj identifikacije oštećujućih *HNF1A* varijanti koje uzrokuju bolest. Osim toga, procjena učinkovitosti fukoziliranih glikopeptida AGP-a u identifikaciji HNF1A-MODY pacijenata iz skupa pacijenata s ne-autoimunom šećernom bolešću ispitana je ROC krivuljama i uspoređena na temelju AUC vrijednosti.

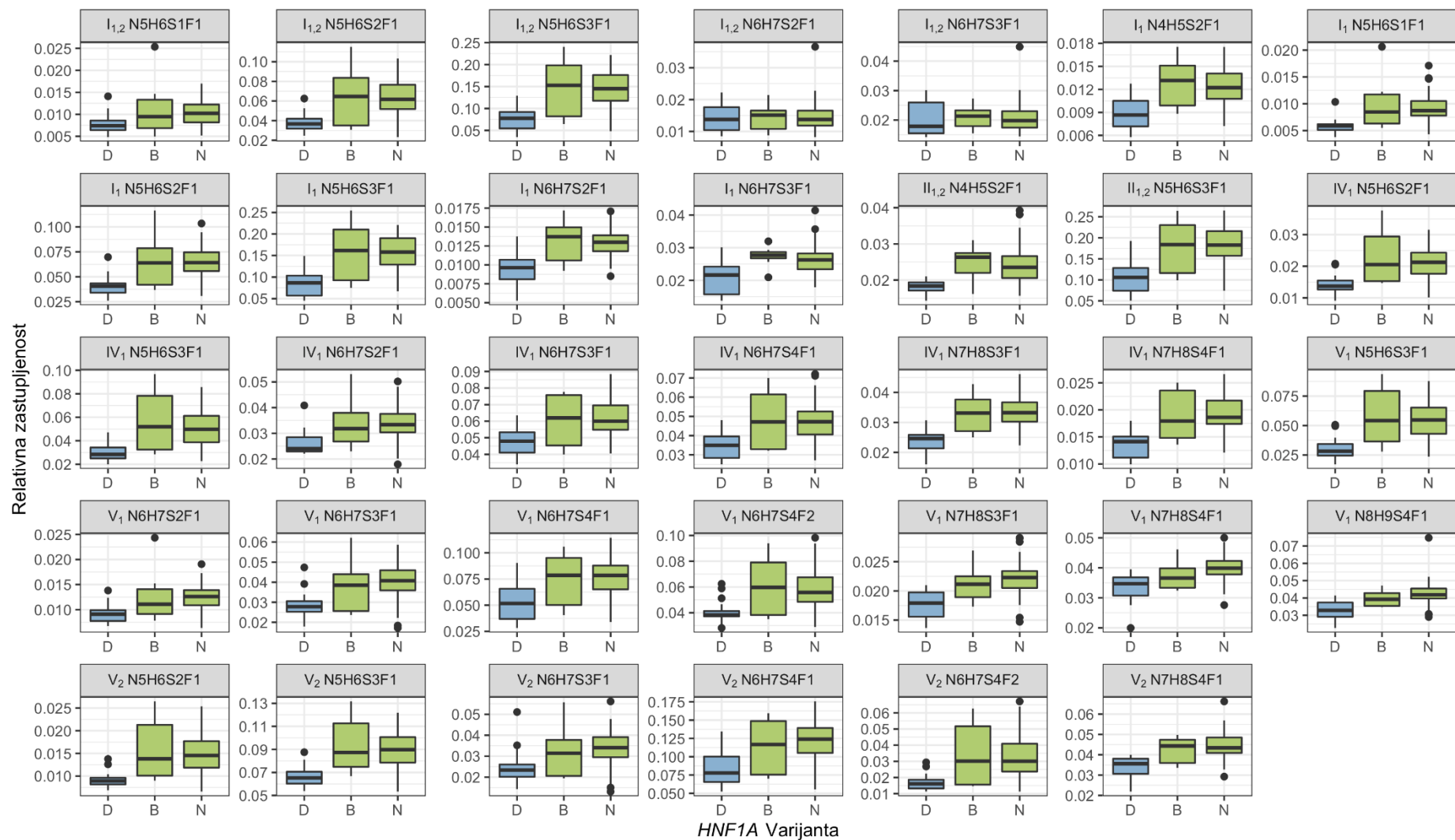
Primjenom linearne regresije uspoređeni su relativni udjeli 34 fukozilirana glikopeptida AGP-a između pacijenata s oštećujućim *HNF1A* varijantama i pacijenata s funkcionalnim genom, podijeljenih na pacijente s benignim varijantama i pacijente bez rijetkih varijanti (Tablica 5). Dobiveni rezultati pokazali su jasnu statistički značajnu razliku između pacijenata s oštećujućim varijantama i druge dvije skupine pacijenata, prisutnu kod velike većine analiziranih glikopeptida. Važno je napomenuti da je IV₁ N7H8S3F1, kao i u prethodnom eksperimentu usporedbe fukozilacije AGP-a kod različitih tipova šećerne bolesti, opet pokazao najveću statističku značajnost s p-vrijednošću od $1,46 \times 10^{-10}$ u usporedbi pacijenata s oštećujućim *HNF1A* varijantama i onih bez rijetkih varijanti. Smanjeni udjeli fukoziliranih glikopeptida AGP-a kod HNF1A-MODY pacijenata vidljivi su i na slici 11.

Kao što je prethodno provedena studija analize N-glikozilacije plazme na ovoj skupini ispitanika sugerirala, ovim eksperimentom je potvrđeno smanjenje fukoziliranosti AGP-a specifično kod pacijenata koji nose oštećujuću mutaciju *HNF1A* gena, dok se kod pacijenata s varijantama koje ne narušavaju funkciju *HNF1A* gena razina fukoziliranih glikopeptida nije promijenila, neovisno o prisutnosti mutacije. Ovo je vrijedna spoznaja jer ukazuje na potencijalno korištenje glikopeptida AGP-a u razjašnjavanju slučajeva gdje je sekvenciranjem *HNF1A* gena ustanovljena varijanta nejasnog značaja.

Tablica 5. Razlike u relativnoj zastupljenosti individualnih glikopeptida AGP-a kod pacijenata s benignim HNF1A varijantama (B) i bez rijetkih varijanti (N) u usporedbi s pacijentima s oštećujućim HNF1A varijantama. Koeficijenti predstavljaju prirodni logaritam razlike u zastupljenosti glikopeptida.

Mjesto	Glikan	Koeficijent B	p-vrijednost B	Korigirana p-vrijednost B	Koeficijent N	p-vrijednost N	Korigirana p-vrijednost N
I ₁	N4H5S2F1	0,241	9,44E-03	1,69E-02	0,302	5,59E-07	8,64E-07
I ₁	N5H6S1F1	0,367	4,50E-03	1,18E-02	0,421	4,72E-07	8,03E-07
I ₁	N5H6S2F1	0,328	5,45E-03	1,30E-02	0,447	1,21E-08	4,10E-08
I ₁	N5H6S3F1	0,408	6,14E-03	1,30E-02	0,569	9,36E-09	3,54E-08
I ₁	N6H7S2F1	0,265	1,76E-03	6,65E-03	0,315	1,54E-08	4,75E-08
I ₁	N6H7S3F1	0,241	8,60E-03	1,69E-02	0,234	5,30E-05	6,01E-05
I _{1,2}	N5H6S1F1	0,164	1,89E-01	2,01E-01	0,278	6,35E-04	6,74E-04
I _{1,2}	N5H6S2F1	0,294	2,46E-02	3,81E-02	0,469	1,08E-07	2,30E-07
I _{1,2}	N5H6S3F1	0,410	4,13E-03	1,17E-02	0,578	3,16E-09	1,53E-08
I _{1,2}	N6H7S2F1	0,009	9,37E-01	9,37E-01	0,030	6,86E-01	6,86E-01
I _{1,2}	N6H7S3F1	0,033	7,15E-01	7,37E-01	0,026	6,42E-01	6,61E-01
II _{1,2}	N4H5S2F1	0,253	9,59E-04	6,63E-03	0,251	6,27E-07	9,28E-07
II _{1,2}	N5H6S3F1	0,406	1,21E-03	6,63E-03	0,552	1,80E-10	3,06E-09
IV ₁	N5H6S2F1	0,318	1,48E-03	6,63E-03	0,368	4,06E-08	9,85E-08
IV ₁	N5H6S3F1	0,407	1,56E-03	6,63E-03	0,486	1,90E-08	5,37E-08
IV ₁	N6H7S2F1	0,157	5,55E-02	6,53E-02	0,241	9,30E-06	1,13E-05
IV ₁	N6H7S3F1	0,148	5,57E-02	6,53E-02	0,252	1,10E-06	1,50E-06
IV ₁	N6H7S4F1	0,210	2,22E-02	3,59E-02	0,301	8,28E-07	1,17E-06
IV ₁	N7H8S3F1	0,260	1,18E-04	4,02E-03	0,326	4,30E-12	1,46E-10
IV ₁	N7H8S4F1	0,258	1,30E-03	6,63E-03	0,335	9,49E-10	6,45E-09
V ₁	N5H6S3F1	0,483	3,06E-04	5,20E-03	0,574	3,32E-10	3,10E-09
V ₁	N6H7S2F1	0,191	4,46E-02	5,83E-02	0,272	1,49E-05	1,74E-05
V ₁	N6H7S3F1	0,198	6,22E-02	7,05E-02	0,341	1,59E-06	2,08E-06
V ₁	N6H7S4F1	0,238	3,77E-02	5,34E-02	0,385	5,37E-07	8,64E-07
V ₁	N6H7S4F2	0,230	3,24E-02	4,79E-02	0,318	7,66E-06	9,64E-06
V ₁	N7H8S3F1	0,146	8,98E-03	1,69E-02	0,221	6,67E-09	2,83E-08
V ₁	N7H8S4F1	0,103	4,08E-02	5,54E-02	0,183	7,02E-08	1,59E-07

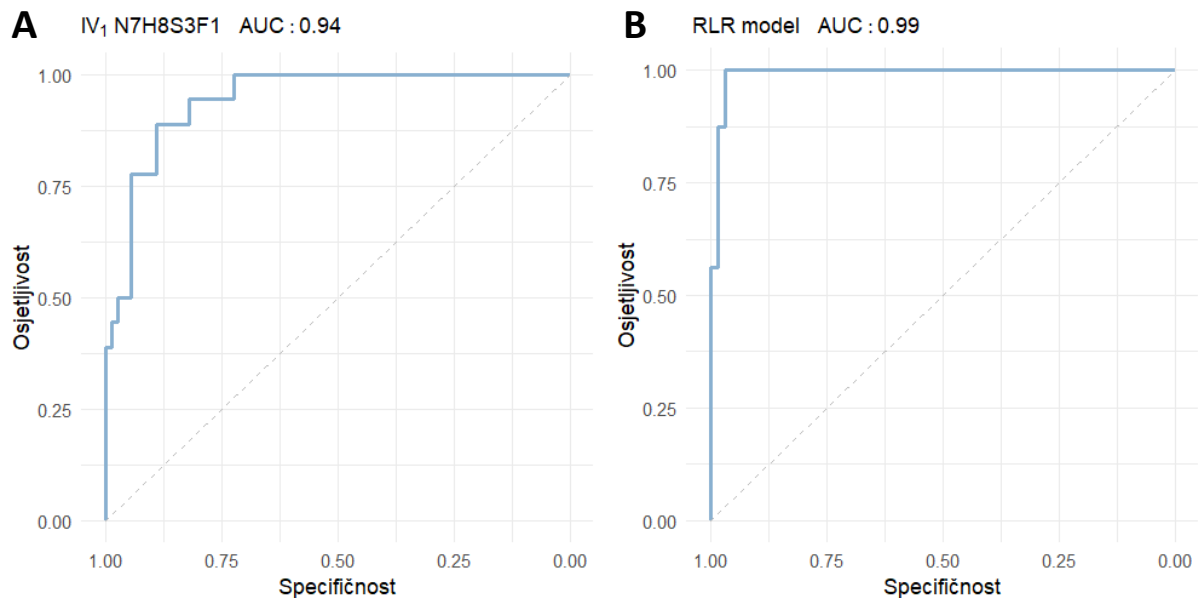
V ₁	N8H9S4F1	0,178	5,91E-03	1,30E-02	0,269	1,50E-09	8,52E-09
V _{1,2}	N5H6S2F1	0,384	1,41E-03	6,63E-03	0,447	3,00E-08	7,85E-08
V _{1,2}	N5H6S3F1	0,235	1,99E-03	6,77E-03	0,267	1,34E-07	2,68E-07
V _{1,2}	N6H7S3F1	0,163	1,80E-01	1,98E-01	0,321	6,30E-05	6,90E-05
V _{1,2}	N6H7S4F1	0,216	4,74E-02	5,97E-02	0,376	2,93E-07	5,25E-07
V _{1,2}	N6H7S4F2	0,382	1,87E-02	3,19E-02	0,566	2,29E-07	4,32E-07
V _{1,2}	N7H8S4F1	0,183	2,71E-03	8,37E-03	0,264	3,64E-10	3,10E-09



Slika 11. Relativne zastupljenosti individualnih fukoziliranih glikopeptida AGP-a prikazani kutijastim dijagramima, podijeljeni prema procijenjenom fenotipskom učinku prisutnih HNF1A varijanti: oštećujuće (D), benigne (B) i bez rijetkih varijanti (N).

3.5.1. Individualni glikopeptid AGP-a kao prediktor HNF1A-MODY-a

U svrhu istraživanja klasifikacijske učinkovitosti fukoziliranih glikopeptida AGP-a u identificiranju pacijenata s oštećujućim *HNF1A* alelnim varijantama u skupini pacijenata s benignim varijantama ili bez rijetkih varijanti, provedena je analiza pomoću ROC krivulja, a učinkovitost procijenjena temeljem AUC. Pojedinačni glikopeptidi uspoređeni su na temelju uspješnosti klasifikacije pacijenata i glikopeptid IV₁ N7H8S3F1, ponovno je pokazao najbolju moć razlikovanja s AUC vrijednosti od 0,94 (95 % CI 0,90 - 0,99) (Slika 12 A). Rezultati analize ostalih glikopeptida među kojima su mnogi također pokazali velik klasifikacijski potencijal prikazani su u tablici 6.



Slika 12. Uspješnost identifikacije HNF1A-MODY pacijenata prikazana pomoću ROC krivulja i pripadajućih AUC vrijednosti. (A) Model temeljen na IV₁ N7H8S3F1 glikopeptidu. (B) Model temeljen na 16 glikopeptida odabranih pomoću regularizirane logističke regresije

Tablica 6. Klasifikacijska učinkovitost individualnih fukoziliranih glikopeptida AGP-a u identificiranju pacijenata s oštećujućim HNF1A varijantama, prikazana ROC krivuljama i odgovarajućim AUC vrijednostima s 95 % intervalom pouzdanosti (CI). Izračunati koeficijenti za izabrane glikopeptide u regulariziranom logističkom modelu također su prikazani (odsječak = 4,822).

Mjesto	Glikan	AUC	95 % CI	RLR koeficijent
I ₁	N4H5S2F1	0,864	(0,764 - 0,964)	-1,615
I ₁	N5H6S1F1	0,899	(0,804 - 0,994)	/
I ₁	N5H6S2F1	0,918	(0,833 - 1,000)	/
I ₁	N5H6S3F1	0,901	(0,824 - 0,979)	-0,264
I ₁	N6H7S2F1	0,906	(0,813 - 0,999)	-21,864
I ₁	N6H7S3F1	0,767	(0,617 - 0,917)	/
I _{1,2}	N5H6S1F1	0,782	(0,660 - 0,905)	/
I _{1,2}	N5H6S2F1	0,896	(0,823 - 0,969)	/
I _{1,2}	N5H6S3F1	0,899	(0,831 - 0,967)	-1,013
I _{1,2}	N6H7S2F1	0,537	(0,362 - 0,712)	/
I _{1,2}	N6H7S3F1	0,546	(0,358 - 0,733)	/
II _{1,2}	N4H5S2F1	0,903	(0,841 - 0,964)	-19,666
II _{1,2}	N5H6S3F1	0,904	(0,827 - 0,981)	-2,897
IV ₁	N5H6S2F1	0,904	(0,832 - 0,976)	-0,501
IV ₁	N5H6S3F1	0,904	(0,834 - 0,974)	-0,909
IV ₁	N6H7S2F1	0,862	(0,758 - 0,965)	/
IV ₁	N6H7S3F1	0,858	(0,767 - 0,949)	/
IV ₁	N6H7S4F1	0,873	(0,790 - 0,957)	/
IV ₁	N7H8S3F1	0,944	(0,898 - 0,991)	-46,535
IV ₁	N7H8S4F1	0,911	(0,848 - 0,974)	-15,594
V ₁	N5H6S3F1	0,900	(0,829 - 0,972)	-5,757
V ₁	N6H7S2F1	0,853	(0,753 - 0,952)	/
V ₁	N6H7S3F1	0,867	(0,768 - 0,965)	/
V ₁	N6H7S4F1	0,832	(0,724 - 0,940)	/
V ₁	N6H7S4F2	0,849	(0,750 - 0,948)	/
V ₁	N7H8S3F1	0,909	(0,848 - 0,969)	-18,502
V ₁	N7H8S4F1	0,891	(0,817 - 0,965)	-15,807
V ₁	N8H9S4F1	0,909	(0,839 - 0,979)	-16,259
V _{1,2}	N5H6S2F1	0,902	(0,834 - 0,970)	/
V _{1,2}	N5H6S3F1	0,892	(0,822 - 0,962)	-7,482
V _{1,2}	N6H7S3F1	0,807	(0,683 - 0,931)	/
V _{1,2}	N6H7S4F1	0,858	(0,763 - 0,953)	/
V _{1,2}	N6H7S4F2	0,896	(0,823 - 0,968)	/
V _{1,2}	N7H8S4F1	0,929	(0,878 - 0,980)	-16,180

Dijagnostički alat temeljen na analizi mnogih glikopeptida AGP-a kakva je provedena u sklopu ovog istraživanja, zahtijeva relativno kompleksnu proceduru koja uključuje obogaćivanja AGP-a iz uzoraka plazme, njegovu triptičku razgradnju, pročišćavanje glikopeptida i konačno RP-LC-ESI-MS analizu. Podjednako kompleksna obrada uzorka potrebna je i za prethodno predložen dijagnostički alat (73) temeljen na analizi ukupne N-glikozilacije proteina plazme, s

obzirom da velik broj analita doprinosi konačnom rezultatu. Obećavajuća uspješnost individualnih glikopeptida u identifikaciji HNF1A-MODY pacijenata, a posebice glikopeptida IV₁ N7H8S3F1 sugerira mogućnost kreiranja dijagnostičkog alata koji bi se temeljio na analizi samo jednog glikopeptida. Time bi se, zbog jednostavnijeg analitičkog zadatka, neki od koraka potrebnih za analizu velikog broja glikopeptida potencijalno mogli pojednostavniti ili čak izbaciti. Na taj način pojednostavljena analiza mogla bi postati lakše izvediva u kliničkoj primjeni, pritom zadržavajući ranije navedene prednosti analize na razini glikopeptida u odnosu na analizu ukupne N-glikozilacije plazme. Ovome u prilog ide i činjenica da je AUC vrijednost najučinkovitijeg glikopeptida u ovoj studiji (AUC = 0,94) bila veća od GP30, najučinkovitije glikanske skupine iz prethodne studije (AUC = 0,90) (73).

3.5.2. Višestruki glikopeptidi AGP-a kao prediktori HNF1A-MODY-a

S obzirom na dostupnost podataka o velikom broju fukoziliranih glikopeptida AGP-a, ispitana je uspješnost klasifikacije modela temeljenog na višestrukim glikopeptidima i pomoću AUC vrijednosti uspoređena s modelom temeljenim na individualnom glikopeptidu IV₁ N7H8S3F1. Za izradu prediktivnog modela korištena je regularizirana logistička regresija na podacima svih dostupnih glikopeptida AGP-a. Regularizacijom odabranih 16 glikopeptida, zajedno s pripadajućim koeficijentima unutar modela navedeni su u tablici 6. Kreirana ROC krivulja ima AUC vrijednost od 0,99 (95 % CI 0,98 – 1), pokazujući tako još bolju učinkovitost u identifikaciji HNF1A-MODY pacijenata od prethodnog modela, iako je izračunata razlika tek na rubu statističke značajnosti (p-vrijednost = 0,056) (Slika 12 B). Ovo opažanje demonstrira da je unatoč visokoj prediktivnosti IV₁ N7H8S3F1 glikopeptida, dodatna informativnost prisutna u ostatku N-glikozilacijskog profila AGP-a. Usprkos tome, ranije spomenuta kompleksnost obrade uzorka potrebna za ovu razinu analize višestrukih glikopeptida AGP-a, vjerojatno nije opravdana za kliničku primjenu.

S obzirom na potrebnu dodatnu interpretaciju rezultata sekvenciranja *HNF1A* gena, ponekad vrlo izazovnu za prethodno nekarakterizirane varijante, opisane razlike u zastupljenosti glikopeptida AGP-a između pacijenata s funkcionalnim varijantama i onih s varijantama koje uzrokuju bolest, predstavljaju prednost u dijagnostičkom procesu. Primjenom u probiru pacijenata, analiza glikopeptida AGP-a mogla bi, isključujući pacijente s funkcionalnim varijantama, smanjiti broj pacijenata upućenih na sekvenciranje *HNF1A*. Osim toga, mogla bi pomoći u procjeni fenotipskih efekata genskih varijanti nepoznatog značaja.

4. ZAKLJUČCI

Analitičkom metodom razvijenom u sklopu ovog doktorskog rada, moguće je analizirati N-glikozilaciju AGP-a, u visokoprotočnom obliku. Njome je već iz 5 μ L uzorka plaze moguća pouzdana obrada i analiza na razini glikozilacijskog mjesta, velikog broja uzoraka u kratkom vremenu.

Varijacije u N-glikomu AGP-a unutar ispitane populacije veće su od varijacija kroz vrijeme unutar pojedinih ispitanika što ukazuje na njegovu reguliranost i stabilnost. Ovaj preduvjet nužan je, kako za longitudinalno praćenje, tako i za usporedbu glikozilacije AGP-a između pacijenata.

Osobe s povišenim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 2 imaju promijenjenu N-glikozilaciju AGP-a. Kod ovih pacijenata ustanovljeno je povećanje u grananju, kao i smanjenje u sijalinizaciji glikana vezanih na AGP. Na temelju identificiranih značajno promijenjenih deriviranih karakteristika glikana, moguće je kreirati model za predviđanje povećanog rizika od razvoja šećerne bolesti tipa 2.

Usporedbom N-glikozilacije AGP-a kod pacijenata s HNF1A-MODY-jem, HNF4A-MODY-jem, šećernom bolesti tipa 1 i šećernom bolesti tipa 2, utvrđeno je smanjenje u fukozilaciji kod HNF1A-MODY pacijenata. Ova promjena karakteristična je za HNF1A-MODY tip šećerne bolesti.

Smanjenje u fukozilaciji AGP-a prisutno je samo kod oštećujućih mutacija *HNF1A* gena, dok kod benignih mutacija fukozilacija nije promijenjena. Ova povezanost fukozilacije AGP-a s funkcionalnošću *HNF1A* omogućuje upotrebu fukoziliranih glikopeptida AGP-a u procjeni fenotipskog učinka za nekarakterizirane HNF1A varijante.

Visoka učinkovitost fukoziliranih glikopeptida AGP-a u identificiranju HNF1A-MODY pacijenata iz skupine osoba oboljelih od ne autoimune šećerne bolesti ranog nastupa, potvrdila je njihov potencijal u probiru, ali i konačnoj dijagnozi ovog dijagnostički izazovnog, najučestalijeg podtipa monogeniski uzrokovane šećerne bolesti.

Mogućnost vrlo dobrog razlikovanja HNF1A-MODY pacijenata na temelju individualnih fukoziliranih glikopeptida AGP-a, posebice IV₁ N7H8S3F1, otvara prostor uvođenju jednostavnijeg analitičkog pristupa u kliničku primjenu.

5. LITERATURA

1. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY). Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017. 823 p.
2. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1473(1):4–8.
3. Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, et al. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*. 2010;20(8):959–69.
4. Carfagno DG, Hendrix JC. Overtraining syndrome in the athlete: current clinical practice. *Curr Sports Med Rep*. 2014;13(1):45–51.
5. Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation--an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst*. 2010;6(12):2373–9.
6. Freeze HH. Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet* 2006 77. 2006;7(7):537–51.
7. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(8):1574–82.
8. Lebrilla C, An H. The prospects of glycan biomarkers for the diagnosis of diseases. *Mol Biosyst*. 2009;5(1):17–20.
9. Dotz V, Lemmers RFH, Reiding KR, Hipgrave Ederveen AL, Lieveise AG, Mulder MT, et al. Plasma protein N-glycan signatures of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2018;1862(12):2613–22.
10. Keser T, Gornik I, Vučković F, Selak N, Pavić T, Lukić E, et al. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(12):2352–60.
11. Clerc F, Novokmet M, Dotz V, Reiding K, de Haan N, Kammeijer G, et al. Plasma N-Glycan Signatures Are Associated With Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2018;155(3):829–43.
12. Zhang W, Yang Z, Gao X, Wu Q. Advances in the discovery of novel biomarkers for cancer: spotlight on protein N-glycosylation. *Biomark Med*. 2020;14(11):1031–45.

13. Joenvaara S, Saraswat M, Kuusela P, Saraswat S, Agarwal R, Kaartinen J, et al. Quantitative N-glycoproteomics reveals altered glycosylation levels of various plasma proteins in bloodstream infected patients. *PLoS One*. 2018;13(3).
14. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. 2016;33(3):309–43.
15. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol*. 2018;333:65–79.
16. Schmid K, Nimberg RB, Kimura A, Yamaguchi H, Binette JP. The carbohydrate units of human plasma α 1-Acid glycoprotein. *BBA - Protein Struct*. 1977;492(2):291–302.
17. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev*. 1988;40(1).
18. Blain PG, Mucklow JC, Rawlins MD, Roberts DF, Routledge PA, Shand DG. Determinants of plasma alpha 1-acid glycoprotein (AAG) concentrations in health. *Br J Clin Pharmacol*. 1985;20(5):500.
19. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. Vol. 1482, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. *Biochim Biophys Acta*; 2000. p. 157–71.
20. Lögdberg L, Wester L. Immunocalins: A lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. Vol. 1482, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. *Biochim Biophys Acta*; 2000. p. 284–97.
21. Luo Z, Lei H, Sun Y, Liu X, Su DF. Orosomuroid, an acute response protein with multiple modulating activities. Vol. 71, *Journal of Physiology and Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers; 2015. p. 329–40.
22. Smith S, Waters N. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein. *Pharm Res*. 2018;36(2).
23. Dente L, Ciliberto G, Cortese R. Structure of the human α 1acid glycoprotein gene: Sequence homology with other human acute phase protein genes. *Nucleic Acids Res*. 1985;13(11):3941–52.
24. Schmid K. Human plasma alpha 1-acid glycoprotein--biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and polymorphism.

- Prog Clin Biol Res. 1989;300:7–22.
25. Taguchi K, Nishi K, Chuang VTG, ToruMaruyama, Otagiri M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function. In: Acute Phase Proteins. IntechOpen; 2013.
 26. Eap CB, Baumann P. The genetic polymorphism of human alpha 1-acid glycoprotein. Prog Clin Biol Res. 1989;300:111–25.
 27. Umetsu K, Yuasa I, Nishi K, Brinkmann B, Suzuki T. Orosomuroid (ORM) typing by isoelectric focusing: description of two new alleles in a German population and thermostability in bloodstains. Zeitschrift für Rechtsmedizin. 1989;102(2):171–7.
 28. Yuasa I, Umetsu K, Suenaga K, Robinet-Levy M. Orosomuroid (ORM) typing by isoelectric focusing: evidence of two structural loci ORM1 and ORM2. Hum Genet. 1986;74(2):160–1.
 29. Yuasa I, Weidinger S, Umetsu K, Suenaga K, Ishimoto G, Eap BC, et al. Orosomuroid System:17 Additional Orosomuroid Variants and Proposal for a New Nomenclature. Vox Sang. 1993;64(1):47–55.
 30. Budai L, Ozohanics O, Ludányi K, Drahos L, Kremmer T, Krenyacz J, et al. Investigation of genetic variants of alpha-1 acid glycoprotein by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2009;393(3):991–8.
 31. Yoshima, H., Matsumoto, A., Mizuochi, T., Kawasaki, T., and Kobata A. Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma α 1-acid glycoproteins. J Biol Chem. 1981;256:8476–8484.
 32. Biou D, Bauvy C, N’Guyen H, Codogno P, Durand G, Aubery M. Alterations of the glycan moiety of human alpha 1-acid glycoprotein in late-term pregnancy. Clin Chim Acta. 1991;204(1–3):1–12.
 33. Jezequel M, Seta N, Corbic M, Feger J, Durand G. Modifications of concanavalin A patterns of alpha 1-acid glycoprotein and alpha 2-HS glycoprotein in alcoholic liver disease. Clin Chim Acta. 1988;176(1):49–57.
 34. Liang J, Zhu J, Wang M, Singal AG, Odewole M, Kagan S, et al. Evaluation of AGP Fucosylation as a Marker for Hepatocellular Carcinoma of Three Different Etiologies. Sci Reports 2019 91. 2019;9(1):1–13.

35. Ferens-Sieczkowska M, Kratz E, Kossowska B, Passowicz-Muszyńska E, Jankowska R. Comparison of haptoglobin and alpha₁-acid glycoprotein glycosylation in the sera of small cell and non-small cell lung cancer patients. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:828–36.
36. Biou D, Chanton P, Konan D, Seta N, N'Guyen H, Feger J, et al. Microheterogeneity of the carbohydrate moiety of human alpha 1-acid glycoprotein in two benign liver diseases: alcoholic cirrhosis and acute hepatitis. *Clin Chim Acta.* 1989;186(1):59–66.
37. Serbource-Goguel Seta N, Durand G, Corbic M, Agneray J, Fegar J. Alterations in relative proportions of microheterogenous forms of human alpha 1-acid glycoprotein in liver disease. *J Hepatol.* 1986;2(2):245–52.
38. Wieruszkeski J, Fournet B, Konan D, Biou D, Durand G. 400-MHz ¹H-NMR spectroscopy of fucosylated tetrasialyl oligosaccharides isolated from normal and cirrhotic alpha 1-acid glycoprotein. *FEBS Lett.* 1988;238(2):390–4.
39. Van Den Heuvel M, Poland D, De Graaff C, Hoefsmit E, Postmus P, Beelen R, et al. The degree of branching of the glycans of alpha(1)-acid glycoprotein in asthma. A correlation with lung function and inflammatory parameters. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(6):1972–8.
40. Hashimoto S, Asao T, Takahashi J, Yagihashi Y, Nishimura T, Saniabadi A, et al. alpha₁-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. *Cancer.* 2004;101(12):2825–36.
41. Smith KD, Behan J, Matthews-Smith G, Magliocco AM. Alpha-1-Acid Glycoprotein (AGP) as a Potential Biomarker for Breast Cancer. In: *Glycosylation.* IntechOpen; 2012.
42. Poland D, Schalkwijk C, Stehouwer C, Koeleman C, van het Hof B, van Dijk W. Increased alpha₃-fucosylation of alpha₁-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function. *Glycoconj J.* 2001;18(3):261–8.
43. Fassbender K, Zimmerli W, Kissling R, Sobieska M, Aeschlimann A, Kellner M, et al. Glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein in relation to duration of disease in acute and chronic infection and inflammation. *Clin Chim Acta.* 1991;203(2–3):315–27.
44. Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha₁-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2007;8(1):91–108.
45. Smith K, Pollacchi A, Field M, Watson J. The heterogeneity of the glycosylation of

- alpha-1-acid glycoprotein between the sera and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Biomed Chromatogr.* 2002;16(4):261–6.
46. Elliott MA, Elliott HG, Gallagher K, McGuire J, Field M, Smith KD. Investigation into the Concanavalin A reactivity, fucosylation and oligosaccharide microheterogeneity of α 1-acid glycoprotein expressed in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;688(2):229–37.
 47. Jørgensen HG, Elliott MA, Priest R, Smith KD. Modulation of sialyl Lewis X dependent binding to E-selectin by glycoforms of α 1-acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis. *Biomed Chromatogr.* 1998;12(6):343–9.
 48. Van Dijk W, Koeleman C, Van het Hof B, Poland D, Jakobs C, Jaeken J. Increased α 3-fucosylation of α 1-acid glycoprotein in patients with congenital disorder of glycosylation type IA (CDG-Ia). *FEBS Lett.* 2001;494(3):232–5.
 49. Rydén I, Pålsson P, Lundblad A, Skogh T. Fucosylation of α 1-acid glycoprotein (orosomucoid) compared with traditional biochemical markers of inflammation in recent onset rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 2002;317(1–2):221–9.
 50. Zhang D, Huang J, Luo D, Feng X, Liu Y, Liu Y. Glycosylation change of alpha-1-acid glycoprotein as a serum biomarker for hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Biomark Med.* 2017;11(5):423–30.
 51. Balmaña M, Giménez E, Puerta A, Llop E, Figueras J, Fort E, et al. Increased α 1-3 fucosylation of α 1-acid glycoprotein (AGP) in pancreatic cancer. *J Proteomics.* 2016;132:144–54.
 52. Giménez E, Balmaña M, Figueras J, Fort E, Bolós C, Sanz-Nebot V, et al. Quantitative analysis of N-glycans from human alpha-acid-glycoprotein using stable isotope labeling and zwitterionic hydrophilic interaction capillary liquid chromatography electrospray mass spectrometry as tool for pancreatic disease diagnosis. *Anal Chim Acta.* 2015;866:59–68.
 53. Elliott MA, Jørgensen HG, Smith KD. Hypersialylation of α 1-Acid Glycoprotein in Rheumatoid Arthritis. *Pharm Pharmacol Commun.* 1998;4(11):545–7.
 54. Mandal G, Yagi H, Kato K, Chatterjee BP. Structural heterogeneity of glycoform of alpha-1 Acid glycoprotein in alcoholic cirrhosis patients. *Adv Exp Med Biol.* 2015;842:389–401.

55. Yazawa S, Takahashi R, Yokobori T, Sano R, Mogi A, Saniabadi A, et al. Fucosylated Glycans in α 1-Acid Glycoprotein for Monitoring Treatment Outcomes and Prognosis of Cancer Patients. *PLoS One*. 2016;11(6).
56. Yokobori T, Yazawa S, Asao T, Nakazawa N, Mogi A, Sano R, et al. Fucosylated α 1 - acid glycoprotein as a biomarker to predict prognosis following tumor immunotherapy of patients with lung cancer. *Sci Reports* 2019 91. 2019;9(1):1–9.
57. Lee J, Lee H, Park G, Hwang H, Jeong H, Yun K, et al. Characterization of Site-Specific N-Glycopeptide Isoforms of α -1-Acid Glycoprotein from an Interlaboratory Study Using LC-MS/MS. *J Proteome Res*. 2016;15(12):4146–64.
58. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnár-Szöllosi E, Kremmer T, et al. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2005;40(11):1472–83.
59. Qu Y, Sun L, Zhang Z, Dovichi N. Site-Specific Glycan Heterogeneity Characterization by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Solid-Phase Extraction, Reversed-Phase Liquid Chromatography Fractionation, and Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectro. *Anal Chem*. 2018;90(2):1223–33.
60. Khatri K, Staples G, Leymarie N, Leon D, Turiák L, Huang Y, et al. Confident assignment of site-specific glycosylation in complex glycoproteins in a single step. *J Proteome Res*. 2014;13(10):4347–55.
61. Higai K, Azuma Y, Aoki Y, Matsumoto K. Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1–2):117–25.
62. Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Jan 1;37(Supplement 1):S81–90.
63. World Health Organization. Diabetes [Internet]. 2021.
64. Flannick J, Johansson S, Njølstad PR. Common and rare forms of diabetes mellitus: Towards a continuum of diabetes subtypes. Vol. 12, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 394–406.
65. Anik A, Çatli G, Abaci A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): An update. Vol. 28, *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. Walter de Gruyter

- GmbH; 2015. p. 251–63.
66. Urakami T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): Current perspectives on diagnosis and treatment. Vol. 12, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2019. p. 1047–56.
 67. Sarwar N, Gao P, Kondapally Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215–22.
 68. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): How many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010;53(12):2504–8.
 69. Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT. Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet*. 2003;362(9392):1275–81.
 70. Harries LW, Ellard S, Stride A, Morgan NG, Hattersley AT, Vaxillaire M, et al. Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum Mol Genet*. 2006;15(14):2216–24.
 71. Flannick J, Beer NL, Bick AG, Agarwala V, Molnes J, Gupta N, et al. Assessing the phenotypic effects in the general population of rare variants in genes for a dominant Mendelian form of diabetes. Vol. 45, *Nature Genetics*. NIH Public Access; 2013. p. 1380–7.
 72. Lauc G, Essafi A, Huffman JE, Hayward C, Knežević A, Kattla JJ, et al. Genomics meets glycomics—the first gwas study of human N-glycome identifies HNF1A as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet*. 2010;6(12):1–14.
 73. Juszczak A, Pavić T, Vučković F, Bennett AJ, Shah N, Medvidović EP, et al. Plasma fucosylated glycans and C-reactive protein as biomarkers of HNF1A-MODY in young adult-onset nonautoimmune diabetes. *Diabetes Care*. 2019;42(1):17–26.
 74. Thanabalasingham G, Huffman JE, Kattla JJ, Novokmet M, Rudan I, Gloyn AL, et al. Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile. *Diabetes*. 2013;62(4):1329–37.

75. Viana MV, Moraes RB, Fabbrin AR, Santos MF, Gerchman F. Assessment and treatment of hyperglycemia in critically ill patients. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2014;26(1):71.
76. Gornik I, Vujaklija A, Lukić E, Madžarac G, Gašparović V. Hyperglycemia in sepsis is a risk factor for development of type II diabetes. *J Crit Care*. 2010;25(2):263–9.
77. Gornik I, Vujaklija A, Lukić E, Madžarac G, Gašparović V. Hyperglycaemia in critical illness is a risk factor for later development of type II diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2010;47 Suppl 1.
78. Mariño K, Bones J, Kattla J, Rudd P. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol*. 2010;6(10):713–23.
79. Ruhaak L, Xu G, Li Q, Goonatileke E, Lebrilla C. Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. *Chem Rev*. 2018;118(17):7886–930.
80. Unione L, Lenza M, Ardá A, Urquiza P, Laín A, Falcón-Pérez J, et al. Glycoprofile Analysis of an Intact Glycoprotein As Inferred by NMR Spectroscopy. *ACS Cent Sci*. 2019;5(9):1554–61.
81. Norris GE, Stillman TJ, Anderson BF, Baker EN. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure*. 1994;2(11):1049–59.
82. Keser T, Pavić T, Lauc G, Gornik O. Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and Rapi Fluor-MS as Derivatizing Agents for High-Throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan Analysis. *Front Chem*. 2018;
83. Oliveira T, Thaysen-Andersen M, Packer N, Kolarich D. The Hitchhiker's guide to glycoproteomics. *Biochem Soc Trans*. 2021;
84. Rodriguez J, Gupta N, Smith R, Pevzner P. Does trypsin cut before proline? *J Proteome Res*. 2008;7(1):300–5.
85. Tsiatsiani L, Heck AJR. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J*. 2015;282(14):2612–26.
86. Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM. GlycoWorkbench: A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans†. *J Proteome Res*. 2008;7(4):1650–9.
87. Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod-a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics*. 2001;1(2):340-9.

88. Ács A, Ozohanics O, Vékey K, Drahos L, Turiák L. Distinguishing Core and Antenna Fucosylated Glycopeptides Based on Low-Energy Tandem Mass Spectra. *Anal Chem.* 2018;90(21):12776–82.
89. Hellerstein MK, Sasak V, Ordovas J, Munro HN. Isolation of alpha 1-acid glycoprotein from human plasma using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1985;146(2):366–71.
90. Hinneburg H, Stavenhagen K, Schweiger-Hufnagel U, Pengelley S, Jabs W, Seeberger PH, et al. The Art of Destruction: Optimizing Collision Energies in Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF) Instruments for Glycopeptide-Based Glycoproteomics. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27(3):507–19.
91. Jansen BC, Falck D, De Haan N, Hipgrave Ederveen AL, Razdorov G, Lauc G, et al. LaCyTools: A Targeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Data Processing Package for Relative Quantitation of Glycopeptides. *J Proteome Res.* 2016;15(7):2198–210.
92. Keser T, Tijardović M, Gornik I, Lukić E, Lauc G, Gornik O, et al. 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.
93. Weisman S, Goldsmith B, Winzler R, Lepper MH. Turnover of plasma orosomucoid in man. *J Lab Clin Med.* 1961;57(1):7–15.
94. Brée F, Houin G, Barré J, Moretti JL, Wirquin V, Tillement JP. Pharmacokinetics of Intravenously Administered 125I-Labelled Human α 1-Acid Glycoprotein. *Clin Pharmacokinet.* 1986;11(4):336–42.
95. Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology.* 2009;19(12):1547–53.
96. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, –Durić Ž, Keser T, Rajšl K, et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep.* 2015;4(1):4347.
97. Miyahara K, Nouse K, Saito S, Hiraoka S, Harada K, Takahashi S, et al. Serum Glycan Markers for Evaluation of Disease Activity and Prediction of Clinical Course in Patients with Ulcerative Colitis. *PLoS One.* 2013;8(10):e74861.
98. Sarrats A, Saldova R, Pla E, Fort E, Harvey DJ, Struwe WB, et al. Glycosylation of liver

-
- acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *PROTEOMICS – Clin Appl.* 2010;4(4):432–48.
99. Pawłowski T, Mackiewicz A, Mackiewicz S. Studies on microheterogeneity of acute-phase proteins in rheumatoid arthritis by using crossed affinoimmuno-electrophoresis with free concanavalin A. *Behring Inst Mitt.* 1986;(80):11–5.
100. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9468):1415–28.
101. Sun Y, Yang Y, Qin Z, Cai J, Guo X, Tang Y, et al. The Acute-Phase Protein Orosomucoid Regulates Food Intake and Energy Homeostasis via Leptin Receptor Signaling Pathway. *Diabetes.* 2016;65(6):1630–41.
102. Alquoqa RS, Kasabri V, Naffa R, Akour A, Bustanji Y. Cross-sectional correlates of myeloperoxidase and alpha-1-acid glycoprotein with adiposity, atherogenic and hematological indices in metabolic syndrome patients with or without diabetes: <https://doi.org/101177/2042018818779742>. 2018;9(9):283–91.
103. Akbay E, Yetkin I, Ersoy R, Kulaksizoğlu S, Törüner F, Arslan M. The relationship between levels of alpha-1-acid glycoprotein and metabolic parameters of diabetes mellitus. *Diabetes Nutr Metab.* 2004;17(6):331–5.
104. Lee YS, Choi JW, Hwang I, Lee JHJW, Lee JHJW, Kim AY, et al. Adipocytokine Orosomucoid Integrates Inflammatory and Metabolic Signals to Preserve Energy Homeostasis by Resolving Immoderate Inflammation. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22174–85.
105. Eeckhoutte J, Formstecher P, Laine B. Hepatocyte nuclear factor 4 α enhances the hepatocyte nuclear factor 1 α -mediated activation of transcription. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(8):2586–93.

ŽIVOTOPIS

Marko Tijardović rođen je u Osijeku 6. lipnja 1991. godine, gdje je završio osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Nakon mature upisuje studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovao je na različitim studentskim simpozijima i natjecanjima te pomagao u sklopu organizacijskih odbora kako studentskih tako i stručnih simpozija. Dobitnik je Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016. za znanstveni rad pod nazivom „Određivanje niskih koncentracija etanola (< 0,5 g/L) u slini, serumu i urinu nakon konzumacije alkoholnih pića“, kojeg je iste akademske godine usmeno prezentirao na 5. Simpoziju studenata farmacije i medicinske biokemije. U lipnju 2017. godine stječe titulu magistra medicinske biokemije. Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

Od veljače 2018. godine zaposlen je kao asistent na projektu Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Objavio je tri znanstvena rada, održao dva usmena priopćenja na međunarodnim kongresima kao i više posterskih priopćenja na domaćim i međunarodnim kongresima.

Znanstveni radovi (CC):

1. **Tijardović, Marko**; Marijančević, Domagoj; Bok, Daniel; Kifer, Domagoj; Lauc, Gordan; Gornik, Olga; Keser, Toma
Intense physical exercise induces an anti- inflammatory change in IgG N-glycosylation profile. // *Frontiers in Physiology*, 10 (2019), 1522, 10 doi:10.3389/fphys.2019.01522
2. Cvetko, Ana; Mangino, Massimo; **Tijardović, Marko**; Kifer, Domagoj; Falchi, Mario; Keser, Toma; Perola, Markus; Spector, Tim D; Lauc, Gordan; Menni, Cristina; Gornik, Olga
Plasma N-glycome shows continuous deterioration as the diagnosis of insulin resistance approaches. // *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 9 (2021), 1; /-/ doi:10.1136/bmjdr-2021-002263
3. Keser, Toma; **Tijardović, Marko**; Gornik, Ivan; Lukić, Edita; Lauc, Gordan; Gornik, Olga; Novokmet, Mislav
High-Throughput and Site-Specific N-Glycosylation Analysis of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein Offers a Great Potential for New Biomarker Discovery. // *Molecular & Cellular Proteomics*, 20 (2021), 100044, 15 doi:10.1074/mcp.ra120.00243

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Doktorski rad

VISOKOPROTOČNA ANALIZA N-GLIKOZILACIJE ALFA-1-KISELOGA GLIKOPROTEINA U IDENTIFIKACIJI BILJEGA ŠEĆERNE BOLESTI

Marko Tijardović

SAŽETAK

N-glikozilacija, proces enzimski posredovanog vezanja šećernih struktura na asparaginske ostatke proteina, istraživana je u brojnim bolestima, u mnogima od kojih su promjene i potvrđene. Pronalazak specifičnih promjena N-glikozilacije nudi mogućnost razvoja predikcijskih, dijagnostičkih i prognostičkih alata potrebnih u sprječavanju i liječenju različitih bolesti. Studije ukupne N-glikozilacije proteina plazme provedene u istraživanju predispozicije za šećernu bolest tipa 2, kao i istraživanju šećerne bolesti zrele dobi kod mladih osoba (MODY), identificirale su promjene u glikozilaciji za koje se vjeruje da potječu s alfa-1-kiselega glikoproteina (AGP). S ciljem detaljnijeg istraživanja ovih promjena, razvijena je metoda za visokoprotoknu analizu N-glikozilacije AGP-a koja uključuje obogaćenje ovog proteina te analizu njegovih glikopeptida metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (LC-MS). Inicijalnom analizom 14 zdravih ispitanika utvrđena je temporalna stabilnost N-glikoma AGP-a, kao općeniti preduvjet za dijagnostičku upotrebu. Novorazvijenom metodom zatim je analizirana glikozilacija AGP-a 108 ispitanika koji se razlikuju po svojoj predispoziciji za razvoj šećerne bolesti tipa 2 te je utvrđena povezanost porasta grananja i smanjenja sijalinizacije glikana AGP-a s povećanim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 2. Nadalje, kod 466 pacijenata oboljelih od različitih tipova šećerne bolesti (HNF1A-, HNF4A-MODY, šećerna bolest tipa 1 i tipa 2) analizom fukozilacije AGP-a ustanovljeno je njezino smanjenje koje je pokazano specifično za HNF1A-MODY. Nadalje, analizom uzoraka 98 pacijenata oboljelih od šećerne bolesti ranog nastupa bez autoimunosti podloge, pokazano je da je smanjena fukozilacija prisutna samo kod pacijenata s oštećujućim HNF1A mutacijama – sržnim uzrokom bolesti. Također, pokazana je visoka uspješnost identifikacije HNF1A-MODY pacijenata na temelju individualnih glikopeptida AGP-a. Prikupljene spoznaje upućuju na mogućnost upotrebe glikozilacije AGP-a kao predikcijskog biljega za šećernu bolest tipa 2, kao i biljega identifikacije pacijenata oboljelih od HNF1A-MODY-a što bi dalo velik doprinos pravovremenom prepoznavanju rizika kao i diferencijalnoj dijagnostici šećerne bolesti.

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

Rad sadrži: 69 stranica, 12 slika, 6 tablica i 105 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikozilacija, alfa-1-kiseli glikoprotein, šećerna bolest, tekućinska kromatografija, spektrometrija masa

Mentor: **dr. sc. Olga Gornik Kljaić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **dr. sc. Roberta Petlevski**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
dr. sc. Gordan Lauc, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
dr. sc. Diana Muačević-Katanec, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 15. prosinca 2021.

Basic documentation card

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

Doctoral thesis

HIGH-THROUGHPUT N-GLYCOSYLATION ANALYSIS OF ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN IN THE IDENTIFICATION OF DIABETES MELLITUS BIOMARKERS

Marko Tijardović

SUMMARY

N-glycosylation, the process of enzymatically mediated binding of sugar structures to proteins' asparagine residues, has been investigated in a number of diseases, in many of which the changes have been confirmed. The discovery of specific N-glycosylation changes offers a possibility for development of prediction, diagnostic and prognostic tools needed in the prevention and treatment of various diseases. Studies of total plasma protein N-glycosylation performed in type 2 diabetes predisposition research, as well as in the research of maturity-onset diabetes of the young (MODY), identified changes in glycosylation believed to originate from alpha-1-acid glycoprotein (AGP). In order to investigate these changes in more detail, a method for high-throughput AGP N-glycosylation analysis was developed. The method is based on enrichment of AGP and analysis of its glycopeptides by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Initial analysis performed on 14 healthy subjects confirmed the temporal stability of AGP N-glycome, as a general prerequisite for diagnostic use. The newly developed method was then used to analyze AGP glycosylation in 108 subjects differing in their predisposition for type 2 diabetes development. The results confirmed an association of increased branching and decreased sialylation of AGP glycans with an increased risk of type 2 diabetes development. Analysis of samples from 466 patients diagnosed with different types of diabetes (HNF1A-, HNF4A-MODY, type 1 and type 2 diabetes) revealed a reduction in AGP fucosylation, which was shown to be specific for HNF1A-MODY. Furthermore, analysis of samples from 98 patients with early-onset non-autoimmune diabetes showed that decreased fucosylation was present only in patients carrying damaging HNF1A mutations - the core cause of the disease. Also, high success rate of identification of HNF1A-MODY patients based on individual AGP glycopeptides was demonstrated. The findings suggest the possibility of utilizing AGP glycosylation as a predictor of type 2 diabetes, as well as a marker for identification of HNF1A-MODY patients. This would present a valuable contribution to timely risk identification and differential diagnosis of diabetes.

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

Thesis includes: 69 pages, 12 figures, 6 tables and 105 references. The original is in Croatian language.

Keywords: N-glycosylation, alpha-1-acid glycoprotein, diabetes, liquid chromatography, mass spectrometry

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

Reviewers: **Robert Petlevski, PhD.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Gordan Lauc, PhD. *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Diana Muačević-Katanec, PhD. *Full Professor, University of Zagreb School of Medicine*

The thesis was accepted: 15th December 2021.