

Glikozilacija haptoglobina u kolorektalnom karcinomu

Šimunović, Jelena

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:600648>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Jelena Šimunović

GLIKOZILACIJA HAPTOGLOBINA U KOLOREKTALNOM KARCINOMU

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Jelena Šimunović

GLIKOZILACIJA HAPTOGLOBINA U KOLOREKTALNOM KARCINOMU

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Gordan Lauc

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Jelena Šimunović

HAPTOGLOBIN GLYCOSYLATION IN COLORECTAL CANCER

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Prof. Gordan Lauc, PhD

Zagreb, 2024

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. Gordana Lauca, u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. u suradnji s Centrom za proteomiku i metabolomiku u Nizozemskoj (Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center) u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Rad je financiran projektom Obzor 2020 „GlyCoCan – Exploiting Glycosylation of Colorectal Cancer for the Development of Improved Diagnostics and Therapeutics” (grant no. 676421).

ZAHVALE

Nakon dugog putovanja zvanog doktorat, mogu reći kako mi je drago da sam imala tu priliku, jer me izgradila i obogatila kao osobu, naučila novim vještinama i znanjima, i donijela mnoge nove i divne ljude u moj život koji su mi u svemu tome pomogli.

Prvenstveno, hvala prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić i doc. dr. sc. Tomi Keseru koji su me uveli u svijet glikobiologije i pomogli da u tom svijetu ostanem. Hvala mentoru prof. dr. sc. Gordanu Lauču na pruženoj prilici da budem dio tima Genosa, napravim tu doktorat i napredujem profesionalno. Hvala Mariji Pezer i Ireni koje su mi svojim smjernicama, savjetima i znanjem pomogle u realizaciji toga.

Many thanks to prof. Manfred Wuhrer for support and guidance during my stay in his group at LUMC, and also to his whole team. Special thanks to my supervisors there, Kathrin and Vika. Kathrin, thank you for everything you taught me about mass spectrometry and glycopeptides data analysis. Vika, thank you for all scripts and knowledge you shared with me, but much more for warm welcome and accommodation in Leiden.

Greatest thanks to my GlyCoCan family: Marti, Ines, James, Max, Kate, Giuli, Thanos, Fanny, Robi, Ana, Valeria and Hyun Il. I am so happy and grateful I was part of this project together with you. You made me grow as a person and as a scientist. "Once a GlyCoCan, always a GlyCoCan.")

Veliko hvala svim kolegama u Genosu, a posebno prijateljima koje sam tu stekla. Svima koji su ili su bili dio najzabavnijeg i najglasnijeg ureda: Ani, Heleni, Maji, Mariji, Martini, Natali i Tei na inspirativnim diskusijama, svakodnevnim pjesmama, druženjima i velikoj podršci. Također hvala puno Azri F-H. i Dijani. Hvala Olgi na znanju iz statistike koje je podijelila sa mnom, ali i planinarskim rutama oko Zagreba. Veliko hvala Mislavu, Ivanu i Maji na čitanju doktorata i velikoj podršci.

Puno hvala cijeloj mojoj porodici na ogromnoj vjeri koju imaju u mene. Hvala mojim prijateljima koji su me uvijek podržavali. Azra, Darija, Lejla A., Lejla K., Sonja, hvala što ste tu.

Najviše hvala mojim roditeljima na nesebičnoj ljubavi, neizmjernoj podršci i čvrstom osloncu. Mama, hvala ti što si me uvijek gurala naprijed i vjerovala da ja to mogu. Tata, hvala ti što si svojim šalama učinio da se sve čini lakše.

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom drugi je uzročnik smrti među karcinomima, kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj. Najčešće se javlja sporadično, ali može imati i nasljednu komponentu. Razvoj novih, specifičnijih, učinkovitijih i manje invazivnih metoda za otkrivanje kolorektalnog karcinoma, unaprijedilo bi dijagnostičke i prognostičke mogućnosti u kliničkoj praksi. Prethodna istraživanja pokazala su promjene u N-glikozilaciji proteina plazme u kolorektalnom karcinomu. Jedan od potencijalnih nositelja tih promjena je haptoglobin, protein akutne faze, koji ima četiri glikozilacijska mjesta u svojoj strukturi. Cilj ovog doktorskog rada bio je razviti analitičke metode za analizu glikozilacije haptoglobina iz seruma ili plazme velikog broja uzoraka na razini glikopeptida i ukupnih N-glikana. Primarno istraživanje napravljeno je na 185 uzoraka seruma ispitanika s kolorektalnim karcinomom i 185 kontrola prikupljenih u biobanci LUMC (engl. *Leiden University Medical Center*) u Nizozemskoj. Analiza je napravljena specifično za svako glikozilacijsko mjesto upotrebom spregnutog sustava tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa. Validacijsko istraživanje provedeno je na 224 uzorka plazme ispitanika s kolorektalnim karcinomom i 269 kontrola. Ovi uzorci prikupljeni su u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu u Hrvatskoj. Ukupni N-glikom haptoglobina analiziran je na uzorcima validacijskog istraživanja metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti s fluorescentnom detekcijom. Primjenom metode logističke regresije ispitana je značajnost povezanosti promjena u glikozilaciji haptoglobina i stanja kolorektalnog karcinoma. Statistički značajne promjene uočene su u povećanoj razini manje razgranatih glikanskih struktura, ukupnoj fukozilaciji i sijalinizaciji na razini određenih glikozilacijskih mjesta i ukupnih N-glikana. Iako su navedene promjene specifične za glikozilacijsko mjesto, rezultati primarnog istraživanja potvrđeni su i u validacijskom istraživanju. Promjene u fukozilaciji i sijalinizaciji oslikavaju promjene prethodno objavljene na ukupnim proteinima plazme.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, haptoglobin, N-glikozilacija, tekućinska kromatografija, spektrometrija masa

SUMMARY

Introduction: Colorectal cancer is the second leading cause of cancer-related deaths both worldwide and in Croatia. It most commonly develops through the transformation of an adenomatous polyp, a process that takes approximately 10 years to progress into cancer. The diagnosis is performed through histopathological analysis of colon tissue following a colonoscopy. Currently, carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) are used as serum tumor markers for colorectal cancer. There is a need for new, more effective, specific, and less invasive procedures to enhance diagnostics and prognostics, especially if they enable the detection of cancer in the early stages of the disease.

Increased concentration of acute-phase proteins, along with alterations in protein plasma glycosylation, a common co- and post-translational modification, were previously described as characteristics of colorectal cancer. Haptoglobin is an acute phase plasma glycoprotein, mainly synthesized in hepatocytes. During synthesis in hepatocytes, two chains, the light α and heavy β chain, are formed and connected via disulfide bonds. The haptoglobin structure includes two α chain variants, leading to the distinction of three phenotypes: Hp 1-1, Hp 2-1 and Hp 2-2. On the other hand, the β chain is the only glycosylated chain in haptoglobin and has four N-glycosylation sites: Asn 184, Asn 207, Asn 211 and Asn 241.

Protein glycosylation analysis can be performed at the level of whole proteins, glycopeptides or glycans. Various methodologies are available for studying site-specific protein glycosylation or glycans enzymatically cleaved from proteins. Here, we developed and applied high-throughput methods to explore haptoglobin glycosylation in colorectal cancer, aiming to address whether haptoglobin is one of the carriers of changes in plasma glycosylation in colorectal cancer.

Material and Methods: In this thesis, we developed a high-throughput method for site-specific analysis of haptoglobin glycosylation using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Haptoglobin was isolated from serum using *Capture Select Haptoglobin Affinity Resin*. Subsequently, it underwent reduction with dithiothreitol and alkylation with iodoacetamide followed by digestion with trypsin. Tryptic glycopeptides were separated into three clusters employing gradient analysis and detected on mass spectrometer in the range between 550 m/z and 1800 m/z.

Additionally, a method for haptoglobin N-glycome analysis using ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection (UHPLC-FLR) was established. Briefly, haptoglobin was enriched using a monolithic plate immobilized with anti-haptoglobin. The isolated protein was denatured at 60 °C for 10 minutes with sodium dodecyl sulfate and after that another detergent, Igepal CA-630 was added. N-glycans were enzymatically released by PNGaseF, followed by labeling with procainamide through a reductive amination reaction and subsequently separated into 28 chromatographic peaks using UHPLC-FLR.

Both methods were optimized for application in a 96-well format. Method for site specific analysis was applied to the discovery cohort, consisting of 370 participants, 185 colorectal cancer patients and 185 controls. Samples were obtained from the biobank Leiden University Medical Center in the Netherlands. Furthermore, haptoglobin N-glycome analysis using UHPLC-FLR was performed on samples from the validation cohort. The validation included 224 plasma samples from colorectal cancer patients and 269 controls collected at the Sestre milosrdnice University Hospital Center in Zagreb, Croatia.

The abundance of glycopeptides within the glycosylation sites and individual chromatographic peaks were relatively quantified. Glycopeptides per glycosylation site and individual chromatographic peaks were grouped into derived traits based on their structural similarities. Logistic regression was used to test for associations of glycopeptide and labeled N-glycan features with case-control status. Statistical analysis was also performed on derived traits.

Results: Analysis of serum and plasma samples of participants from both cohorts by using orthogonal analytical methods was additional confirmation that the biological effects measured in the study originate from differences between colorectal cancer patients and controls and not from potential technical effects of the method.

The discovery cohort showed some changes specific for each glycosylation site. Fucosylation within diantennary and triantennary sialylated glycans at Asn 184 was significantly elevated in CRC patients groups compared to controls, while fucosylation within diantennary sialylated glycans on Asn 241 had opposite direction. Analysis of haptoglobin N-glycome reflected significant change in fucosylation of triantennary sialylated glycans observed at Asn 184. Furthermore, total fucosylation of haptoglobin N-glycans was also significantly increased.

Increased levels in sialylated triantennary glycans were significant at Asn 184 and Asn 241 in colorectal cancer and these findings were replicated in the validation cohort at the level of

haptoglobin N-glycome. Besides that, elevation in low branched glycans observed on Asn 241 were also confirmed in haptoglobin N-glycome analysis.

Conclusions: The development of analytical methods through this study enables efficient and rapid immunoaffinity isolation and enrichment of haptoglobin from plasma or serum, followed by site-specific glycosylation analysis and at the level of total haptoglobin N-glycome using LC-MS and UHPLC-FLR techniques, respectively. These developed methods can be applied in large scale to study different pathological condition or in population studies.

In this study, observed changes in haptoglobin glycosylation in colorectal cancer were an increase in low branched glycans, fucosylation and sialylation. The majority of changes observed in the discovery cohort were replicated in the validation cohort. Increases in fucosylation and sialylation reflects changes reported previously in total plasma and serum N-glycome.

Keywords: colorectal cancer, haptoglobin, N-glycosylation, liquid chromatography, mass spectrometry

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kolorektalni karcinom.....	2
1.2. Haptoglobin.....	3
1.2.1. Fenotipovi haptoglobina	4
1.2.2. Struktura haptoglobina.....	4
1.2.3. Funkcija haptoglobina.....	5
1.3. Glikozilacija proteina	6
1.3.1. N-glikozilacija.....	7
1.3.2. Biosinteza N-vezanih glikana	8
1.3.3. Glikozilacija haptoglobina	10
1.4. Glikozilacija u kolorektalnom karcinomu.....	10
1.5. Analiza N-glikozilacije proteina	10
1.6. Obrazloženje teme.....	12
2. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE	13
2.1. ISPITANICI	14
2.1.1. Primarno istraživanje	14
2.1.2. Validacijsko istraživanje	15
2.2. MATERIJALI.....	15
2.2.1. Standardne kemikalije.....	15
2.2.2. Enzimi i standardi	16
2.2.3. Pločice i filter pločice	16
2.2.4. Instrumenti	17
2.2.5. Računalni programi i alati.....	17
2.3. ANALIZA N-GLIKOPEPTIDA HAPTOGLOBINA	17

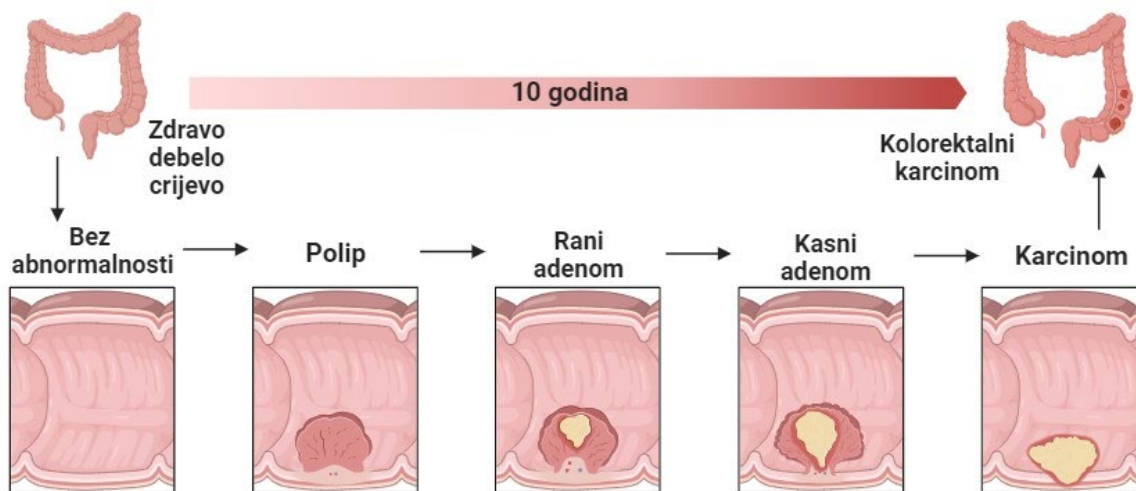
2.3.1.	Izolacija haptoglobina iz krvne plazme ili seruma	17
2.3.2.	Metode denaturacije i proteolize.....	18
2.3.3.	LC-MS analiza N-glikopeptida haptoglobina.....	18
2.3.4.	Optimizacija metode analize N-glikopeptida haptoglobina.....	19
2.3.5.	Anotacija N-glikopeptida haptoglobina.....	19
2.3.6.	Ekstrakcija i obrada glikoproteomskih podataka.....	20
2.4.	ANALIZA UKUPNIH N-GLIKANA HAPTOGLOBINA.....	21
2.4.1.	Obogaćivanje haptoglobina iz krvne plazme ili seruma.....	21
2.4.2.	Metode denaturacije, deglikozilacije i obilježavanja glikana.....	22
2.4.3.	Analiza fluorescentno obilježenih glikana tekućinskom kromatografijom	22
2.4.4.	Optimizacija metode analize ukupnih N-glikana haptoglobina.....	23
2.4.5.	Anotacija N-glikana haptoglobina	24
2.5.	PONOVLJIVOST I OBNOVLJIVOST METODA.....	25
2.6.	STATISTIČKE METODE.....	25
3.	REZULTATI I RASPRAVA	27
3.1.	Razvoj metode za analizu pojedinog glikozilacijskog mjesta haptoglobina spregnutim sustavom tekućinska kromatografija – spektrometrija masa	28
3.1.1.	Optimizacija izolacije	28
3.1.2.	Optimizacija proteolize.....	30
3.1.3.	N-glikoprofiliranje haptoglobina	33
3.1.4.	Ponovljivost i obnovljivost metode	38
3.2.	Razvoj metode za analizu ukupnih N-glikana haptoglobina tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti	39
3.2.1.	Optimizacija obogaćivanja.....	39
3.2.2.	Optimizacija denaturacije, deglikozilacije i obilježavanja	40
3.2.3.	Anotacija N-glikoma haptoglobina.....	44

3.2.4.	Ponovljivost i obnovljivost metode	47
3.3.	Analiza glikozilacije haptoglobina u kolorektalnom karcinomu	48
3.3.1.	Primarno istraživanje	48
3.3.2.	Validacijsko istraživanje	51
3.3.3.	Usporedba rezultata primarnog i validacijskog istraživanja.....	52
3.3.4.	Analiza postoperativnih uzoraka.....	56
3.3.5.	Glikozilacija haptoglobina u kolorektalnom karcinomu.....	58
4.	ZAKLJUČCI.....	60
5.	POPIS LITERATURE	63
6.	ŽIVOTOPIS AUTORA.....	73

1. UVOD

1.1. Kolorektalni karcinom

Prema podacima iz 2020., kolorektalni karcinom drugi je uzročnik smrti među karcinomima u svijetu, a samo u toj godini dijagnosticirano je oko dva milijuna novih slučajeva, što ga čini drugim najučestalijim oblikom karcinoma kod žena, odmah nakon karcinoma dojke, dok se kod muškaraca nalazi na trećem mjestu nakon karcinoma pluća i prostate (1). Ovi statistički podatci odražavaju se slično i u hrvatskoj populaciji, gdje je kolorektalni karcinom također na drugom mjestu po smrtnosti, a na trećem mjestu po broju novih slučajeva godišnje (2). Kolorektalni karcinom najčešće nastaje transformacijom adenomatoznog polipa kojem je potrebno približno 10 godina da se razvije u karcinom (Slika 1) (3). U 80 % slučajeva je sporadičan, a u 20 % ima nasljednu komponentu (4), poput obiteljske adenomatozne polipoze ili nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (5). Uz to, pacijenti s Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom imaju povećan rizik razvoja ovog karcinoma (6).



Slika 1. Razvoj kolorektalnog karcinoma. Kreirano s [biorender.com](https://www.biorender.com)

Lokalizacija adenoma, a poslije i karcinoma, može biti cijelom dužinom debelog crijeva od uzlaznog dijela kolona, preko poprečnog, silaznog i sigmoidnog dijela do rektuma i analnog kanala, kao i slijepog crijeva s crvuljkom (7). Mnogi polipi mogu se pronaći i otkloniti redovitim praćenjem prije nego nastane karcinom. Preventivni pregledi i programi svakako doprinose otkrivanju još uvijek nediferenciranog karcinoma kojeg je moguće uspješnije tretirati i izliječiti (5). Prema Američkom društvu za karcinom, već nakon 45 godina starosti poželjno je krenuti s probirnim testovima i preventivnim pregledima (8).

Dijagnoza se provodi histopatološkom analizom tkiva debelog crijeva nakon kolonoskopije. Ova dijagnostička metoda veoma je invazivna i nelagodna za pacijenta. Osim kolonoskopije, metode probiranja i dijagnostike koje se trenutno koriste su i test krvi u stolici, kompjuterska tomografija te fleksibilna sigmoidoskopija. Također, trenutačno su u upotrebi karcinoembrionalni antigen (CEA) i karbohidratni antigen 19-9 (CA 19-9) kao serumski tumorski biljezi kolorektalnog karcinoma. Svi navedeni testovi ili su invazivni poput kolonoskopije ili nisu dovoljno specifični, tako da postoji potreba za novim, učinkovitijim, specifičnijim i manje invazivnim biljezima koji će unaprijediti dijagnostičke i prognostičke mogućnosti, pogotovo ako omogućće otkrivanje karcinoma u ranom stadiju bolesti (5,9,10).

Različiti stadiji ove bolesti opisani su ovisno o slojevima tkiva koje je karcinom zahvatio. Prema AJCC (engl. *American Joint Committee on Cancer*) klasifikaciji, nulti ili početni stadij karcinoma opisuje stanje kada je zahvaćena samo sluznica (lat. *tunica mucosa*). Rastom karcinoma i u podsluznicu (lat. *tunica submucosa*), ili čak u mišićni sloj (lat. *tunica muscularis*), označava prvi stadij. Drugi stadij karakterizira rast karcinoma kroz sve slojeve zida debelog crijeva, sluznicu, mišićni sloj, kao i seroznu ovojniju (lat. *tunica serosa*) uz mogućće prodiranje u okolno tkivo i organe. U trećem stadiju metastazama su zahvaćeni limfni čvorovi, ali bez udaljenih metastaza. Pojava metastaza u udaljenim organima karakterizira četvrti stadij (11). Viši stadiji nose sa sobom i lošiju prognozu, kao i drugačiji terapijski pristup, koji je također ovisan o molekularnim karakteristikama karcinoma. Tako npr. karcinomi koji ekspimiraju receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) imaju lošiju prognozu i terapija podrazumijeva primjenu inhibitora ovog faktora rasta (12,13).

1.2. Haptoglobin

Karcinom uglavnom karakterizira povećana koncentracija proteina akutne faze. Jedan od proteina akutne faze koji pripada i frakciji alfa-2-globulina je haptoglobin (14).

Haptoglobin je glikoprotein koji se sintetizira u hepatocitima, a ekspimiran je u slezeni, bubrezima, koži, plućima i masnom tkivu, dok se ne ekspimirira u zdravom tkivu kolona (15,16). Sintezu haptoglobina u hepatocitima potiču citokini poput interleukina 1 i 6 (IL-1, IL-6) te faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF). Također, haptoglobin je, osim u krvi, prisutan i u urinu, sinovijalnoj, pleuralnoj i cerebrospinalnoj tekućini te ascitesu. Poluživot haptoglobina u

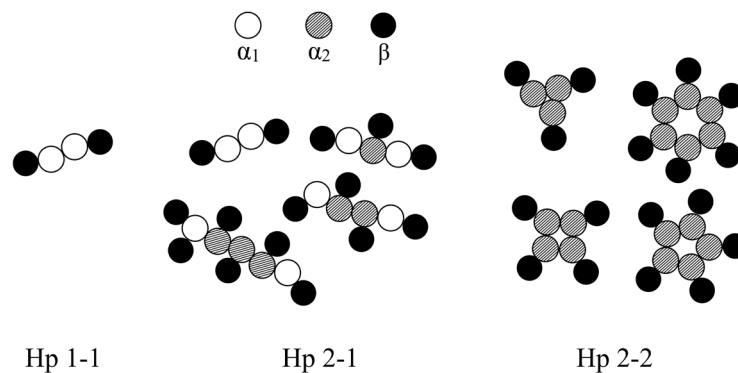
serumu i plazmi je nešto više od pet dana. Raspon koncentracija haptoglobina u serumu odraslih je između 0,3 do 2 mg/mL, dok novorođenčad doseže tu koncentraciju u prvih šest mjeseci života. Razina haptoglobina u serumu i plazmi povećana je u stanjima poput upala, trauma i opekotina, te kako je prethodno navedeno, u karcinomima. S druge strane, snižene razine opisane su pri pothranjenosti, eritropoezi, u poremećajima jetre, kao i u kasnoj trudnoći, te hemolizi, za što je istraživao kao biljeg (17–19).

1.2.1. Fenotipovi haptoglobina

Gen za haptoglobin nalazi se na kromosomu 16q22 i okarakteriziran je trima strukturnim alelima: Hp1F i Hp1S, dok njihovom fuzijom nastaje Hp2 alel. Razlike u alelima nastaju kao rezultat duplikacije egzona 3 i 4 pa Hp1 alel ima 5, a Hp2 7 egzona. Iako je haptoglobin prisutan u svim sisavcima, polimorfizmi su pronađeni samo kod ljudi. Opisana su tri fenotipa haptoglobina Hp 1-1, Hp 2-2 i Hp 2-1 koja, se razlikuju po svojoj strukturi i funkciji. Distribucija fenotipova razlikuje se kroz populacije. U Europskoj populaciji najzastupljeniji fenotip je Hp 2-1 (48 %), a slijede ga Hp 2-2 (36 %) i Hp 1-1 (16 %) (17,18,20).

1.2.2. Struktura haptoglobina

Primarnu strukturu haptoglobina čini 406 aminokiselina. Tijekom sinteze u hepatocitima formiraju se dva lanca povezana disulfidnim mostovima, laki α i teški β lanac. Primarna struktura lakog α lanca sadrži 141 aminokiselinu. Slijed od 38. do 96. aminokiseline može se javiti jednom (α_1 lanac molekulske mase 9 kDa) ili dva puta (α_2 lanac molekulske mase 16 kDa) u primarnoj strukturi α lanca. Postoje dvije varijante α_1 lanca, α_{1F} i α_{1S} , koji se razlikuju u 54. aminokiselini, gdje je u prvom slučaju prisutan lizin, a u drugoj varijanti na tom mjestu nalazi se glutaminska kiselina. Teški β lanac sastoji se od 243 aminokiseline i ima molekulsku masu 40 kDa (21,22).



Slika 2. Shematski prikaz strukture različitih fenotipova haptoglobina. Preuzeto i prilagođeno iz Langlois i Delanghe, 1996. (17).

Beta lanac dio je strukture svih fenotipova haptoglobina, međutim, Hp 1-1 fenotip haptoglobina ima samo α_1 lance u svojoj strukturi i u obliku je tetramera. Kombinacija α_1 i α_2 lanaca karakteristika je Hp 2-1 fenotipa koji je po strukturi linearni polimer, dok je Hp 2-2 fenotip prisutan u obliku cikličkih polimera i uz β lanac izgrađuju ga samo α_2 lanci (Slika 2) (17,22).

1.2.3. Funkcija haptoglobina

Glavna opisana funkcija haptoglobina je vezanje i uklanjanje slobodnog hemoglobina iz cirkulacije. Haptoglobin se veže s hemoglobinom u haptoglobin-hemoglobin kompleks i u tom obliku se hemoglobin uklanja iz cirkulacije. Hemoglobin se uklanja putem retikuloendotelnog sustava i receptora CD163 eksprimiranog na hepatocitima, Kupfferovim stanicama i makrofazima (22,23). Ekspresija CD163 povećana je u upalnim stanjima, kao rezultat oslobađanja, primjerice, IL-1 i IL-6, dok je njegova ekspresija smanjena pod utjecajem interferona γ i IL-4. Svi fenotipovi haptoglobina imaju isti afinitet, ali različiti kapacitet vezivanja hemoglobina. Razlika, također, postoji i u veličini kompleksa kojeg stvaraju. Fenotip Hp 2-2 ima najveći kapacitet za vezanje hemoglobina jer je i najveći, ali je njegovo uklanjanje iz cirkulacije sporije u usporedbi s druga dva fenotipa. To uzrokuje produženu aktivnost slobodnih radikala u cirkulaciji i povećava mogućnost promjena nastalih uslijed oksidativnog stresa (24).

Dodatno, haptoglobin inhibira sintezu prostaglandina i na taj način ostvaruje svoj protuupalni učinak (17). Također, opisana je i uloga haptoglobina u angiogenezi koju stimulira putem signalnog puta vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i koja je najizraženija kod fenotipa Hp 2-2 (24,25).

Osim što fenotipovi haptoglobina doprinose razlikama u njegovoj funkciji, to se odražava i na glikozilaciju, najčešću i najsloženiju postratranslacijsku modifikaciju kroz koju haptoglobin prolazi kao i većina drugih proteina plazme (21,26).

1.3. Glikozilacija proteina

Glikozilacija je jedna od najčešćih kotranslacijskih i posttranslacijskih modifikacija koja predstavlja kontrolirani enzimski proces dodavanja glikana na proteine i lipide. Glikani predstavljaju sekundarne produkte gena, jer za razliku od sinteze proteina, proces nastajanja glikana nije zapisan u genomu i ovisan je o stanicama i tkivima u kojima se odvija. Poznat je veoma mali postotak gena ljudskog genoma odgovornih za nastajanje enzima i proteinskih nosača uključenih u biosintezu glikana (27).

Glikozilacija ima značajan utjecaj na strukturu, smatanje i funkciju proteina. Uz to, interakcija između proteina na površini stanica, kao i interakcija i prepoznavanje samih stanica odvija se i preko glikana, jer se upravo na površini svake stanice nalazi glikokaliks koji čini gusti sloj glikana vezanih na glikokonjugate unutar membrane (27,28).

Glikani su izgrađeni od monosaharida koji su međusobno povezani glikozidnom vezom. Iako u prirodi postoji jako veliki broj monosaharida, većina njih nije dio strukture glikana. Oni koji najčešće čine strukturu glikana kralježnjaka mogu se podijeliti u nekoliko grupa s obzirom na svoju strukturu, pa tako razlikujemo:

- pentoze, sadrže pet atoma ugljika (npr. ksiloza),
- heksoze, sadrže šest atoma ugljika (npr. glukoza, galaktoza),
- heksozamini, heksoze s amino grupom na poziciji dva koja može biti i acilirana npr. (*N*-acetilglukozamin, *N*-acetilgalaktozamin),
- 6-deoksi heksoze (npr. fukoza),
- uronske kiseline, heksoze s karboksilnom grupom na poziciji 6 (npr. glukuronska kiselina),
- monosaharide s devet atoma ugljika (npr. *N*-acetilneuraminska kiselina, tj. sijalinska kiselina) (28).

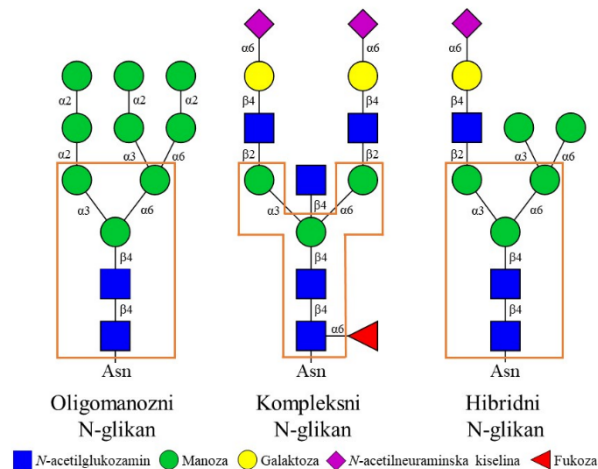
Jedna od karakteristika glikozilacije proteina je mikroheterogenost, tj. jedan protein sintetiziran u određenom tipu stanica može na sebi nositi cijeli raspon različitih glikana, čime analiza

glikozilacije i njene regulacije postaje još kompleksnija. Uz najčešće proučavanu N-glikozilaciju, koja je tema ove doktorske disertacije, opisane su sljedeće vrste glikozilacije:

- O-glikozilacija – glikan je vezan za atom kisika hidroksilne skupine serina (Ser) ili treonina (Thr) preko *N*-acetilgalaktozamina, iz čega daljnjim vezanjem monosaharida nastaju različite sržne strukture glikana – karakteristično primjerice za mucine,
- C-manozilacija – glikan je vezan preko manoze C-C vezom na triptofan (Trp) polipeptida,
- glikozilfosfatidilinozitolna sidra – nalaze se u membrani i omogućuju vezanje proteina na lipide membrane,
- fosfoglikozilacija – glikan je vezan na atom kisika fosfatne skupine fosfoserina,
- te glikozaminoglikani (GAGs) – ponavljajući disaharidi vezani na proteine tzv. proteoglikani (27,28).

1.3.1. N-glikozilacija

N-glikozilacija podrazumijeva vezanje glikana β -glikozidnom vezom na atom dušika asparagina (Asn) koji se nalazi u slijedu aminokiselina Asn-X-Ser/Thr, gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina, uz iznimku da motiv nekad može biti i s cisteinom (Cys), Asn-X-Cys_{red}. Veza se ostvaruje preko *N*-acetilglukozamina.



Slika 3. Tipovi N-glikana, sržna struktura obilježena narančastim okvirom. Preuzeto i prilagođeno iz Varki i sur., 2015. (91).

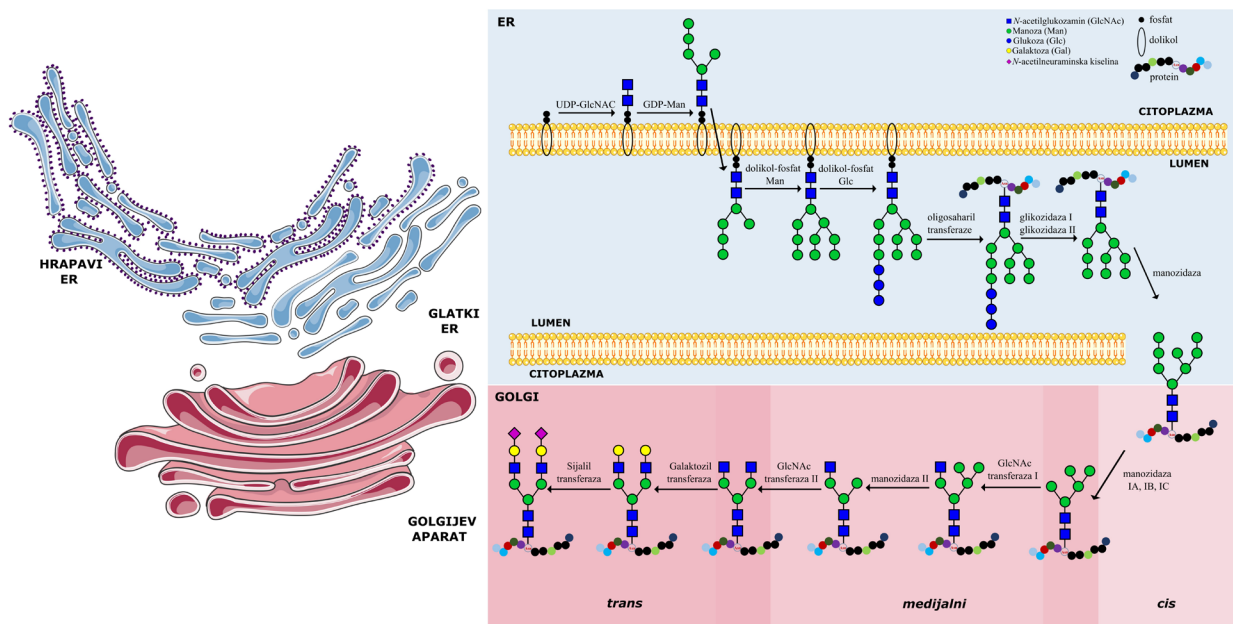
Uzimajući u obzir vrstu i grananje monosaharida koji izgrađuju strukturu N-glikana, razlikujemo 3 tipa: oligomanozni, kompleksni i hibridni (Slika 3). Sva tri tipa N-glikana imaju zajedničku sržnu

strukturu koja podrazumijeva slijed od dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze. Oligomanozni tip dalje izgrađuju samo manoze. Kompleksi tip produljuje se tzv. antenama koje nastaju dodavanjem *N*-acetilglukozamina na sržnu strukturu, a dalje se mogu produljiti dodatkom *N*-acetilgalaktozamina, *N*-acetilneuraminske kiseline i fukoze, koja osim na antenu može biti vezana i na samu srž glikana. Kod ljudi maksimalno mogu biti prisutne četiri antene u jednoj glikanskoj strukturi. Hibridni tip predstavlja kombinaciju dva prethodno opisana tipa (27,28).

1.3.2. Biosinteza N-vezanih glikana

Biosintezu N-glikana možemo podijeliti u tri faze: stvaranje lipidno-vezanog prekursora oligosaharida, prijenos oligosaharida na polipeptidni lanac i daljnja obrada oligosaharida. Prve dvije faze odvijaju se u hrapavom endoplazmatskom retikulumu (ER), a treća u Golgijevom aparatu (Slika 4).

Početni korak prve faze sinteze N-glikana odvija se na citoplazmatskoj strani ER-a i podrazumijeva vezanje dva *N*-acetilglukozamina i pet manoze na lipidni nosač dolikol fosfat katalizom enzima koji kao nukleotidne donore šećera koriste UDP-*N*-acetilglukozamin i GDP-manozu.



Slika 4. Biosinteza glikana. Dijelovi slike kreirani sa smart.servier.com koji je licenciran pod *Creative Commons Attribution 3.0 Unported* licencom (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Nakon toga, proces se nastavlja na strani lumena ER-a, gdje su donori šećera dolikol-vezani šećeri, dolikol-fosfat-Man i dolikol-fosfat-glukoza. Oni dodaju manoze i glukoze na strukturu do ukupno devet manozna i tri glukoze. Ova struktura vezana je na dolikol fosfat pirofosfatnom vezom.

Druga faza nastavlja se na strani lumena ER-a i podrazumijeva vezanje nastale strukture na Asn proteina. Međutim, da bi došlo do vezanja, potrebno je da Asn bude dio specifičnog aminokiselinskog slijeda unutar primarne strukture proteina, kao i da je pravilno smješten u trodimenzionalnoj strukturi proteina te da se nalazi u određenom unutarstaničnom odjeljku. Asn koji se glikozilira obično je dio sekretornih ili transmembranskih proteina, a enzimi koji kataliziraju vezanje dolikol-vezanog glikana na polipeptid još uvijek nesmotanog proteina su oligosahariltransferaze. Sljedeći korak uključuje procesiranje glikana egzoglikozidazama koje cijepaju glikane na njihovom nereducirajućem kraju. Prvo se uklanja terminalna glukoza uz pomoć glukozidaze I, a potom druge dvije glukoze s glukozidazom II. Nakon toga, novosintetizirani glikoprotein napušta ER i daljnja obrada se nastavlja u Golgijevom aparatu.

U trećoj fazi, koja počinje u *cis* Golgiju, manozidaze uklanjaju neke ili sve četiri manoze iz strukture glikana. Glikoproteini koji u svojoj strukturi zadrže tih pet ili više manozna sadrže oligomanozni tip glikana. Obrada glikana se dalje nastavlja u medijalnom i *trans* Golgiju do kompleksnih i hibridnih glikanskih struktura. *N*-acetilglukozamiltransferaze kataliziraju dodavanje *N*-acetilglukozamina na α 1-3 ruku sržne strukture glikana, dok manozidaze uklanjaju preostale manoze na α 1-6 ruci. Nastavak izgradnje strukture glikana odvija se uz katalizu galaktoziltransferaza i sijaliltransferaza i to u odjeljku *trans* Golgija. Galaktoziltransferaza veže galaktozu na *N*-acetilglukozamin β 1-4 vezom, a sijaliltransferaze vežu terminalnu sijalinsku kiselinu α 2-3 ili α 2-6 glikozidnom vezom. U ovom procesu također se koriste nukleotidni donori šećera koji nastaju u citoplazmi.

Struktura glikana dalje se može produljiti dodavanjem:

- 1) računajućeg *N*-acetilglukozamina β 1-4 vezom na manozu u sržnoj strukturi glikana,
- 2) dodavanjem sržne ili antenarne fukoze uz pomoć fukoziltransferaza te
- 3) dodavanjem ponavljajućeg slijeda disaharida galaktoza–*N*-acetilglukozamin (polilaktozamin) na jednu od antena glikanske strukture (28).

1.3.3. Glikozilacija haptoglobina

Haptoglobin ima četiri N-glikozilacijska mjesta koja se nalaze na teškom β lancu na pozicijama Asn 184, Asn 207, Asn 211 i Asn 241. Dosadašnja istraživanja opisala su samo kompleksni tip glikana na haptoglobinu (21). Iako se fenotipovi haptoglobina prvenstveno razlikuju u α lancima koji ih grade, i za razliku od β lanca nisu glikozilirani, pokazano je da fenotipovi haptoglobina mogu imati različiti profil glikana (26).

1.4. Glikozilacija u kolorektalnom karcinomu

Glikozilacija se mijenja ovisno o fiziološkim i patološkim promjenama. Na profil glikana utječu vrsta, lokalizacija i razina ekspresije dostupnih glikoziltransferaza i glikozidaza te njihova kompeticija za različite supstrate. Uz to, promjene u pH vrijednosti u ER-u i Golgijevom aparatu, gdje se odvija biosinteza N-glikana mogu dovesti do promjena u glikozilaciji. Također, dostupnost monosaharida, faktora rasta, nukleotidnih donora šećera i supstrata proteina izrazito je bitna u ovom procesu. Posljedično tome, interakcija glikana s proteinima na koji se vežu može biti drugačija i utjecati na promjene u glikozilaciji što se odražava na procese u stanici, pa tako i u razvoju karcinoma, pojavi metastaza i samom imunom odgovoru na prisustvo karcinoma (29,30). Promjene u glikozilaciji u kolorektalnom karcinomu proučavane su na razini stanica, tkiva i plazme. Općenito, promjene u stanicama i tkivima odnose se na povećanu sijalinizaciju i fukozilaciju glikana, te povećan udio oligomanoznih glikana, a smanjenu razinu glikanskih struktura s računjućim *N*-acetilglukozaminom (9,31). Plazma slijedi slične promjene opisane u stanicama i tkivima uz dodatno povećanu razinu kompleksnih N-glikana s većim brojem antena te posljedično smanjenu razinu struktura s manjim brojem antena (29,30).

1.5. Analiza N-glikozilacije proteina

Glikozilacija proteina može se analizirati na razini cjelovitog proteina, glikopeptida i glikana pa na osnovi toga razlikuje se nekoliko pristupa.

Prvi korak koji prethodi samoj analizi glikozilacije je izolacija ili obogaćivanje određenih proteina iz plazme. U tu svrhu mogu se koristiti metode imunoafinitetne kromatografije (32,33), precipitacije proteina (34), imunoprecipitacije (35) i dvodimenzionalne gel-elektroforeze (36).

Također, upotreba različitih lektina omogućuje izolaciju proteina od interesa na temelju specifičnih interakcija s glikanima koje prepoznaju (37–41).

Nakon izolacije proteina od interesa, protein se može analizirati u cjelosti i takav pristup nazivamo *top-down*. U tu svrhu se obično koristi spektrometrija masa visoke rezolucije (42). Uz *top-down* pristup postoji i *middle-down* koji podrazumijeva cijepanje proteina na manje fragmente u spektrometru masa primjenom odgovarajućih parametara. Za razliku od *down* pristupa, gdje se fragmentacija odvija u spektrometru masa, protein se može razgraditi na manje fragmente i kroz samu pripremu prije analize na instrumentu i tada govorimo o *up* pristupima. *Middle-up* pristup uključuje cijepanje proteina na par manjih dijelova tijekom pripreme uzoraka, dok *bottom-up* koristi enzime koji razgrađuju protein do razine glikopeptida (43).

Prethodno navedeni načini analize glikozilacije sadržavaju informaciju o poziciji glikozilacijskog mjesta na proteinu. Međutim, analiza se može provesti i samo na glikanima koji se enzimski oslobađaju od proteina. Kao metoda detekcije u tu se svrhu pored spektrometrije masa može koristiti i fluorescentna detekcija. U tom slučaju potrebno je obilježiti glikane određenom fluorescentnom bojom. Najčešće fluorescentne boje koje se koriste u analizi tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC) su 4-amino-*N*-(2-dietilaminoetil) benzamid, poznat i pod imenom prokainamid (ProA), 2-aminobenzamid (2-AB), te 2-antranilna kiselina, dok se u analizi kapilarnom elektroforezom (CE) najčešće koristi (8-aminopiridin-1-tio) acetamidin (APTS). U oba slučaja radi se o reakciji reduktivne aminacije (44,45).

Osim što se UHPLC i CE koriste samostalno u fluorescentnoj detekciji, mogu također biti i dio spregnutog sustava sa spektrometrom masa, gdje kao tehnike razdvajanja prije spektrometrije masa omogućavaju analizu veoma kompleksnih uzoraka glikopeptida i glikana (46).

Sekvencijalnim razgradnjama glikana egzoglikozidazama moguće je dobiti informaciju i o vezi između monosaharidnih jedinica u glikanskoj strukturi. Dodatno, za utvrđivanje tipa glikozidne veze sijalinskih kiselina postoje različite metode derivatizacije poput permetilacije, etil esterifikacije i dimetil amidacije (46).

1.6. Obrazloženje teme

Veliki broj novih slučajeva kolorektalnog karcinoma dijagnosticira se svake godine, a po stopi smrtnosti ova vrsta karcinoma nalazi se na vrhu, kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj. Adekvatna terapija može poboljšati prognozu i ishod bolesti, a da bi se u tome uspjelo potrebno je nastaviti istraživati čimbenike i potencijalne molekularne mehanizme koji mogu doprinijeti razvoju karcinoma. Poznato je da glikozilacija ima ulogu u napredovanju karcinoma, kao i da proteini plazme pokazuju promjene u glikozilaciji u kolorektalnom karcinomu (9,29). Određivanje nositelja tih promjena na razini pojedinačnih proteina doprinijelo bi razumijevanju cjelokupnog procesa. Jedan od potencijalnih nositelja promjena u glikozilaciji na razini plazme je haptoglobin (21,30,47).

Iz toga proizlazi hipoteza ovog istraživanja koja glasi da su promjene u glikozilaciji haptoglobina značajne kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom u odnosu na kontrolnu skupinu i mogu doprinijeti stratifikaciji pacijenata s ovim oboljenjem.

Prethodna istraživanja glikozilacije haptoglobina u karcinomima, uključujući kolorektalni karcinom, obuhvaćaju studije na malom broju uzoraka. Stoga, ciljevi ove disertacije bili su:

- 1) razviti visokoprotočne metode za analizu glikozilacije haptoglobina na razini ukupnih N-glikana i pojedinog glikozilacijskog mjesta,
- 2) istražiti postoje li promjene u glikozilaciji haptoglobina na razini ukupnih N-glikana haptoglobina i specifično za svako glikozilacijsko mjesto kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

2. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

2.1. ISPITANICI

Dvije skupine ispitanika su bile uključene u ovo istraživanje. Na prvoj skupini ispitanika provedeno je primarno, a na drugoj validacijsko istraživanje. Istraživanja etički su odobrena na institucijama gdje su uzorci prikupljeni, kao i od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (klasa 643-02/19-01/02 , broj odobrenja 251-62-03-19-31). Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

2.1.1. Primarno istraživanje

Primarno istraživanje provedeno je na 370 ispitanika čiji su uzorci seruma prikupljeni u biobanci u Nizozemskoj (engl. *Leiden University Medical Center Biobank*, LUMC). Uzorci su prikupljeni uz informirani pristanak pacijenata, a ovu studiju odobrila je Medicinska komisija za etiku LUMC-a (broj odobrenja P03.147). Raspodjela ispitanika prema dijagnozi, dobi, spolu i stadiju bolesti prema TNM (engl. *Tumor-Node-Metastasis*) klasifikaciji prikazana je u Tablica 1. Svi ispitanici s dijagnozom kolorektalnog karcinoma uzorkovani su prije operativnog zahvata, a unutar te skupine prikupljeni su i uzorci nakon operacije za 86 ispitanika. Postoperativni uzorci prikupljeni su 45 dana nakon operacije, a bolesnici su praćeni više od 46 mjeseci nakon operacije. Uzorci kontrolne skupine prikupljeni su od članova obitelji ili pratnje bolesnika te na taj način predstavljaju opću populaciju.

Tablica 1. Pregled ispitanika primarnog istraživanja.

	KOLOREKTALNI KARCINOM	KONTROLNA SKUPINA
	(185)	(185)
SPOL		
ŽENE / MUŠKARCI	85 / 100	84 / 101
DOB		
PROSJEČNA DOB	66,6	63,0
(MIN – MAX)	(25 – 100)	(27 – 84)
STADIJ BOLESTI		
(TNM KLASIFIKACIJA)		
0	5 (2,7 %)	
1	34 (18,4 %)	
2	68 (36,8 %)	

3	52 (28,1 %)
4	26 (14,1 %)

2.1.2. Validacijsko istraživanje

Validacijsko istraživanje napravljeno je na uzorcima plazme prikupljenim u Hrvatskoj, u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu, čije je Etičko povjerenstvo dalo suglasnost za provođenje ovog istraživanja (broj odobrenja EP-7802/12-12). Kroz ovu studiju analizirana je plazma 493 ispitanika (Tablica 2), 224 pacijenata s dijagnozom kolorektalnog karcinoma i 269 kontrola. Kontrole su ispitanici koji nemaju dijagnostičan karcinom, niti drugo upalno stanje na osnovi njihovih vrijednosti za C-reaktivni protein (CRP) i leukocite. Uzorkovanje kod svih pacijenata napravljeno je prije operativnog zahvata uz njihov informirani pristanak.

Tablica 2. Pregled ispitanika validacijskog istraživanja.

	KOLOREKTALNI KARCINOM (224)	KONTROLNA SKUPINA (268)
SPOL		
ŽENE / MUŠKARCI	76 / 148	106 / 162
DOB		
PROSJEČNA DOB (MIN – MAX)	66,8 (30 – 85)	68,7 (44 – 102)
STADIJ BOLESTI (AJCC KLASIFIKACIJA)		
1	50 (22,3 %)	
2	65 (29,0 %)	
3	69 (30,8 %)	
4	40 (17,9%)	

2.2. MATERIJALI

2.2.1. Standardne kemikalije

U sklopu ovog doktorskog rada korištene su sljedeće kemikalije: 2-AB (Sigma Aldrich, SAD), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich, SAD), acetonitril (VWR International, SAD), amonijev bikarbonat (NH₄HCO₃) (Acros Organics, Belgija), amonijev klorid (NH₄Cl) (Acros Organics, Belgija), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, SAD), ditiotreitrol (DTT) (Sigma-Aldrich,

SAD), etanol (Carlo Erba, Italija), formijatna kiselina (HCOOH) (Merck, Njemačka), Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, SAD), jodoacetamid (engl. *iodoacetamide*, IAA) (Sigma-Aldrich, SAD), kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich, SAD), kalijev klorid (KCl) (Millipore, SAD), klorovodična kiselina (HCl) (VWR International, SAD), natrijev azid (NaN₃) (Sigma-Aldrich, SAD), natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) (Sigma-Aldrich, SAD), natrijev hidroksid (NaOH) (Sigma-Aldrich, SAD), natrijev klorid (NaCl) (Sigma-Aldrich, SAD), prokainamid hidroklorid (Sigma-Aldrich, SAD), trifluorooctena kiselina (CF₃COOH) (Sigma-Aldrich, SAD).

2.2.2. Enzimi i standardi

Za razvoj metoda u sklopu ovog istraživanja korišteni su sljedeći enzimi: TPCCK– tretirani tripsin iz gušterače goveda (Sigma-Aldrich, Njemačka), modificirani tripsin za sekvenciranje iz svinje (Promega, SAD), endoproteinaza Glu-C iz *Staphylococcus aureus* V8 (Promega, SAD), endoproteinaza Glu-C iz *Staphylococcus aureus* V8 (Roche, Njemačka) te N-glikozidaza F (PNGaza F) (Promega, SAD).

Također su korišteni i standardi: standard haptoglobina (Athens Research & Technology, SAD) i komercijalno dostupna normalna kontrolna plazma VisuCon-F (Affinity Biologicals Inc., Kanada).

2.2.3. Pločice i filter pločice

Orochem filter pločica (Orochem, SAD) – polipropilenska filter pločica s 96 jažica volumena 600 μL i porama veličine 10 μm.

CIMmic (engl. *Convective Interaction Media® monoliths*) HDZ (engl. *hydrazide*) anti-haptoglobin pločica (BIA Separations, Sartorius, Slovenija) – pločica s 96 jažica koja je razvijena za izolaciju haptoglobina iz plazme ili seruma. Svaka jažica anti-haptoglobin pločice ima volumen čvrste faze od 200 μL, i kapacitet vezanja haptoglobina oko 400 μg.

0,45 μm GHP AcroPrep (Pall, SAD) – filter pločica s 96 jažica volumena 1 mL i hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,45 μm, kroz koju su filtrirani uzorci plazme prije izolacije haptoglobina.

0,20 µm GHP AcroPep (Pall, SAD) – filtar pločica s 96 jažica volumena 1mL i hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,20 µm, kroz koju su pročišćeni fluorescentno obilježeni glikani.

2.2.4. Instrumenti

Za razdvajanje i analizu tekućinskom kromatografijom (engl. *liquid chromatography*, LC) korišteni su sljedeći instrumenti: UltiMate™ 3000 RSLCnano sustav (ThermoFisher Scientific, SAD), Acquity UPLC M-class sustav (Waters, SAD) te Acquity UPLC H-class sustav (Waters, SAD).

Spektrometri masa koji su korišteni kroz ovo istraživanje su Compact QTOF (Bruker Daltonics, Njemačka), Impact QTOF (Bruker Daltonics, Njemačka) i Maxis Impact HD QTOF (Bruker Daltonics, Njemačka).

2.2.5. Računalni programi i alati

Za analizu, obradu i prezentiranje rezultata korišteni su sljedeći računalni programi i alati: Chromeleon (ThermoFisher Scientific, SAD), otofControl (Bruker Daltonics, Njemačka), Compass DataAnalysis (Bruker Daltonics, Njemačka), MS Convert tool (ProteoWizard, SAD), MZmine (48,49), LaCyTools (50), GlycoMod (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska), HyStar (Bruker Daltonics, Njemačka), Empower (Waters, SAD), MaxQuant 1.6.3.4. (51), R programski jezik (verzija 3.5.1.), GraphPad Prism 9.4.1. (GraphPad Software, SAD), Inkscape 1.0.2.-2 (GNU licenca).

2.3. ANALIZA N-GLIKOPEPTIDA HAPTOGLOBINA

2.3.1. Izolacija haptoglobina iz krvne plazme ili seruma

Haptoglobin je izoliran pomoću zrnaca obloženih protutijelom na haptoglobin (engl. *Capture Select Haptoglobin Affinity Resin*). Na Orochem pločicu s 96 jažica nanesa su zrnca u puferu 1x PBS, pH 7,4 (137 mM NaCl; 9,7 mM Na₂HPO₄; 2,2 mM KH₂PO₄) u ukupnom volumenu od 20 µL. Zrnca su prvo isprana sa 600 µL 1x PBS, pH 7,4, a potom ostavljena u 100 µL istog pufera. Uzorci plazme ili seruma dodani su u pufer i inkubirani sa zrcima jedan sat na sobnoj temperaturi uz jednolično miješanje. Nakon toga, isprani su sa 600 µL 1x PBS, pH 7,4 i 600 µL ultra čiste

vode na vakuum uređaju za pločice. Haptoglobin je eluiran sa zrnaca s 0,1 M formijatnom kiselinom i centrifugiranjem 1 minutu na 100 g. Eluati su sušeni u vakuum centrifugi 2,5 sata pri temperaturi od 50 °C.

2.3.2. Metode denaturacije i proteolize

Osušeni eluati otopljeni su u 10 µL 25 mM amonijevog bikarbonata te potom denaturirani i reducirani s 1 µL 20 mM ditioneitolu i inkubacijom 30 minuta pri 60 °C. Uzorci su inkubirani s 1,5 µL 40 mM jodoacetamida na sobnoj temperaturi u mraku, a reakcija alkilacije zaustavljena je izlaganjem uzoraka svjetlosti 20 minuta te dodatkom 20 mM ditioneitolu u suvišku u konačnoj koncentraciji od 6 mM. TPCCK-tretirani tripsin dodan je svakom uzorku u količini od 0,05 µg, nakon čega su uzorci inkubirani pri 37 °C preko noći.

2.3.3. LC-MS analiza N-glikopeptida haptoglobina

N-glikopeptidi haptoglobina analizirani su na spregnutom sustavu tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS). U volumenu od 200 nL direktno su injektirani na LC sustav UltiMate™ 3000 RSLCnano, gdje su pročišćeni na pretkoloni C18 Acclaim PepMap (5 mm x 300 µm i.d., 5 µm, 100 Å) jednu minutu pri protoku od 25 µL/min s 0,1 % trifluorooctenom kiselinom (otapalo A). Nakon toga su razdvojeni na nanoEase C18 koloni (100 mm x 75 µm i.d., 1,7 µm, 130 Å) zagrijanoj pri 45 °C uz protok od 0,6 µL/min s gradijentom od 30 % do 95 % acetonitrila (otapalo B) unutar 4,5 minute. Triptički glikopeptidi razdvojeni su u tri skupine, gdje svaka skupina odgovara određenom glikozilacijskom mjestu/mjestima te svi glikopeptidi s tim glikozilacijskim mjestom/mjestima imaju slično retencijsko vrijeme. LC sustav spojen je sa spektrometrom masa Impact qTOF-om, preko izvora za ionizaciju elektroraspršenjem CaptiveSpray, uz poboljšanje ionizacije pomoću tehnologije nanoBooster. Spektri su snimljeni u rasponu od 550 m/z do 1800 m/z uz frekvenciju snimanja od 1 Hz.

2.3.4. Optimizacija metode analize N-glikopeptida haptoglobina

Prije nego su uzorci analizirani na spregnutom sustavu LC-MS, korak izolacije i proteolize optimiran je u svrhu poboljšanja učinkovitosti izolacije haptoglobina iz krvne plazme ili seruma i omogućavanja analize svakog pojedinog glikozilacijskog mjesta haptoglobina.

2.3.4.1. *Optimizacija izolacije*

Protokol izolacije opisan u poglavlju 2.3.1. ispitan je s 1, 2, 3, 4, 5, 10 i 20 μL zrnaca s protutijelom na haptoglobin. U uvjetima s 5, 10 i 20 μL , zrnca su pripravljena u puferu 1x PBS, pH 7,4 u omjeru 1:1, dok su preostali volumeni zrnaca pripremljeni u ukupnom volumenu 20 μL . Haptoglobin je izoliran iz 5 i 10 μL plazme. Učinkovitost izolacije i optimalna količina početnog materijala provjerene su i uspoređene elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Nakon izolacije, eluati su osušeni u vakuum centrifugi i nanešeni na NuPAGE 4-12 % Bis-Tris gel. Uzorci su prethodno denaturirani i reducirani dodavanjem reducirajućeg pufera (0,125 M Tris-HCl, 10 % glicerol, 2 % SDS, 1,7 % β -merkaptetanol i 0,01 % bromfenol plavo; navedene su konačne koncentracije u uzorku) i inkubacijom 10 minuta pri 70 °C. Elektroforeza se odvijala na 200 V tijekom 45 minuta, a nakon toga su vrpce na gelu vizualizirane Coomassie bojanjem.

2.3.4.2. *Optimizacija proteolize*

Za proteolizu haptoglobina ispitana su dva enzima, tripsin i endoproteinaza Glu-C. Eksperimenti su napravljeni u triplikatu na 10 μg standarda haptoglobina. Za ove eksperimente korišten je modificirani tripsin u omjeru enzim : protein 1 : 20 (w/w). Endoproteinaza Glu-C ispitana je u kombinaciji s tripsinom na sljedeći način: nakon inkubacije s tripsinom i njegove inaktivacije pri 95 °C tijekom 5 minuta, dodana je endoproteinaza Glu-C u različitim omjerima, 1 : 20, 1 : 10 ili 1 : 5, a zatim su uzorci inkubirani pri 37 °C preko noći.

2.3.5. Anotacija N-glikopeptida haptoglobina

Standard haptoglobina pripremljen je kao što je opisano u poglavlju 2.3.2. i 25 ng haptoglobina injektirano je na UltiMate™ 3000 RSLCnano sustav spregnut s Maxis Impact HD QTOF instrumentom preko Captive spray-a uz nanoBooster. Triptički glikopeptidi haptoglobina

razdvojeni su na gradijentu od 3 % do 50 % otapala B unutar 45 minuta pri protoku od 0,7 $\mu\text{L}/\text{min}$, pri čemu je u ovoj metodi otapalo A bila 0,1 % formijatna kiselina. Postavke spektrometra masa prilagođene su prema prethodno opisanoj metodi (52), s rasponom snimanja spektara od 50 m/z do 2800 m/z i frekvencijom snimanja od 1 Hz. Fragmentacijski spektri (MS/MS) snimljeni su automatski za četiri najintenzivnija prekursorska iona.

MS/MS spektri filtrirani su na osnovi dijagnostičkog iona 366,1385 m/z, koji odgovara fragmentu *N*-acetilheksozamina povezanim s heksozaminom. Svaki filtrirani spektar pretražen je dodatno za dijagnostičke ione 204,0867 m/z, koji odgovara *N*-acetilheksozaminu i 657,2349 m/z za *N*-acetilneuraminsku kiselinu vezanu za heksozu i *N*-acetilheksozamin, kako bi potvrdili da se radi o glikopeptidu. Slijed aminokiselina peptidnog dijela potvrđen je na osnovi b i y iona dostupnih u spektru. Na osnovi mase prekursora, svaka odgovarajuća masa pretražena je kroz GlycoMod te uz signale identificirane u spektru predložena je struktura glikopeptida koja odgovara traženoj masi. Sastav (engl. *composition*) predložene strukture glikopeptida izražen je u obliku $\text{N}_x\text{H}_x\text{S}_x\text{F}_x$, pri čemu se N odnosi na *N*-acetilheksozamin, H na heksozamin, S na sijalinsku kiselinu, F na fukozu, a x na broj tih struktura u sastavu glikana. Na isti način provjereni su i fragmentacijski spektri uzoraka gdje je haptoglobin dodatno razgrađen s endoproteinazom Glu-C.

2.3.6. Ekstrakcija i obrada glikoproteomskih podataka

Podatci su obrađeni u računalnom programu LaCyTools koji radi pod licencom besplatnog softvera (50). LaCyTools podržava mzXML format, tako da su sve originalne datoteke Bruker formata pomoću MS Convert alata spremljene u mzXML formatu. Kromatogrami su poravnati na odgovarajuće retencijsko vrijeme na osnovi retencijskog vremena osam najzastupljenijih glikopeptida. Spektri su kalibrirani na osnovi prethodno određenih kalibranta odabranih iz liste analita za ekstrakciju. Svi kalibranti imali su omjer signala i šuma veći od 9. Svaka skupina triptičkih glikopeptida imala je odabrana 3 kalibranta i uzorak je kalibriran ako je 6 od 9 kalibranta pronađeno u zadanom prozoru retencijskog vremena i ako je omjer signala i šuma bio veći od 9. Za svaku skupinu glikopeptida kreiran je zajednički spektar u određenom retencijskom vremenu i integrirani su signali koji podrazumijevaju 95 % intenziteta izotopne raspodjele. Relativna kvantifikacija napravljena je na analitima naboja od 2+ do 5+ koji su prethodno prošli kontrolu kvalitete. Parametri koji su bili dio kontrole kvalitete su: preciznost mjerenja (engl. *mass accuracy*), raspodjela izotopa (engl. *isotopic pattern quality*) i omjer signala i šuma (engl. *signal*

to noise ratio). Granice parametara kontrole kvalitete koje su smatrane prihvatljivim bile su: za preciznost mjerenja između -10 i 10 ppm, devijacija raspodjele izotopa od teoretske manja od 25 % i omjer signala i šuma veći od 9. Apsolutni intenziteti za svaki ekstrahirani naboj koji su prošli kontrolu kvalitete zbrojeni su za svaki analit i normalizirani na ukupni intenzitet po skupini glikopeptida te je vrijednost za svaki glikopeptid izražena u obliku relativnog intenziteta.

Uz kontrolu kvalitete analita, napravljena je i kontrola kvalitete spektara za svaki uzorak na osnovi parametra koji pokazuje postotak analita po skupini glikopeptida koji imaju omjer signala i šuma veći od 9. Uzorci koji su imali postotak unutar dvije standardne devijacije od prosječne vrijednosti svih uzoraka uzeti su u obzir za relativnu kvantifikaciju.

2.4. ANALIZA UKUPNIH N-GLIKANA HAPTOGLOBINA

2.4.1. Obogaćivanje haptoglobina iz krvne plazme ili seruma

Obogaćivanje haptoglobina iz krvne plazme ili seruma temeljilo se na imunoafinitetnoj kromatografiji. Monoklonska protutijela na haptoglobin dobivena su iz miševa i imobilizirana su na CIMmic pločicu s 96 jažica. Jažice pločice najprije su isprane s 2 mL ultra čiste vode, 1 mL 0,1 M formijatne kiseline, pH 2,5 i s 4 mL 1x PBS, pH 7,4 (137 mM NaCl; 9,7 mM Na₂HPO₄; 2,2 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl; titrirano s 1 M NaOH do pH 7,4). Sljedeći korak uključivao je nanošenje razrijeđenih uzoraka plazme s 1x PBS, pH 7,4 u omjeru od 1:7, nakon što su filtrirani kroz 0,45 µm AcroPrep filter pločicu. Nakon vezivanja haptoglobina na pločicu, jažice su pročišćene sa 6 mL 1x PBS, pH 7,4 te je potom haptoglobin eluiran s pločice s 0,7 mL 0,1 M formijatne kiseline, pH 2,5 i neutraliziran s 1 M amonijevim bikarbonatom za konačni pH 7,0. Pločica je regenerirana s 2 mL 0,1 M formijatne kiseline, pH 2,5 i 4 mL 1x PBS, pH 7,4 te je pospremljena u puferu 1x PBS, pH 7,4 koji je sadržavao 0,2 g/L NaN₃. Koncentracija haptoglobina nakon imunoafinitetne izolacije određena je mjerenjem apsorbancije pri 280 nm korištenjem spektrofotometra Nanodrop 8000 (ThermoFisher Scientific, SAD), a čistoća izoliranog eluata provjerena je na SDS-PAGE-u.

2.4.2. Metode denaturacije, deglikozilacije i obilježavanja glikana

Dio eluata osušen je za denaturaciju haptoglobina s 30 μL 1,33 % SDS-a u inkubatoru pri 65 °C tijekom 10 min. Prije deglikozilacije s PNGazom F, dodano je 10 μL 4 % Igepal CA-630 kako bi se neutralizirao efekt SDS-a na enzim PNGazu F. Svi uzorci tretirani su s 10 μL PNGaze F (konačna koncentracija 24 mU/ μL) u 5x PBS-u i inkubirani preko noći pri 37 °C.

N-glikani obilježeni su reakcijom reduktivne aminacije s 2-AB-om (19,2 mg/mL) i 2-PB-om (44,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) u 25 μL otopine DMSO-a s glacijalnom octenom kiselinom (70:30, v/v). Obilježavanje se odvijalo pri temperaturi od 65 °C u trajanju od dva sata. Nakon obilježavanja, uzorci su pročišćeni na 0,2 μM AcroPrep GHP filter pločici na osnovi hidrofilnih interakcija. Filter pločica prvo je isprana s 200 μL 70 % etanola, zatim 200 μL ultra čiste vode i 200 μL 96 % acetonitrila, a potom su uzorci nanešeni u 90 % acetonitrilu i isprani s 1,2 mL 96 % acetonitrila. Fluorescentno obilježeni glikani eluirani su u 180 μL ultra čiste vode. Frakcije su skupljene u dva koraka, a svaki korak sastojao se od jednoličnog miješanja 15 minuta i centrifugiranja na 164 g 5 minuta.

2.4.3. Analiza fluorescentno obilježenih glikana tekućinskom kromatografijom

Analiza je napravljena na instrumentu Acquity H-class UPLC. Uzorci su pripremljeni u 80 % acetonitrilu i održavani pri temperaturi od 10 °C prije nego je 40 μL injektirano u instrument. N-glikani haptoglobina razdvojeni su na koloni Acquity BEH Glycan (150 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 μm) pri temperaturi kolone od 40 °C, uz 100 mM amonijev formijat kao otapalo A i acetonitril kao otapalo B. Razdvajanje se odvijalo uz protok od 0,561 mL/min pri gradijentu u prvih 10 minuta od 70 % do 64 % otapala B, a zatim u idućih 20 minuta od 64 % do 54 % otapala B. Ukupna analiza trajala je 37,7 minuta. Valne duljine ekscitacije i emisije na fluorescentnom detektoru bile su postavljene za 2-AB na 250 nm i 428 nm, a za prokainamid na 310 nm i 370 nm.

Kromatogrami su ručno integrirani i svaki kromatografski pik izražen je kao postotak ukupne integrirane površine.

2.4.4. Optimizacija metode analize ukupnih N-glikana haptoglobina

U svrhu postizanja optimalne količine obogaćenog haptoglobina iz plazme za analizu njegove glikozilacije testirani su različiti volumeni plazme. Također, postizanje potpune deglikozilacije optimirano je mijenjanjem koraka denaturacije, deglikozilacije i obilježavanja N-glikana.

2.4.4.1. Optimizacija obogaćivanja

Izolacija haptoglobina ispitana je na sljedećim volumenima plazme: 50, 100 i 200 μL prateći korake opisane u poglavlju 2.4.1. Također, dodatno je ispitan pufer za pročišćavanje uzoraka nakon vezivanja haptoglobina na jažice. U tu svrhu ispitan je 1x PBS, pH 7,4 različite ionske jakosti, tj. s različitim koncentracijama NaCl: 0,137 M, 0,25 M i 0,5 M. Čistoća uzorka potvrđena je SDS-PAGE-om, kako je ranije opisano u poglavlju 2.3.4.1., s tim da su uzorci denaturirani pri 95 °C tijekom 5 min prije elektroforeze na 200 V kroz 40 minuta. Pored toga, čistoća je potvrđena i analizom proteoma izoliranih eluata. Eksperimenti su napravljeni u triplikatu na 4 μg haptoglobina koji je tretiran s modificiranim tripsinom u omjeru 1:20. Analiza je napravljena na Acquity UPLC M-class sustavu spregnutim preko Captive Spray-a s Compact QTOF instrumentom uz tehnologiju nanoBooster. Podatci su analizirani u računalnom programu MaxQuant. Identifikacija i kvantifikacija izoliranih proteina napravljena je prema bazi podataka proteoma za *Homo sapiens*, a u skladu sa sljedećim parametrima: mogućnost nepotpune razgradnje tripsinom na najviše dva uzastopna mjesta u slijedu aminokiselina i oksidacijom metionina kao varijabilnom modifikacijom.

2.4.4.2. Optimizacija denaturacije i deglikozilacije

Deglikozilacija i denaturacija haptoglobina ispitane su na različitim volumenima eluata: 75, 150 i 300 μL . U uvjetima denaturacije ispitana je niža koncentracija deterdženata, 0,4 % SDS i 1 % Igepal CA-630. Osim toga, deterdženti su dodani u uzorke u različitim omjerima SDS:Igepal CA-630 – 1:1, 1:2,5; 1:3, 1:4 i 1:10. Također, deglikozilacija je ispitana i s povećanom količinom enzima, 240 mU/ μL .

Deglikozilirani uzorci analizirani su SDS-PAGE-om na način prethodno naveden u poglavlju 2.4.4.1. te je vrpca s najmanjom masom dalje tretirana s tripsinom i analizirana spregnutim sustavom LC-MS/MS. Vrpca od interesa izrezana je iz gela i isprana s 25 mM amonijevim

bikarbonatom i dehidrirana acetonitriplom prije redukcije s 10 mM DTT-om pri 65 °C tijekom 30 minuta i alkilirana 55 mM IAA-om pri sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta u mraku. Nakon toga, vrpca je ponovo isprana i dehidrirana te osušena u vakuum centrifugu pri 30 °C 5 minuta, te je dodano 0,6 µg tripsina i uzorci su inkubirani pri 37 °C preko noći prije daljne analize.

2.4.4.3. Optimizacija obilježavanja

Uz obilježavanje 2-AB-om, glikani su fluorescentno obilježeni i prokainamidom (43,2 mg/mL). Obilježavanje je napravljeno u jednom koraku, kako je navedeno u poglavlju 2.4.2. te u dva koraka, što podrazumijeva odvojeno dodavanje fluorescentne boje i reducensa. U tom slučaju prvi korak obilježavanja traje jedan sat, a reakcija s reducensom sat i pol. Nadalje, ispitano je i obilježavanje s dvostruko većom koncentracijom prokainamida (86,4 mg/mL) i 2-PB (89,6 mg/mL). Učinkovitost obilježavanja provjerena je LC-MS/MS analizom.

2.4.5. Anotacija N-glikana haptoglobina

Skupni uzorak N-glikana obilježenih prokainamidom koncentriran je na PGC-u (engl. *porous graphitized carbon*). PGC (50 mg/mL) je pripremljen u metanolu kao suspenzija i nanesen na C18 ziptip nastavak koji je prethodno ispran sa 120 µL acetonitrila i 120 µL ultra čiste vode. Koncentrirani obilježeni glikani eluirani su s nastavka acetonitriplom i 100 mM amonijevim formijatom, pH 4,4 (75:25, v/v) centrifugiranjem 30 sekundi pri 2000 g.

Analiza je provedena na spregnutom sustavu Acquity UPLC H-class-Compact QTOF. Kromatografski pikovi razdvojeni su po metodi opisanoj u odjeljku 2.4.3., dok su parametri spektrometra masa bili postavljeni na sljedeće: pozitivna ionizacija, ionBooster izvor, voltaža kapilare 2,25 kV, temperatura plina 300 °C i protok plina 4 l/h. Spektri su snimljeni u rasponu od 50 m/z do 3000 m/z pri frekvenciji od 2 Hz. Tri prekursorska iona s najvišim intenzitetom automatski su odabrana za sudarom potpomognutu fragmentaciju iona (engl. *collision-induced dissociation*, CID).

Detektirane mase u svakom kromatografskom piku pretražene su u GlycoMod alatu za moguću strukturu i sastav koji odgovara toj masi. Fragmentacijski spektar glikana potvrđen je na osnovi dijagnostičkih iona navedenih u poglavlju 2.3.5. te dodatnih iona: 441,3022 m/z koji predstavlja N-acetilheksozamin vezan na prokainamid, 512,1974 m/z koji predstavlja fukoza vezanu na heksozamin i N-acetilheksozamin te iona 790,4390 m/z gdje je sržna fukoza vezana na N-

acetilheksozamin i prokainamid. Za kromatografske pikove koji u sebi sadrže više glikanskih struktura izražen je udio svake glikanske strukture u obliku postotka.

2.5. PONOVLJIVOST I OBNOVLJIVOST METODA

Ponovljivost i obnovljivost metode za analizu N-glikopeptida haptoglobina evaluirana je na 46 replikata standarda seruma koji su analizirani kroz sedam vremenskih točaka. Ponovljivost je izražena za svaki glikopeptid kao koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*, CV) vrijednosti relativnog intenziteta replikata u svakoj vremenskoj točki. Za svaku vremensku točku pripremljene su nove otopine i primijenjena je optimirana metoda. Obnovljivost je izražena kao CV relativnog intenziteta svih replikata kroz sve vremenske točke. Također, na isti način je napravljena procjena metode na uzorcima komercijalno dostupne plazme VisuCon-F u sedam vremenskih točki, gdje je u svakoj točki analizirano osam replikata ovog uzorka i na osnovi CV replikata procijenjena je ponovljivost i obnovljivost metode.

Preciznost metode za analizu ukupnih N-glikana haptoglobina procijenjena je na standardu plazme analiziranom u pet replikata u sedam različitih vremenskih točki. Ponovljivost metode izražena je za svaki pojedinačni kromatografski pik kao CV postotka površine pika svih replikata u jednoj vremenskoj točki. Obnovljivost je izračunata kao CV prosječnih vrijednosti postotka površine svakog kromatografskog pika u svakoj vremenskoj točki. Analiza ukupnih N-glikana haptoglobina napravljena je na uzorcima prikupljenim u validacijskom istraživanju.

2.6. STATISTIČKE METODE

Statistička obrada podataka napravljena je u programskom jeziku R. Podatci dobiveni u primarnom istraživanju prethodno su obrađeni u LaCyTools računalnom programu, kako je navedeno u poglavlju 2.3.6. Nakon relativne kvantifikacije, glikopeptidi su grupirani na osnovi sličnosti u sastavu i strukturi u derivirana svojstva. S obzirom na to da se radi o većem broju uzoraka koji su analizirani u serijama, bilo je potrebno napraviti korekciju efekta serije (engl. *batch correction*). Logistička regresija korištena je u svrhu određivanja značajnosti promjena u glikozilaciji haptoglobina između skupine pacijenata s dijagnozom kolorektalnog karcinoma i kontrolne skupine. Analiza je napravljena na razini pojedinačnih glikopeptida i izračunatih deriviranih svojstava. Podatci o dobi i spolu uključeni su kao kovarijati kako bi se isključio njihov utjecaj na

rezultate. Rezultati su izraženi kroz omjer izgleda, interval pouzdanosti i p-vrijednost. Također, napravljena je korekcija na višestruko testiranje, uzimajući u obzir broj kvantificiranih glikopeptida i izračunatih deriviranih svojstava. U tu svrhu koristila se FDR (engl. *false discovery rate*) korekcija kojom se prag značajnosti $p < 0,05$ korigirao i izrazio u obliku koeficijenta α .

Derivirana svojstva izračunata su i za validacijsko istraživanje te je također napravljena korekcija efekta serija i logistička regresija za usporedbu ispitanika s dijagnozom kolorektalnog karcinom i kontrolne skupine. FDR korekcija je također primijenjena za korekciju višestrukog testiranja.

Usporedba rezultata primarnog i validacijskog istraživanja napravljena je na osnovi četiri zajednička derivirana svojstva.

Osim toga, u sklopu primarnog istraživanja promjene u glikozilaciji haptoglobina analizirane su u podskupini od 85 pacijenata koji su uzorkovani prije i poslije operacije pomoću „Wilcoxon matched-pairs signed rank“ statističkog testa. Korekcija višestrukog testiranja napravljena je Benjamini-Hochbergovom metodom s FDR granicom 1 %. Statistička obrada i vizualizacija rezultata napravljena je u računalnom programu GraphPad Prism.

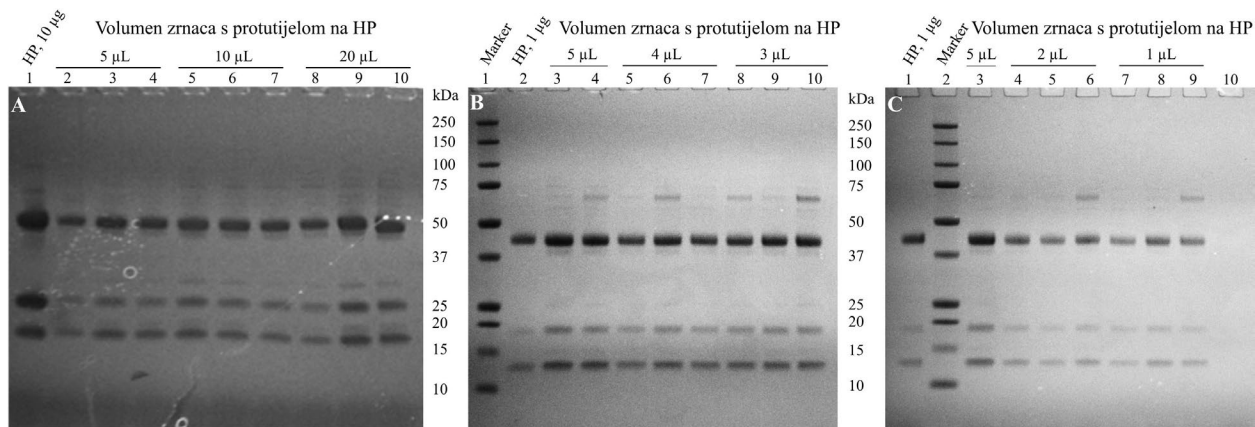
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Razvoj metode za analizu pojedinog glikozilacijskog mjesta haptoglobina spregnutim sustavom tekućinska kromatografija – spektrometrija masa

Analiza glikozilacije proteina moguća je na različitim razinama. Jedna od mogućnosti je analiza cijelog glikoproteina bez razgradnje na manje fragmente, tzv. *top-down* pristup. Uz to, postoje metode za analizu glikoproteina koje uključuju razgradnju na manje fragmente, najčešće uz pomoć enzima i takav pristup nazivamo *bottom-up* pristup. Također, moguće je analizirati samo glikanske strukture, pri čemu se glikani enzimski ili kemijski oslobađaju s proteina i analiziraju odvojeno od proteina (43,46). Kroz ovo istraživanje koristili smo dva pristupa, *bottom-up* pristup i karakterizaciju ukupnih oslobođenih glikanskih struktura.

Bottom-up pristup koristili smo za analizu glikozilacije pojedinog glikozilacijskog mjesta haptoglobina. Prije same LC-MS analize, koraci izolacije haptoglobina iz krvne plazme i njegove razgradnje enzimom ispitani su u različitim uvjetima kako bi se postigla optimalna količina proteina za analizu.

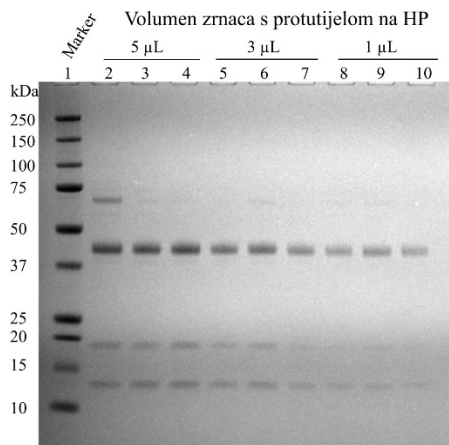
3.1.1. Optimizacija izolacije



Slika 5. Optimalna količina zrnaca s protutijelom na haptoglobin za izolaciju haptoglobina iz 10 µL plazme. A – Testiranje 5, 10 i 20 µL zrnaca. B – Testiranje 3, 4 i 5 µL zrnaca, C – Testiranje 1 i 2 µL zrnaca. Vrpce oko 14 kDa predstavljaju α_1 lanac, vrpce oko 19 kDa odgovaraju α_2 lancu, vrpce između 37 i 50 kDa odgovaraju β lancu haptoglobina, vrpce oko 62 kDa predstavljaju ostatke nereduciranog haptoglobina.

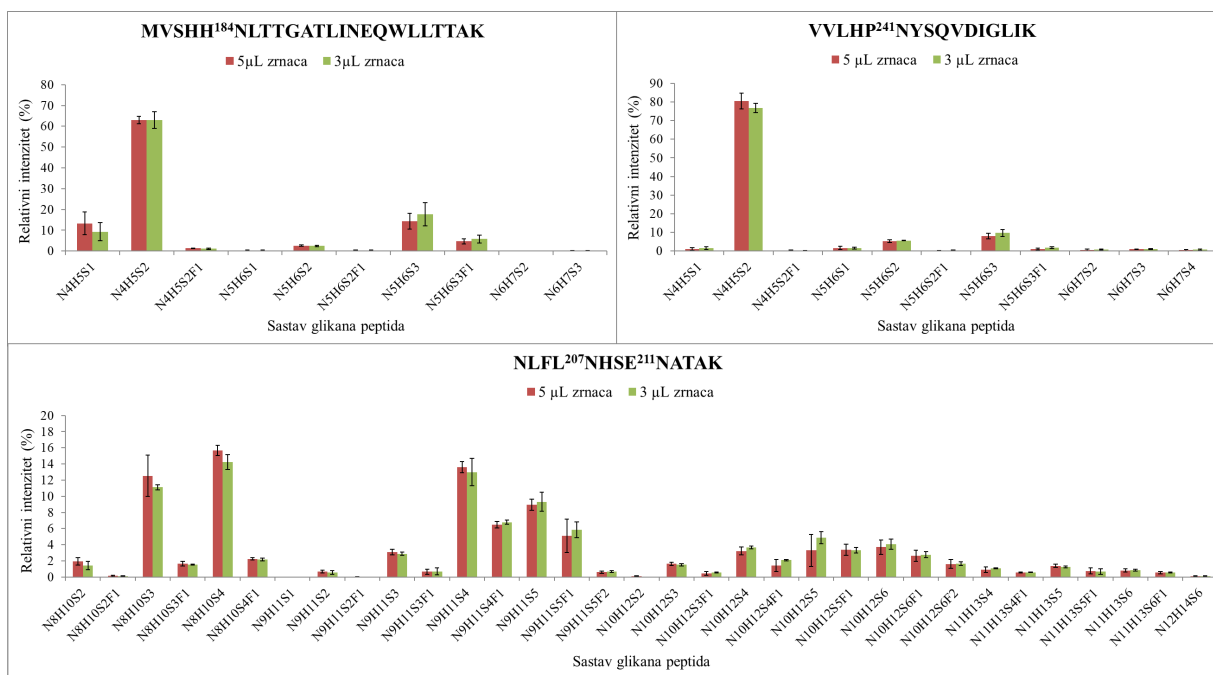
Haptoglobin je izoliran iz plazme pomoću zrnaca obloženih protutijelom na haptoglobin. Količina zrnaca za izolaciju prvobitno je ispitana s 10 µL plazme. Upotreba 5, 10 ili 20 µL zrnaca dala je uglavnom jednoličnu veličinu i intenzitet vrpce koje odgovaraju haptoglobinu na SDS-PAGE-u, β lanac oko 44 kDa, α_1 oko 14 kDa i α_2 lanac na 19 kDa (Slika 5A). Iako je intenzitet vrpce u uvjetu

izolacije haptoglobina iz 10 μL plazme upotrebom 20 μL zrnaca jači u usporedbi s ostalim uvjetima, nije reproducibilan kroz sve replikate pa taj uvjet nije odabran kao optimalan.



Slika 6. Optimalna količina zrnaca s protutijelom na haptoglobin za izolaciju haptoglobina iz 5 μL plazme s 1, 3 i 5 μL zrnaca. Vrpce oko 14 kDa predstavljaju $\alpha 1$ lanac, vrpce oko 19 kDa odgovaraju $\alpha 2$ lancu, vrpce između 37 i 50 kDa odgovaraju β lancu haptoglobina, vrpce oko 62 kDa predstavljaju ostatke nereduciranog haptoglobina.

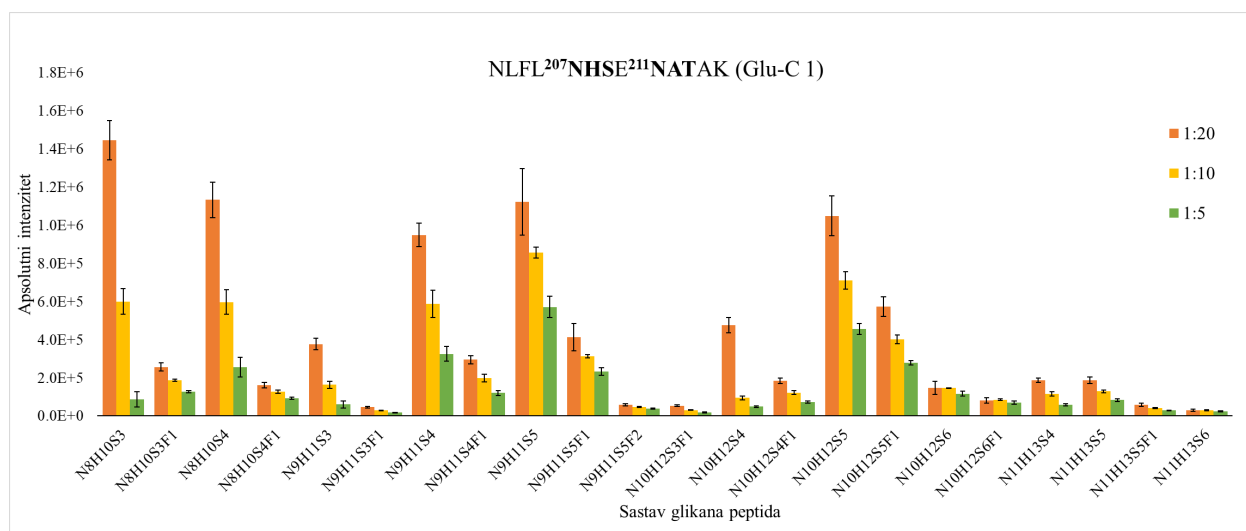
Pri ispitivanju količine zrnaca od 1 do 5 μL (Slika 5B, 5C), intenzitet vrpce počeo je slabiti tek s volumenom zrnaca od 2 i 1 μL (Slika 5C). Budući da se količina izoliranog proteina ne povećava reproducibilno s većom količinom zrnaca, zaključili smo da volumen od 3 μL zrnaca ima dovoljan kapacitet za izolaciju haptoglobina iz 10 μL plazme. Dodatno, ispitan je i manji volumen početnog materijala, 5 μL plazme. Manji volumen izoliran je s 1, 3 i 5 μL zrnaca (Slika 6). Izolacija haptoglobina iz 5 μL plazme u kombinaciji s 3 i 5 μL zrnaca pokazala je podjednake količine izoliranog haptoglobina, gledajući SDS-PAGE, a osim toga, glikanski profili oba uvjeta analizirani LC-MS-om bili su usporedivi (Slika 7). Proces optimizacije izolacije pokazao je da je 3 μL zrnaca s protutijelom na haptoglobin dovoljno za izolaciju haptoglobina iz 5 μL plazme.



Slika 7. Izolacija haptoglobina iz 5 μL plazme upotrebom 3 μL i 5 μL zrnaca s protutijelom na haptoglobin. Prikazane su prosječne vrijednosti relativnog intenziteta triptičkih glikopeptida za šest replikata u svakom uvjetu, vertikalna linija – standardna devijacija replikata.

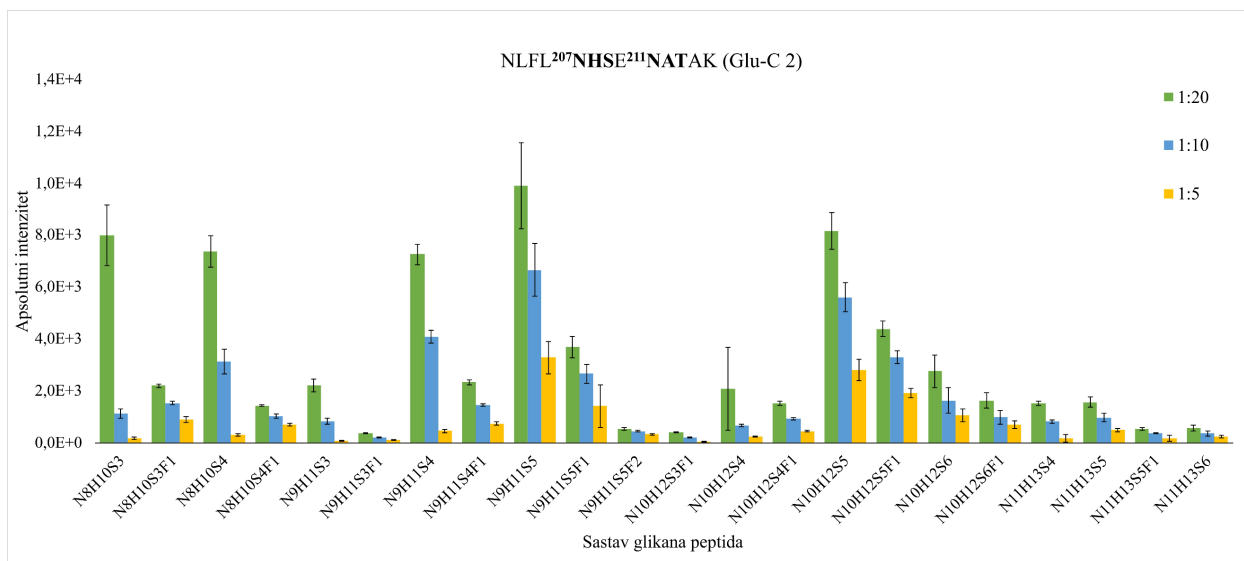
3.1.2. Optimizacija proteolize

Beta lanac haptoglobina sadrži četiri glikozilacijska mjesta, kako je opisano u poglavlju 1.3.3. (21) i poželjna kombinacija enzima za njegovu razgradnju su tripsin i endoproteinaza Glu-C. U suprotnome, ako se koristi samo tripsin, jedan glikopeptid u svojoj strukturi sadrži dva glikozilacijska mjesta, čije profile glikana ne možemo razlikovati. Uvođenje endoproteinaze Glu-C u razgradnju haptoglobina omogućilo je analizu četiri glikopeptida zasebno. Međutim, u uzorcima gdje je primijenjena kombinacija enzima, identificiran je i triptički glikopeptid s dva glikozilacijska mjesta kao rezultat neučinkovite razgradnje Glu-C-em. Ispitivanje različitih omjera u kojima je Glu-C dodan u uzorke, pokazalo je da količina dodanog enzima ima utjecaj na apsolutni intenzitet triptičkog peptida. Uvjet u kojem je Glu-C dodan u omjeru 1:5 u odnosu na protein imao je najslabije signale triptičkog peptida (Slika 8).



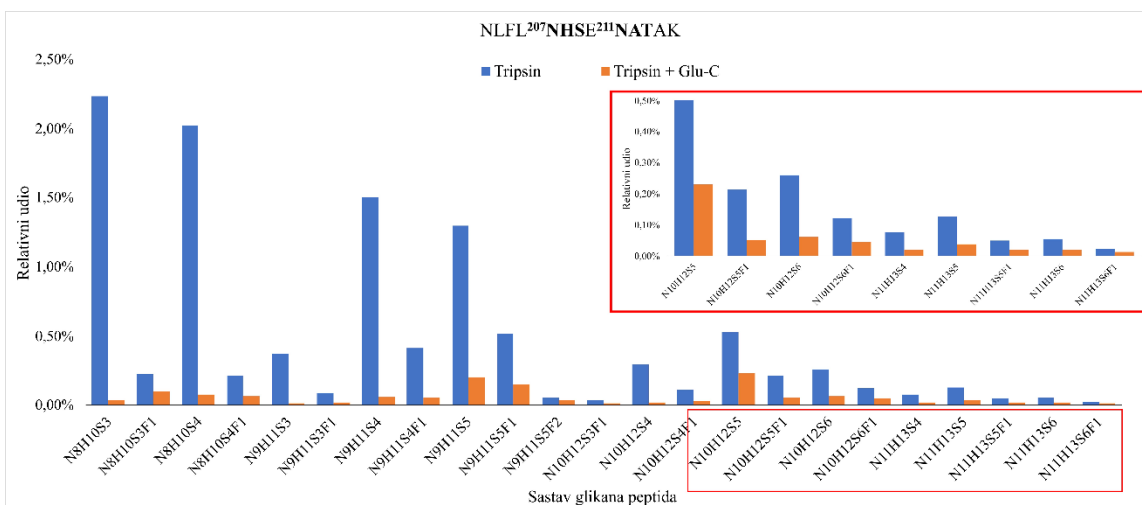
Slika 8. Usporedba apsolutnog intenziteta triptičkog glikopeptida pri razgradnji kombinacijom enzima, s tripsinom u omjeru 1:20 i Glu-C-em u različitim omjerima (1:20, 1:10 i 1:5), vertikalna linija- standardna devijacija triplikata. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na N-acetilheksozamin, H na heksozamin, S na sialinsku kiselinu, F na fukožu, a x na broj tih struktura u sastavu glikana.

Ovaj rezultat također je potvrđen s Glu-C-em od drugog proizvođača (Slika 9).



Slika 9. Usporedba apsolutnog intenziteta triptičkog glikopeptida pri razgradnji kombinacijom enzima, s tripsinom u omjeru 1:20 i Glu-C-em drugog proizvođača u različitim omjerima (1:20, 1:10 i 1:5), vertikalna linija- standardna devijacija triplikata. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na *N*-acetilheksosamin, H na heksozamin, S na sijalinsku kiselinu, F na fukožu, a x na broj tih struktura u sastavu glikana.

Nadalje, kako bi se poboljšala učinkovitost razgradnje Glu-C-em u uvjetu kombinacije enzima, Glu-C je dodan u uzorke u dvije porcije u krajnjem omjeru 1:5. Druga porcija enzima dodana je nakon pet sati inkubacije pri 37 °C i nastavljena je preko noći. Ovaj uvjet uspoređen je s razgradnjom samo s tripsinom na osnovi relativnog udjela triptičkog peptida NLFL²⁰⁷NHSE²¹¹NATAK izraženog u postotcima (Slika 10). Relativni udio dobiven je nakon što je apsolutni intenzitet svakog triptičkog glikopeptida normaliziran na apsolutni intenzitet peptida haptoglobina, čiji je intenzitet bio usporediv u uzorcima u oba uvjeta. To je peptid aminokiselinskog slijeda GSFPWQAK, mase 920,46252 m/z. Učinkovitost razgradnje s kombinacijom enzima padala je s rastom kompleksnosti glikana koji se nalaze na glikozilacijskim mjestima Asn 207 i Asn 211. Uz to, prisustvo fukoze u strukturi također je rezultiralo manjom učinkovitosti razgradnje. Tako, npr. najjednostavniji sastav glikana N8H10S3 na peptidu NLFL²⁰⁷NHSE²¹¹NATAK ima približno 60 puta manji udio u uzorcima s kombinacijom enzima u odnosu na uzorke sa samim tripsinom što ukazuje na visoku učinkovitost razgradnje tog peptida s Glu-C-em. S druge strane, sastav N10H12S5, koji u strukturi sadrži razgranatije glikane, ima približno samo dva puta manji udio u uvjetu kombinacije enzima, što ukazuje na smanjenu učinkovitost razgradnje Glu-C-em. Ovakvi rezultati mogli bi se objasniti teškom pristupačnošću mjesta cijepanja na peptidu za enzim. Interakcija proteina s enzimom može biti ometana



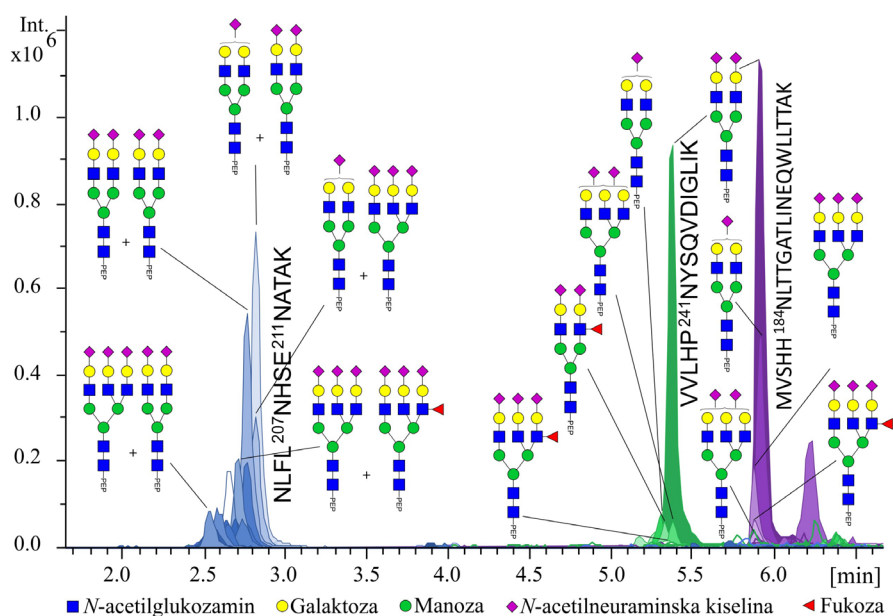
Slika 10. Usporedba učinkovitosti razgradnje tripsinom u omjeru 1:20 i kombinacijom tripsina u omjeru 1:20 i Glu-C-a u omjeru 1:5 na osnovi triptičkih glikopeptida NLFL²⁰⁷NHSE²¹¹NATAK; uvećani prikaz zadnjih devet struktura u crvenom pravokutniku. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na N-acetilheksozamin, H na heksozamin, S na sijalinsku kiselinu, F na fukozu, a x na broj tih struktura u sastavu glikana.

glikanskom strukturom koja se tu nalazi s obzirom na to da je glikozilacijsko mjesto odmah nakon mjesta cijepanja u aminokiselinskom slijedu. Rezultati su pokazali da razgradnja kombinacijom enzima nije potpuno učinkovita i ovisna je o sastavu glikana. S obzirom na to da bi bilo teško kroz analizu pratiti stupanj neučinkovitosti razgradnje Glu-C-em i da na taj način profil glikana za mjesto Asn 207 i Asn 211 ne bi bio potpuno realan, za razgradnju proteina odabran je tripsin, iako na taj način gubimo informacije o pojedinačnim glikanima na glikozilacijskim mjestima Asn 207 i Asn 211 i umjesto toga dostupan je samo ukupni sastav glikana na glikopeptidu NLFL²⁰⁷NHSE²¹¹NATAK.

Nakon optimizacije koraka izolacije i proteolize, konačna metoda analize glikopeptida haptoglobina sustavom LC-MS podrazumijeva izolaciju haptoglobina pomoću 3 µL zrnaca obloženih protutijelom na haptoglobin nanesenih sa 17 µL 1x PBS, pH 7,4 na Orochem pločicu s 96 jažica. Sljedeći korak u izolaciji je ispiranje sa 600 µL 1x PBS, pH 7,4. Nakon toga 5 µL plazme ili seruma nanosi se na jažice u 100 µL 1x PBS, pH 7,4 i inkubira sa zncima jedan sat pri sobnoj temperaturi uz jednolično miješanje. Prije eluiranja haptoglobina sa zrnaca s 0,1 M formijatnom kiselinom, jažice se ispiru sa 600 µL 1x PBS, pH 7,4 i 600 µL ultra čiste vode na vakuum uređaju za pločice, a potom se eluati suše u vakuum centrifugi 2,5 sata pri temperaturi od 50 °C. Proteoliza uključuje sve korake opisane u poglavlju 2.3.2., a rezultat LC-MS analize opisane u poglavlju

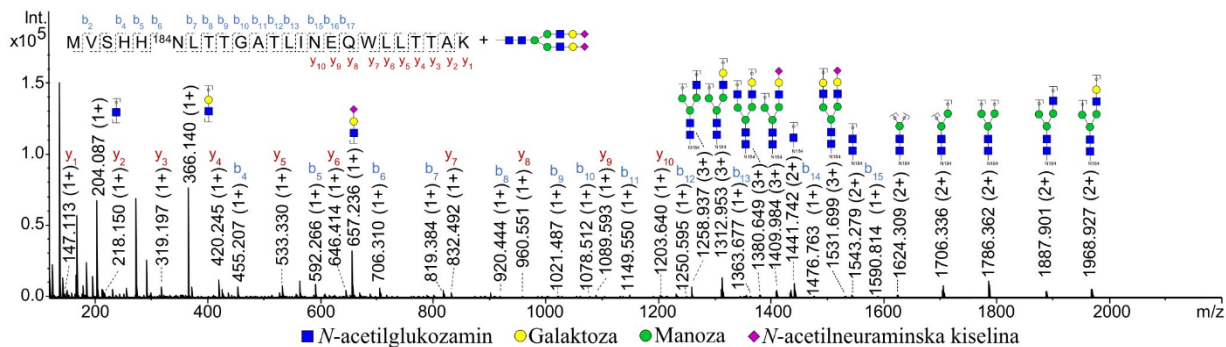
2.3.3. su tri skupine triptičkih glikopeptida kromatografski razdvojene, ali grupirane na osnovi aminokiselinskog slijeda pri sličnom retencijskom vremenu. Prvi se eluira triptički peptid s dva glikozilacijska mjesta NLFL²⁰⁷NHSE²¹¹NATAK, između 2,5 i 3 minute, dok se druga dva peptida s pojedinačnim glikozilacijskim mjestima eluiraju u razmaku manjem od jedne minute, VVLHP²⁴¹NYSQVDIGLIK između 5 i 5,5 minuta, a MVSHH¹⁸⁴NLTTGATLINEQWLLTTAK oko 6. minute (Slika 11).

3.1.3. N-glikopofiliranje haptoglobina



Slika 11. Kromatografsko razdvajanje skupina triptičkih glikopeptida haptoglobina s pet najzastupljenijih predloženih glikanskih struktura po skupini.

Fragmentacijski spektri glikopeptida filtrirani su na osnovi prethodno navedenih dijagnostičkih iona u programu Data analysis. Peptid s glikozilacijskim mjestom Asn 184 potvrđen je na osnovi fragmenta peptida s N-acetilheksozaminom u dvostrukom naboju, 1441,7395 m/z. Masa za peptid s dva glikozilacijska mjesta, Asn 207 i Asn 211, identificirana je u jednostrukom naboju, 1458,7536 m/z. Peptid s četvrtim glikozilacijskim mjestom, Asn 241 potvrđen je na osnovi mase peptida s N-acetilheksozaminom u dvostrukom naboju, 999,5490 m/z. Slika 12 – 14 prikazuju fragmentacijske spektre za najzastupljeniji triptički glikopeptid unutar svake skupine glikopeptida. U desnom dijelu spektra vidljivi su fragmenti koji potvrđuju o kojem glikanu se radi, a u lijevom dijelu *b* i *y* ioni koji potvrđuju aminokiselinski slijed peptida.



Slika 12. Fragmentacijski spektar najzastupljenijeg glikopeptida unutar skupine glikopeptida s glikozilacijskim mjestom Asn 184. y: y ioni peptida; b: b ioni peptida.

Uz fragmentacijske spektre, pregledani su i MS spektri u odgovarajućem retencijskom vremenu gdje se na osnovi razlike u masi monosaharida između prekursorskih iona lista analita nadopunila glikanskim formama za svaku skupinu triptičkih glikopeptida. Dodatno su provjerene mase iz literaturnih podataka prethodno anotiranih struktura glikopeptida haptoglobina te je finalizirana lista za relativnu kvantifikaciju (Tablica 3 - Tablica 5).

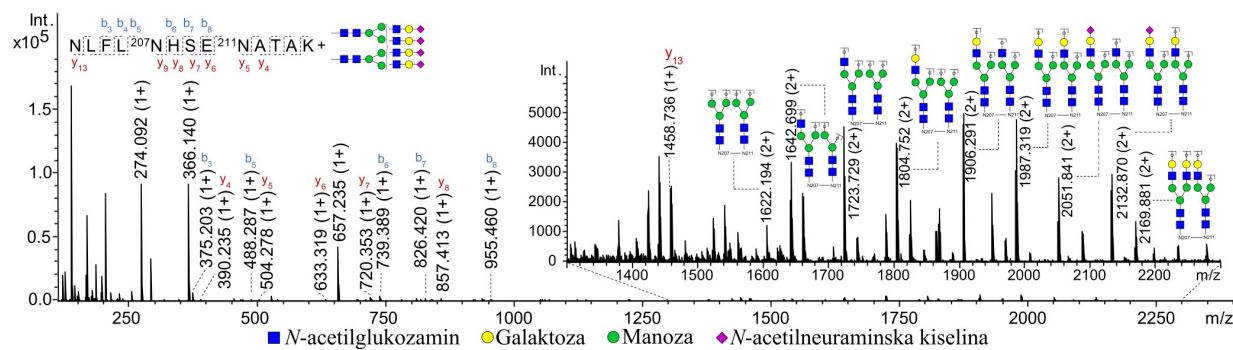
Tablica 3. Pregled anotiranih struktura na glikozilacijskom mjestu Asn 184. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na N-acetilheksozamin (plavi kvadrat), H na heksozamin (zeleni i žuti krugovi), S na sijalinsku kiselinu (ljubičasti dijament), F na fukozu (crveni trokut), a x na broj tih struktura u sastavu glikana.

Glikozilacijsko mjesto	Sastav glikana	Monoizotopna masa glikopeptida [M+H] ⁺	Monoizotopna masa ostalih naboja glikopeptida				Predložena struktura
			[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+4H] ⁴⁺	[M+5H] ⁵⁺	
Asn 184	N4H5S1	4593,069	-	1531,695	1149,023	919,420	
	N4H5S1F1	4739,127	-	1580,381	1185,537	948,631	
	N4H5S2	4884,165	-	1628,726	1221,797	977,639	
	N4H5S2F1	5030,223	-	1677,412	1258,311	1006,850	
	N5H6S1	4958,201	-	1653,405	1240,306	992,446	
	N5H6S2	5249,297	-	1750,437	1313,080	1050,665	
	N5H6S2F1	5395,355	-	-	1349,594	1079,877	
	N5H6S3	5540,392	-	-	1385,854	1108,884	
	N5H6S3F1	5686,450	-	-	1422,368	1138,096	
	N6H7S2	5614,429	-	-	1404,363	1123,692	
	N6H7S3	5905,524	-	-	1477,137	1181,911	

Tablica 4. Pregled anotiranih ukupnih sastava glikana na glikozilacijskim mjestima Asn 207 i Asn 211. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na *N*-acetilheksozamin (plavi kvadrat), H na heksozamin(zeleni i žuti krugovi), S na sijalinsku kiselinu (ljubičasti dijament), F na fukožu (crveni trokut), a x na broj tih struktura u sastavu glikana.

Glikozilacijsko mjesto	Sastav glikana	Monoizotopna masa glikopeptida [M+H] ⁺	Monoizotopna masa ostalih naboja glikopeptida				Predložena struktura
			[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+4H] ⁴⁺	[M+5H] ⁵⁺	
Asn 207/Asn 211	N8H10S2	5868,278	-	1762,701	1322,277	1058,023	
	N8H10S2F1	6014,336	-	-	1358,792	1087,235	
	N8H10S2F2	5360,124	-	-	1395,306	1116,446	
	N8H10S3	5506,182	-	-	1395,051	1116,242	
	N8H10S3F1	5651,220	-	-	1431,566	1145,454	
	N8H10S3F2	5797,278	-	-	1468,050	1174,666	
	N8H10S4	5868,278	-	-	1467,825	1174,461	
	N8H10S4F1	6014,336	-	-	1504,339	1203,673	
	N9H11S1	5360,124	-	1787,380	1340,786	1072,831	
	N9H11S1F1	5506,182	-	-	1377,301	1102,042	
	N9H11S2	5651,220	-	-	1413,560	1131,050	
	N9H11S2F1	5797,278	-	-	1450,075	1160,261	
	N9H11S3	5942,315	-	-	1486,334	1189,269	
	N9H11S3F1	6088,373	-	-	1522,849	1218,480	
	N9H11S4	6233,411	-	-	1559,108	1247,488	
	N9H11S4F1	6379,468	-	-	1595,623	1276,699	
	N9H11S5	6524,506	-	-	1631,882	1305,707	
	N9H11S5F1	6670,564	-	-	1668,396	1334,919	
	N9H11S5F2	6816,622	-	-	1704,911	1364,130	
	N10H12S2	6016,352	-	-	1504,843	1204,076	
	N10H12S2F1	6162,410	-	-	1541,358	1233,288	
	N10H12S3	6307,447	-	-	1577,617	1262,295	
	N10H12S3F1	6453,505	-	-	1614,232	1291,507	
	N10H12S4	6598,543	-	-	1650,391	1320,514	
	N10H12S4F1	6744,601	-	-	1686,906	1349,726	
N10H12S5	6889,638	-	-	1723,165	1378,733		

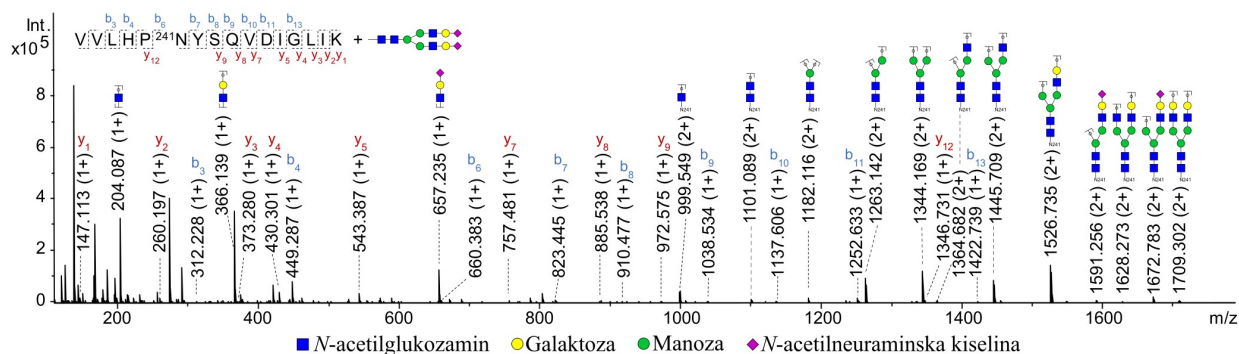
Glikozilacijsko mjesto	Sastav glikana	Monoizotopna masa glikopeptida [M+H] ⁺	Monoizotopna masa ostalih naboja glikopeptida				Predložena struktura
			[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+4H] ⁴⁺	[M+5H] ⁵⁺	
Asn 207/Asn 211	N10H12S5F1	7035,696	-	-	1759,679	1407,945	
	N10H12S6	7180,734	-	-	1795,939	1436,953	
	N10H12S6F1	7326,791	-	-	-	1466,164	
	N10H12S6F2	7472,849	-	-	-	1495,376	
	N11H13S4	6963,675	-	-	1741,674	1393,541	
	N11H13S4F1	7109,733	-	-	1778,189	1422,752	
	N11H13S5	7254,770	-	-	-	1451,760	
	N11H13S5F1	7400,828	-	-	-	1480,971	
	N11H13S6	7545,866	-	-	-	1509,979	
	N11H13S6F1	7691,924	-	-	-	1539,191	
	N12H14S4	7328,807	-	-	-	1466,567	
	N12H14S5	7619,903	-	-	-	1524,786	
	N12H14S6	7910,998	-	-	-	1583,005	



Slika 13. Fragmentacijski spektar najzastupljenijeg glikopeptida unutar skupine glikopeptida s dva glikozilacijska mjesta Asn 207 i Asn 211. y: y ioni peptida; b: b ioni peptida.

Tablica 5. Pregled anotiranih ukupnih sastava glikana na glikozilacijskom mjestu Asn 241. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na *N*-acetilheksozamin (plavi kvadrat), H na heksozamin (zeleni i žuti krugovi), S na sijalinsku kiselinu (ljubičasti dijament), F na fukozu (crveni trokut), a x na broj tih struktura u sastavu glikana.

Glikozilacijsko mjesto	Sastav glikana	Monoizotopna masa glikopeptida [M+H] ⁺	Monoizotopna masa ostalih naboja glikopeptida				Predložena struktura
			[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+4H] ⁴⁺	[M+5H] ⁵⁺	
Asn 241	H4N3S1	3343,556	1672,282	1115,190	836,644	669,517	
	N4H5S1	3708,688	-	1236,901	927,927	742,543	
	N4H5S1F1	3854,746	-	1285,587	964,442	771,755	
	N4H5S2	3999,784	-	1333,933	1000,701	800,763	
	N4H5S2F1	4145,842	-	1382,619	1037,216	829,974	
	N5H6S1	4073,820	-	1358,612	1019,211	815,570	
	N5H6S2	4364,916	-	1455,643	1091,984	873,789	
	N5H6S2F1	4510,974	-	1504,329	1128,499	903,001	
	N5H6S3	4656,011	-	1552,675	1164,758	932,008	
	N5H6S3F1	4802,069	-	1601,361	1201,273	961,220	
	N6H7S1	4438,953	-	1480,322	1110,494	888,596	
	N6H7S2	4730,048	-	1577,354	1183,267	946,815	
	N6H7S2F1	4876,106	-	1626,040	1219,782	976,027	
	N6H7S3	5021,143	-	1674,386	1256,041	1005,034	
	N6H7S3F1	5167,201	-	1723,072	1292,556	1034,246	
	N6H7S4	5312,239	-	1771,418	1328,815	1063,254	
N6H7S4F1	5458,297	-	-	1365,330	1092,465		



Slika 14. Fragmentacijski spektar najzastupljenijeg glikopeptida unutar skupine glikopeptida s glikozilacijskim mjestom Asn 241. y: y ioni peptida; b: b ioni peptida.

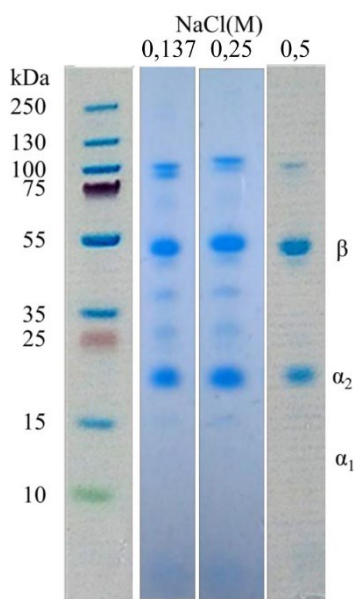
3.1.4. Ponovljivost i obnovljivost metode

Relativna kvantifikacija glikopeptida haptoglobina u uzorcima standarda seruma i VisuConF plazme napravljena je u LacyTools-u. Nakon kontrole kvalitete opisane u poglavlju 2.3.6., ponovljivost i obnovljivost metode procijenjena je na preostalim uzorcima, 41 od 46 uzoraka standarda seruma i 50 od 56 uzoraka VisuCon plazme, kroz sedam vremenskih točki. Prosječna vrijednost CV za sve kvantificirane glikopeptide u uzorcima standarda seruma za glikozilacijsko mjesto Asn 184 bila je između 4,54 % u petoj i 12,18 % u četvrtoj vremenskoj točki. Za glikopeptide s dva glikozilacijska mjesta ponovljivost je bila najbolja u šestoj vremenskoj točki s prosječnom vrijednosti CV-a za sve kvantificirane glikopeptide 8,35 %, dok je najveći CV od 14,24 % izračunat u trećoj vremenskoj točki. Vrijednost CV-a za glikozilacijsko mjesto Asn 241 kretala se između 12,15 i 23,8 %. Ponovljivost na uzorcima VisuCon plazme dala je slične vrijednosti između vremenskih točaka pa je tako prosječni CV po vremenskoj točki bio u rasponu 6 – 10,77 % za Asn 184, 8,76 % – 13,96 % za Asn 207/Asn 211 i 14,44 % – 25,04 % za Asn 241. Prosječna vrijednost CV-a za sve vremenske točke bila je 7,56 % za Asn 184, 10,7 % za Asn 207/Asn 211 i 16,71 % za Asn 241 u uzorcima standarda, a vrlo slične vrijednosti dobivene su i za uzorke VisuCon plazme. Na osnovi navedenih vrijednosti možemo zaključiti da metoda za analizu glikopeptida haptoglobina LC-MS metodom ima dobru ponovljivost i obnovljivost te je primijenjena u sklopu primarnog istraživanja.

3.2. Razvoj metode za analizu ukupnih N-glikana haptoglobina tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti

U prethodnom poglavlju opisana je visokoprotočna metoda za analizu glikozilacije haptoglobina koja podrazumijeva izolaciju iz malog volumena početnog materijala, 5 μ L plazme ili seruma, a slijedi je analiza svakog glikozilacijskog mjesta zasebno što daje detaljne informacije o glikozilaciji proteina. Prije detaljnog uvida u glikozilaciju proteina, vrijedno je imati informaciju o njegovim ukupnim N-glikanima i u tu svrhu kroz ovo istraživanje razvijena je visokoprotočna metoda analize ukupnog N-glikoma haptoglobina upotrebom UHPLC-FLD-a. Prije same analize bilo je potrebno ispitati optimalnu količinu izoliranog proteina za fluorescentnu detekciju, što je uključivalo optimizaciju izolacije, deglikozilacije i obilježavanja N-glikana haptoglobina.

3.2.1. Optimizacija obogaćivanja



Slika 15. Čistoća eluata pri pročišćavanju s puferom različite ionske jakosti (0,137; 0,25 i 0,5 M NaCl). Lanci haptoglobina označeni na SDS-PAGE-u: teški β lanac te laki α_1 i α_2 lanci. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54).

Izolacija haptoglobina ispitana je na monolitnoj pločici na koju su imobilizirana protutijela na haptoglobin. Monolitni nosači u formatu pločice s 96 jažica do sada su omogućili izolaciju imunoglobulina G (IgG) (32), transferina (33) i fibrinogena iz krvne plazme (53). Glavna prednost ovog pristupa je sposobnost izvođenja ujednačene i brze (gliko)proteinske izolacije na visokoučinkovit način.

Optimalni uvjeti za izolaciju postignuti su ispitivanjem različitog volumena početnog materijala i povećanjem stupnja čistoće dobivenog eluata. Ispitana su tri različita početna volumena plazme, 50, 100 i 200 μL . Koncentracije haptoglobina izoliranog iz plazme izmjerene na spektrofotometru Nanodrop 8000 iznosile su: 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ za 50, 0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ za 100 odnosno 0,24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ za izolaciju iz 200 μL plazme. Volumen plazme od 100 μL odabran je kao početni volumen, budući da je izolacija iz 50 μL rezultirala malom količinom proteina i posljedično lošim signalima fluorescencije, dok izolacija iz 200 μL nije donijela linearno povećanje količine izoliranog haptoglobina.

Povećanje ionske jakosti pufera za ispiranje s 0,137 M, preko 0,25 M pa do najviše koncentracije od 0,5 M NaCl-a, rezultiralo je smanjenjem nespecifičnog vezanja drugih proteina plazme pa tako i kontaminacije albuminom i IgG-om, kao što je procijenjeno na SDS-PAGE-u (Slika 15). Čistoća izoliranog haptoglobina ispranog s puferom najveće ispitane ionske jakosti (0,5 M NaCl) dodatno je potvrđena proteomskom analizom u MaxQuant programu, kako je opisano u poglavlju 2.4.4.1. Iz rezultata (Tablica 6) vidljivo je kako je prosječni ukupni intenzitet haptoglobina bio 82,59 %, ukazujući na visoko obogaćivanje haptoglobina nakon izolacije na anti-haptoglobin monolitnoj pločici u jednom koraku izravno iz uzorka razrijeđene plazme.

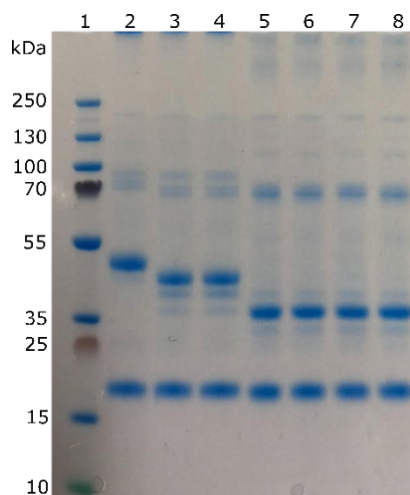
Tablica 6. MaxQuant analiza čistoće eluata nakon izolacije na anti-haptoglobin pločici. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54).

Postotak ukupnog intenziteta (%)	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Prosječna vrijednost
Haptoglobin	77,63	83,18	86,96	82,59
Apolipoprotein L1	1,44	1,81	1,74	1,66
Ig mu lanac C regija	1,5	1,18	1,45	1,38
C4b-vezujući protein alfa lanac	1,05	1,7	0,75	1,17
Ostali glikozilirani kontaminanti	3,62	5,02	1,31	3,32
Ostali neglikozilirani kontaminanti	9,67	4,32	3,29	5,76
Kontaminanti intenziteta <1%	5,08	2,79	4,49	4,12

3.2.2. Optimizacija denaturacije, deglikozilacije i obilježavanja

Metoda opisana u poglavlju 2.4.2., prethodno objavljena i primijenjena za denaturaciju, deglikozilaciju i obilježavanje IgG-a (55), ispitana je i za obilježavanje N-glikana haptoglobina. Rezultat je pokazao nizak intenzitet fluorescencije, nedovoljan za kvantifikaciju. Moguće objašnjenje takvog rezultata može biti nepotpuna denaturacija i deglikozilacija. Također, intenzitet fluorescentnih signala prvenstveno ovisi o količini polaznog proteina i soli, kao i o izboru fluorescentne boje (Keser et al., 2018). Prethodno su Mann i sur. pokazali kako deglikozilacija nije

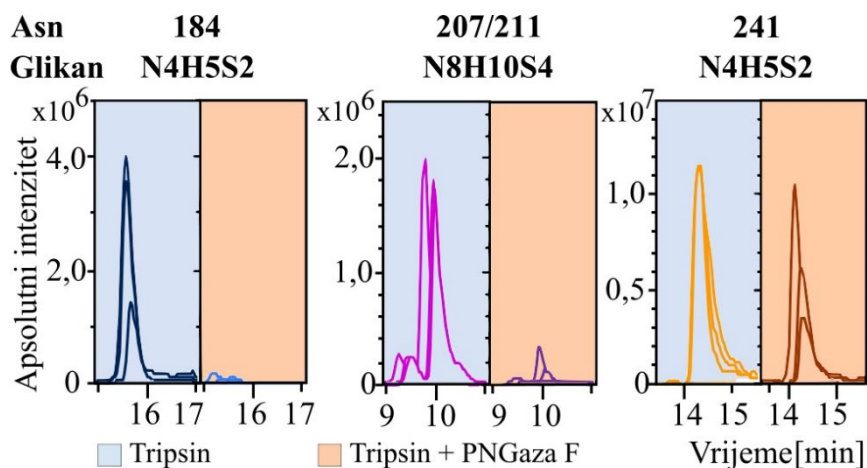
bila potpuna kod kompleksne glikozilacije proteina kao što je haptoglobin zbog uvjeta reakcije (56).



Slika 16. Učinkovitost deglikozilacije pri različitim uvjetima provjerena SDS-PAGE-om. Marker (jažica 1); glikozilirani haptoglobin, 5 μ g (jažica 2); deglikozilacija u vodi s 1,33 % SDS-om i 4 % igeal-CA630 u omjeru 1:1 (jažice 3, 4); deglikozilacija u 25 mM amonijevom formijatu (jažice 5,6) i vodi (jažice 7,8) s 0,4 % SDS-om i 1 % igeal-CA630 u omjeru 1:2,5. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54).

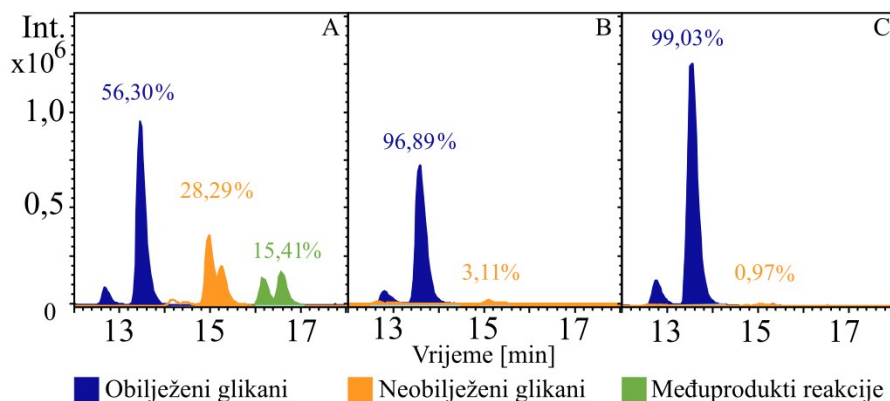
Uzimajući sve navedeno u obzir, optimizacija analize N-glikoma haptoglobina provedena je u nekoliko koraka. Prvo su ispitani različiti volumeni eluata za korak deglikozilacije i obilježavanja N-glikana i pokazalo se da 75 μ L sadrži optimalnu količinu haptoglobina za daljnje korake. Zatim, prema Mann i sur., najučinkovitiji postupak za oslobađanje N-glikana uključuje otapanje uzoraka u 50 mM amonijevom formijatu, pH 8,5, koji sadrži SDS, nakon čega slijedi dodavanje između 1 % i 1,5 % NP-40 (Mann et al., 1994.). Ispitivanje različitih uvjeta denaturacije i deglikozilacije pokazalo je da je najučinkovitije oslobađanje N-glikana upotrebom 0,4 % SDS-a i 1 % Igepal-CA630 u omjeru 1:2,5 uz dodatak 24 mU/ μ L enzima PNGase F (Slika 16, jažice 5-8). Otapanje SDS-a u vodi (Slika 16, jažice 7-8) ili 25 mM amonijevom formijatu pH 8,0 (Slika 16, jažice 5-6) nije imalo utjecaja na oslobađanje N-glikana. Prisutnost različitih vrpca koje odgovaraju deglikoziliranom β lancu haptoglobina upućuju na nepotpunu deglikozilaciju i mogu biti rezultat nepotpunog oslobađanja N-glikana specifičnih za određeno glikozilacijsko mjesto. Stoga je vrpca deglikoziliranog β lanca s najnižom masom od 35 kDa i uz pretpostavku najučinkovitijeg mogućeg oslobađanja N-glikana, tretirana tripsinom (57) i analizirana na razini glikopeptida kako bi se procijenila učinkovitost deglikozilacije. Analiza glikopeptida pokazala je da samo glikozilacijsko mjesto Asn 241 ostaje okupirano N-glikanima nakon deglikozilacije. S obzirom na to, napravljena je analiza na triplikatima eluata haptoglobina koji su tretirani tripsinom, a potom je dio uzorka

tretiran s PNGazom te je napravljena usporedba apsolutnog intenziteta glikopeptida u uzorcima tretiranim samo tripsinom i onima tretiranim dodatno i PNGazom F. Apsolutni intenziteti najzastupljenijeg glikopeptida po glikozilacijskom mjestu (Slika 17) nakon deglikozilacije pomoću PNGaze F prisutni su u najvećoj mjeri samo za Asn 241 bez obzira na varijaciju među triplikatima.



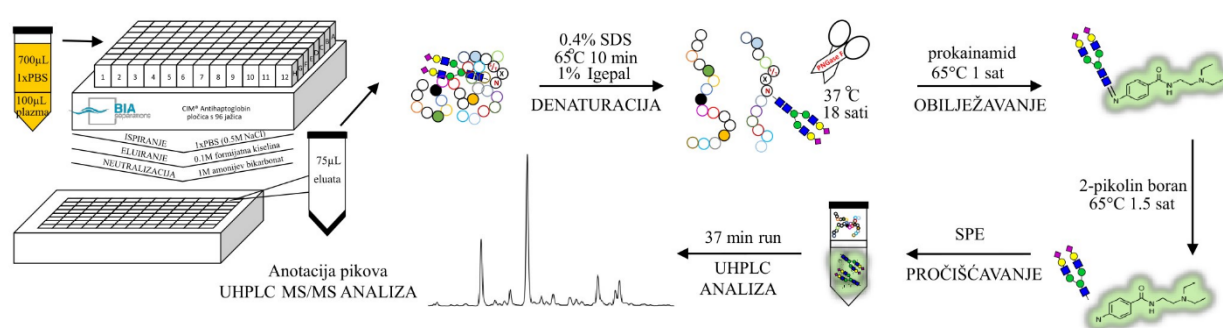
Slika 17. Učinkovitost oslobađanja N-glikana haptoglobina usporedbom apsolutnog intenziteta najzastupljenijeg glikopeptida po glikozilacijskom mjestu nakon tretiranja samo tripsinom i reakcije s tripsinom i PNGase F. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na *N*-acetilheksosamin, H na heksosamin, S na sijalinsku kiselinu, F na fukožu, a x na broj tih struktura u sastavu glikana. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54).

Objašnjenje ovakvih rezultata može biti položaj i nedostupnost glikozilacijskog mjesta enzimu ili nedovoljna količina enzima. U tu svrhu, ispitana je povećana koncentracija PNGaze F i to 10 puta, međutim, ovaj pristup nije poboljšao učinkovitost oslobađanja N-glikana, tako da je u konačnoj metodi korišteno 24 mU/ μ L PNGaze F.



Slika 18. Obilježavanje N-glikana haptoglobina prokainamidom reakcijom reduktivne aminacije u jednom koraku – A, u dva koraka – B i u dva koraka s dvostrukom koncentracijom prokainamida i 2-PB – C. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54).

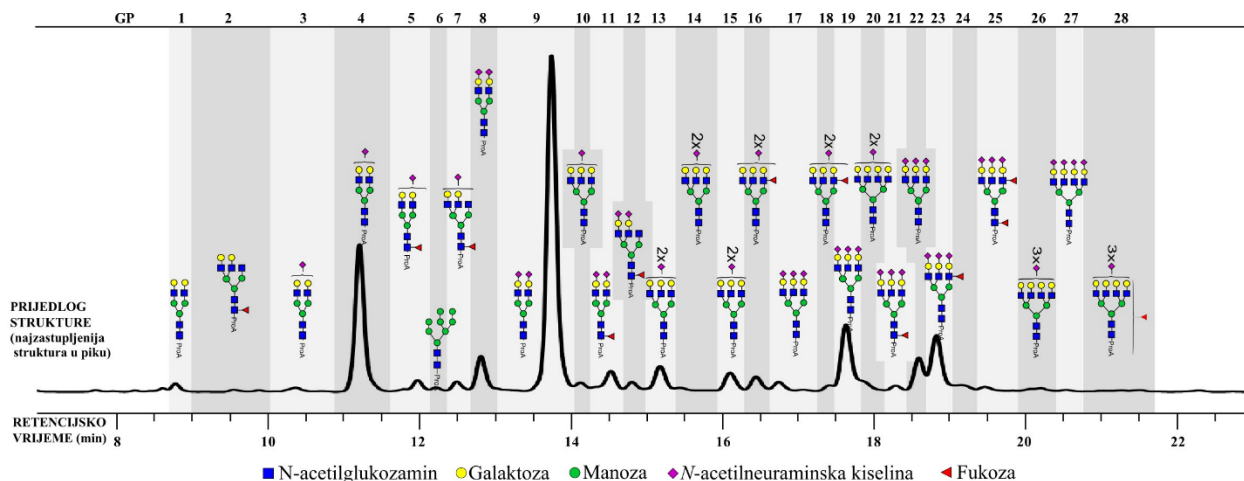
Obilježavanje oslobođenih N-glikana ispitano je i s prokainamidom, jer je poznato da obilježavanje N-glikana ovom fluorescentnom bojom rezultira značajno višim intenzitetima fluorescencije u usporedbi s tradicionalno korištenim 2-AB-om (44,58), što je bio rezultat i u ovom istraživanju. Dodatno, usporedba obilježavanja u jednom ili dva koraka pokazala je da obilježavanje u dva koraka ima prednost, jer na taj način u uzorku ne zaostaje intermedijarni produkt reakcije reduktivne aminacije te je ukupna učinkovitost obilježavanja značajno veća (Slika 18A,B). Dvostruka koncentracija prokainamida i 2-PB-a rezultirala je dodatnim poboljšanjem učinkovitosti obilježavanja (Slika 18C).



Slika 19. Protokol za analizu N-glikoma haptoglobina UHPLC-om. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54)

Nakon ispitivanja uvjeta denaturacije i deglikozilacije haptoglobina te obilježavanja njegovih N-glikana, možemo zaključiti da optimalni uvjeti podrazumijevaju sušenje 75 µL eluata haptoglobina u vakuum centrifugi prije denaturacije. Korak denaturacije obuhvaća otapanje haptoglobina u 20 µL 0,4 % (v/v) SDS-a i inkubaciju pri 65 °C tijekom 10 minuta, a potom dodavanje 20 µL 1 % Igepal-CA630 i nakon toga inkubaciju s 24 mU/µL enzima PNGase F u 5x PBS preko noći pri 37 °C. Sljedeći korak uključuje fluorescentno obilježavanje N-glikana haptoglobina u dva koraka. Prvi korak je inkubacija pri 65 °C jedan sat s 43,2 mg/mL prokainamida u 25 µL smjese DMSO/octene kiseline (70:30, v/v), a nakon toga dodatnih sat i pol pri istoj temperaturi s 44,8 mg/mL 2-PB-a. Prije analize na UHPLC-u s fluorescentnim detektorom potrebno je napraviti pročišćavanje obilježenih N-glikana, kako je prethodno opisano u poglavlju 2.4.2 (Slika 19).

3.2.3. Anotacija N-glikoma haptoglobina



Slika 20. Predložena struktura svakog kromatografskog pika. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54).

Fluorescentno obilježeni N-glikani haptoglobina razdvojeni su u 28 kromatografskih pikova metodom opisanom u poglavlju 2.4.3. (Slika 20). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da N-glikom haptoglobina čine uglavnom glikani kompleksnog tipa, s najvećim udjelom diantennarnih glikana, zatim triantennarnih glikana i malom zastupljenošću tetraantennarnih glikana. Najzastupljenija struktura u N-glikomu haptoglobina je potpuno sijalinizirani diantennarni glikan bez fukoze i bez račvajućeg N-acetilglukozamina, koji je također najzastupljenija N-glikanska struktura u ukupnom N-glikomu seruma (59). Tablica 7 prikazuje sve anotirane strukture u kromatografskim pikovima razdvojenim unutar 22 minute. Dobiveni rezultati podupiru prethodno objavljene podatke o glikozilaciji haptoglobina (21), ali i proširuju zbirku identificiranih triantennarnih i tetraantennarnih struktura u usporedbi s prethodnom studijom o fluorescentno obilješnim N-glikanima haptoglobina (60). Repertoar neutralnih i nepotpuno galaktoziliranih glikana u prethodnim studijama (60,61) širi je u usporedbi s glikanima koje smo identificirali u ovom istraživanju. Međutim, manje kompleksni glikani objavljeni u radu O'Flaherty i sur. nisu potvrđeni i na razini glikopeptida (62–64) pa se njihova prisutnost u maloj količini može objasniti kontaminacijom drugim proteinima plazme, a djelomično i razlikama u korištenim metodološkim pristupima.

Tablica 7. Predložena struktura svakog kromatografskog pika. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na *N*-acetilheksosamin (plavi kvadrat), H na heksozamin (zeleni i žuti krugovi), S na sijalinsku kiselinu (ljubičasti dijament), F na fukozu (crveni trokut), a x na broj tih struktura u sastavu glikana. Preuzeto i prilagođeno iz Šimunović i sur., 2022 (54).

Glikanski pik (GP)	Glikan	%	Teoretska masa [M+H] ⁺	Teoretska masa [M+2H] ²⁺	Predložena struktura glikana	Detektirana masa [M+H] ⁺	Detektirana masa [M+2H] ²⁺	ppm [M+H] ⁺	ppm [M+2H] ²⁺
1	N4H5	-	1860,781	930,894		1860,779	-	-1,17	-
2	N5H5F1	43,7	2209,918	1105,463		2209,926	1105,479	3,62	14,47
	N4H4S1	32,8	1989,824	995,415		1989,823	995,437	-0,50	22,10
	N4H5F1	23,5	2006,839	1003,923		2006,840	1003,939	0,50	15,94
3	N4H5S1	73,9	2151,877	1076,442		2151,874	1076,461	-1,19	17,72
	N2H7	18,7	1778,728	889,867		1778,732	-	2,25	-
	N4H5F1	7,4	2006,839	1003,923		2006,832	-	-3,49	-
4	N4H5S1	-	2151,877	1076,442		2151,873	1076,459	-1,66	15,87
5	N4H5S1F1	81,8	2297,934	1149,471		2297,933	1149,490	-0,44	16,53
	N5H6	7,7	2225,913	1113,460		-	1113,477	-	15,27
	N2H8	5,4	1940,781	970,894		1940,777	-	-2,06	-
	N5H5S1F1	5,1	2501,014	1251,011		-	1251,014	-	2,40
6	N2H8	-	1940,781	970,894		1940,778	-	-1,55	-
7	N5H5S1F1	-	2501,014	1251,011		2500,998	1251,027	-6,40	12,79
8	N4H5S2	75,1	2442,972	1221,990		2442,970	1222,006	-0,81	13,40
	N4H5S1F1	19	2297,934	1149,471		2297,921	1149,491	-5,86	17,51
	N4H5S1	5,9	2151,877	1076,442		2151,904	1076,459	12,75	15,87
9	N4H5S2	74,4	2442,972	1221,990		2442,965	1222,005	-2,85	12,59
	N4H5S1	20	2151,877	1076,442		2151,863	1076,461	-6,31	17,72
	N5H6S1	5,6	2517,009	1259,008		-	1259,013	-	3,96
10	N5H6S1	-	2517,009	1259,008		2516,981	1259,026	-11,03	14,28
11	N4H5S2F1	94,2	2589,030	1295,019		2589,025	1295,033	-1,88	11,14
	N4H5S1F1	5,8	2297,934	1149,471		-	1149,484	-	11,31
12	N5H5S2F1	-	2792,934	1396,558		-	1396,572	-	10,02
13	N5H6S2	75,6	2808,104	1404,556		2808,117	1404,570	4,57	10,17
	N5H6S1F1	18	2663,067	1332,037		-	1332,050	-	9,76
	N5H6S1	6,3	2517,009	1259,008		-	1259,022	-	11,12

Glikanski pik (GP)	Glikan	%	Teoretska masa [M+H] ⁺	Teoretska masa [M+2H] ²⁺	Predložena struktura glikana	Detektirana masa [M+H] ⁺	Detektirana masa [M+2H] ²⁺	ppm [M+H] ⁺	ppm [M+2H] ²⁺
14	N5H6S2	79,2	2808,104	1404,556		-	1404,569	-	9,45
	N5H6S2F1	20,8	2954,162	1477,585		-	1477,585	-	0,22
15	N5H6S2	94,4	2808,104	1404,556		2808,080	1404,567	-8,61	8,03
	N5H6S1	5,6	2517,009	1259,008		-	1259,020	-	9,53
16	N5H6S2F1	79,5	2954,162	1477,585		2954,167	1477,595	1,67	6,99
	N6H7S1	20,5	2882,141	1441,574		-	1441,584	-	6,85
17	N5H6S3	66	3099,200	1550,103		-	1550,116	-	8,12
	N5H6S2F1	28,3	2954,162	1477,585		-	1477,598	-	9,02
	N6H7S1F1	5,9	3028,199	1514,603		-	1514,590	-	-8,58
18	N5H6S2F1	66,4	2954,162	1477,585		-	1477,599	-	9,70
	N5H6S3	33,6	3099,200	1550,103		-	1550,110	-	4,24
19	N5H6S3	90,8	3099,200	1550,103		-	1550,111	-	4,89
	N5H6S2	9,2	2808,104	1404,556		-	1404,566	-	7,12
20	N6H7S2	44,3	3173,236	1587,122		-	1587,124	-	1,37
	N5H6S3F1	34,2	3245,257	1623,132		-	1623,137	-	2,85
	N5H6S2F1	12,4	2954,162	1477,585		-	1477,588	-	2,25
	N6H7S1F1	9,1	3028,199	1514,603		-	1514,617	-	9,24
21	N5H6S3F1	-	3245,257	1623,132		-	1623,137	-	2,85
22	N5H6S3	90,8	3099,200	1550,103		-	1550,112	-	5,54
	N5H6S2	9,2	2808,104	1404,556		-	1404,568	-	8,54
23	N5H6S3F1	84,6	3245,257	1623,132		-	1623,138	-	3,47
	N5H6S2F1	7,9	2954,162	1477,585		-	1477,593	-	5,64
	N6H7S2	7,5	3173,236	1587,122		-	1587,122	-	0,11

Glikanski pik (GP)	Glikan	%	Teoretska masa [M+H] ⁺	Teoretska masa [M+2H] ²⁺	Predložena struktura glikana	Detektirana masa [M+H] ⁺	Detektirana masa [M+2H] ²⁺	ppm [M+H] ⁺	ppm [M+2H] ²⁺
24	N5H6S3F1	84,6	3245,257	1623,132		-	1623,139	-	4,08
	N6H7S3	29,9	3464,332	1732,670		-	1732,677	-	4,32
	N6H7S2F1	21,6	3319,294	1660,151		-	1660,150	-	-0,60
25	N5H6S3F2	-	3391,315	1696,165		-	1696,165	-	-0,12
26	N6H7S3	55,1	3464,332	1732,670		-	1732,666	-	-2,03
	N6H7S3F1	44,9	3610,390	1805,698		-	1805,694	-	-2,48
27	N6H7S4	-	3755,427	1878,217		-	1878,216	-	-0,65
28	N6H7S3F1	40,1	3610,390	1805,698		-	1805,694	-	-2,48
	N6H7S4F1	33,7	3901,485	1951,246		-	1951,206	-	-20,59
	N6H7S4	26,2	3755,427	1878,217		-	1878,204	-	-7,04

3.2.4. Ponovljivost i obnovljivost metode

Ponovljivost i obnovljivost metode procijenjena je na replikatima analiziranim u sedam vremenskih točaka. Prosječni CV za sve kromatografske pikove u različitim vremenskim točkama imao je vrijednosti u rasponu od najmanje 4,63 % u petoj, do najveće 9,17 % u četvrtoj vremenskoj točki, s prosječnom vrijednosti od 5,97 %, ukazujući na dobru preciznost metode. Kromatografski pik GP9 imao je najmanju varijaciju kroz sve vremenske točke s CV-em od 1,01 %, a GP20 je imao najviši CV od 13,83 %. GP9 ima najveći udio u N-glikomu haptoglobina i struktura koja je anotirana u tom piku je diantenarni glikan s dvije sijalinske kiseline. S druge strane, vrlo mali udio u kromatogramu otpada na GP20, na čijem retencijskom vremenu se u najvećem postotku eluira tetraantenarni glikan s dvije sijalinske kiseline. S obzirom na dobru ponovljivost i obnovljivost, ova metoda je primijenjena u sklopu validacijskog istraživanja.

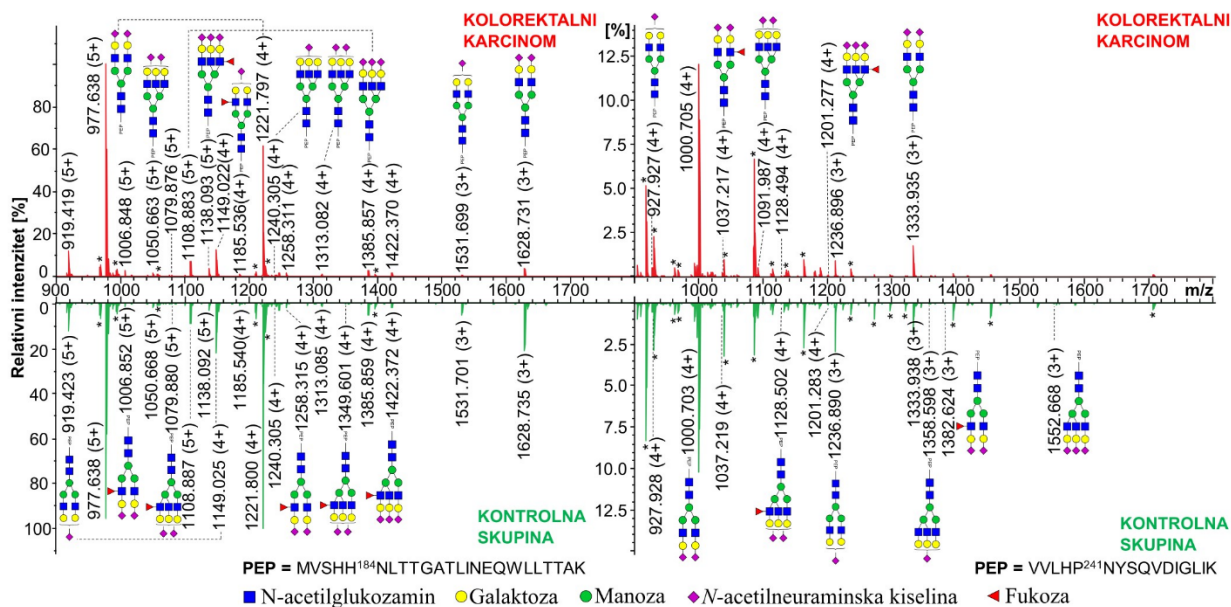
3.3. Analiza glikozilacije haptoglobina u kolorektalnom karcinomu

Prethodno opisane i optimirane visokoprotodne metode primijenjene su na uzorke plazme i seruma primarnog, a potom i validacijskog istraživanja u svrhu analize glikozilacije haptoglobina u kolorektalnom karcinomu.

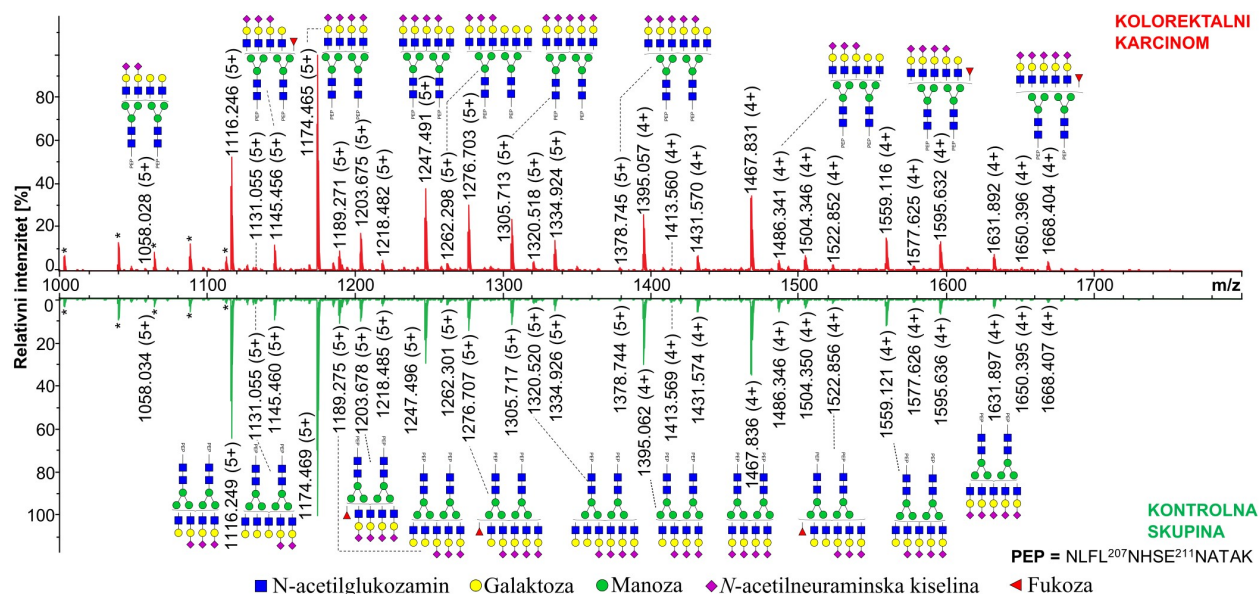
3.3.1. Primarno istraživanje

Nakon analize u LacyTools-u i primjene parametara kontrole kvalitete, statistička obrada napravljena je na preostalim uzorcima: 175 pacijenata s dijagnozom kolorektalnog karcinoma i 82 uzorka prikupljenih nakon operacije te 161 kontrolnih uzoraka.

Reprezentativni uzorak iz skupine pacijenata s kolorektalnim karcinomom uspoređen je s reprezentativnim uzorkom kontrolne skupine i lista identificiranih glikopeptida bila je podjednaka (Slika 21, Slika 22) i nisu pronađene jedinstvene strukture za određenu skupinu. S obzirom na to, napravljena je relativna kvantifikacija na analitima prethodno anotiranim za svako glikozilacijsko mjesto. Ukupno je kvantificirano 66 analita, 11 za glikozilacijsko mjesto Asn 184, 39 za glikopeptid s dva glikozilacijska mjesta Asn 207 i Asn 211 i 16 za glikozilacijsko mjesto Asn 241.



Slika 21 Usporedba profila glikozilacijskih mjesta Asn 184 i Asn 241 između reprezentativnih uzoraka skupine pacijenata s kolorektalnim karcinomom i kontrolne skupine.



Slika 22. Usporedba profila peptida s glikozilacijskim mjestima Asn 207 i Asn 211 između reprezentativnih uzoraka skupine pacijenata s kolorektalnim karcinomom i kontrolne skupine.

Nakon grupiranja pojedinačnih glikoformi svakog kvantificiranog glikopeptida na osnovi sličnosti u glikanskoj strukturi, izračunata su derivirana svojstva za pojedino glikozilacijsko mjesto, osam deriviranih svojstava za Asn 184, dva za Asn 207 i Asn 211 te devet za Asn 241.

FDR korekcijom određen je prag značajnosti $\alpha = 3,55 \times 10^{-2}$ i na osnovi toga značajna povezanost promjena na razini glikopeptida haptoglobina s kolorektalnim karcinomom uočena je na pet od osam deriviranih svojstava za Asn 184, a na šest od devet svojstava za glikozilacijsko mjesto Asn 241 (Tablica 8). Za glikopeptid koji u sebi sadrži informaciju o dva glikozilacijska mjesta bilo je moguće provjeriti povezanost na dva derivirana svojstva i oba su pokazala statistički značajan rezultat (Tablica 8).

Na glikozilacijskom mjestu Asn 184 bile su značajne promjene u fukozilaciji i sijalinizaciji. Fukozilacija sijaliniziranih diantenarnih (Asn184_A2SF) i triantenarnih glikana (Asn184_A3SF) imala je značajno više razine u skupini pacijenata s kolorektalnim karcinomom u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, sijalinizacija je pokazala isti trend promjena kod diantenarnih (Asn184_A2S), triantenarnih (Asn184_A3S) i tetraantenarnih glikopeptida (Asn184_A4S), s višom razinom vrijednosti u kolorektalnom karcinomu. Promjene na ukupnim diantenarnim, triantenarnim i tetraantenarnim glikanima nisu bile statistički značajne.

Budući da glikopeptid koji na sebi nosi dva glikozilacijska mjesta pruža informaciju o ukupnom sastavu obje glikoforme, na razini deriviranih svojstava bilo je moguće evaluirati samo promjene u ukupnoj fukozilaciji, čije su povišene razine u kolorektalnom karcinomu bile statistički značajne. Rezultati za glikozilacijsko mjesto Asn 241 pokazali su također statistički značajne promjene u fukozilaciji diantenarnih glikana (Asn241_A2SF), ali ne i triantenarnih glikana (Asn241_A3SF). Promjena kod diantenarnih glikana imala je suprotan trend u odnosu na glikozilacijsko mjesto Asn 184. Dodatno, za Asn 241 napravljena je i analiza fukozilacije tetraantenarnih glikana, čija je razina statistički značajno narasla u kolorektalnom karcinomu. Promjene u sijalinizaciji na ovom glikozilacijskom mjestu imale su isti smjer kao i na glikozilacijskom mjestu Asn 184, ali su statistički značajne bile samo kod triantenarnih (Asn241_A3S) i tetraantenarnih glikana (Asn241_A4S). Na Asn 241 uočene su promjene i u razgranatosti glikana, stoga su razine manje razgranatih diantenarnih glikana (Asn241_OA2) bile veće u skupini s kolorektalnim karcinomom, a razine više razgranatih tetraantenarnih glikana (Asn 241_OA4) su se značajno smanjile.

Tablica 8. Rezultati logističke regresije primarnog istraživanja. Opis deriviranog svojstva naveden u poglavlju 3.3.1. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Derivirano svojstvo	Kolorektalni karcinom prosječni relativni intenzitet (SD) ¹	Kontrolna skupina prosječni relativni intenzitet (SD) ¹	β	Omjer izgleda (OR)	Interval pouzdanosti 2,5	Interval pouzdanosti 97,5	p	p korigirano
Asn184_A3SF	25,4 (10,07)	20,7 (7,77)	0,55	1,73	1,36	2,24	$1,59 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-2}$
Asn184_A2SF	4,11 (1,16)	3,59 (0,94)	0,50	1,65	1,30	2,14	$7,39 \times 10^{-5}$	$1,94 \times 10^{-2}$
Asn184_A3S	89,71 (3,08)	88,39 (3,1)	0,45	1,56	1,24	1,98	$1,63 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-2}$
Asn184_A4S	61,58 (1,86)	60,84 (1,83)	0,43	1,54	1,23	1,97	$3,08 \times 10^{-4}$	$2,42 \times 10^{-2}$
Asn184_A2S	88,44 (3,83)	87,19 (3,47)	0,34	1,40	1,12	1,77	$3,41 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-2}$
Asn184_OA2	80,39 (4,14)	80,66 (3,71)	-0,05	0,95	0,76	1,19	$6,55 \times 10^{-1}$	$1,45 \times 10^{-2}$
Asn184_OA3	19,08 (3,95)	18,78 (3,61)	0,06	1,06	0,85	1,33	$6,00 \times 10^{-1}$	$1,61 \times 10^{-2}$
Asn184_OA4	0,43 (0,17)	0,46 (0,18)	-0,21	0,81	0,64	1,02	$7,91 \times 10^{-2}$	$1,77 \times 10^{-2}$
Asn207.211_OF	35,31 (5,89)	31,49 (5,3)	0,72	2,06	1,61	2,69	$3,25 \times 10^{-8}$	$1,61 \times 10^{-3}$
Asn207.211_OF0	57,77 (5,8)	61,39 (5,32)	-0,70	0,50	0,38	0,64	$8,47 \times 10^{-8}$	$4,84 \times 10^{-3}$
Asn241_A3S	77,94 (2,44)	76,58 (2,19)	0,64	1,91	1,49	2,47	$5,21 \times 10^{-7}$	$8,06 \times 10^{-3}$
Asn241_A4SF	39,45 (3,76)	36,7 (5,14)	0,64	1,89	1,48	2,46	$8,90 \times 10^{-7}$	$9,68 \times 10^{-3}$
Asn241_OA4	6,5 (1,23)	7,25 (1,62)	-0,64	0,53	0,39	0,69	$1,42 \times 10^{-5}$	$1,29 \times 10^{-2}$
Asn241_A4S	78,37 (2,57)	76,46 (4,58)	0,60	1,82	1,39	2,43	$2,46 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-2}$
Asn241_A2SF	6,25 (2,19)	7,27 (2,93)	-0,41	0,67	0,52	0,84	$9,61 \times 10^{-4}$	$2,74 \times 10^{-2}$
Asn241_OA2	71,02 (3,53)	69,91 (3,41)	0,34	1,40	1,12	1,77	$4,35 \times 10^{-3}$	$3,23 \times 10^{-2}$
Asn241_A3SF	12,16 (3,8)	11,51 (3,69)	0,18	1,20	0,96	1,51	$1,17 \times 10^{-1}$	$4,19 \times 10^{-2}$
Asn241_OA3	22,44 (2,49)	22,78 (2,12)	-0,16	0,86	0,69	1,07	$1,68 \times 10^{-1}$	$4,35 \times 10^{-2}$
Asn241_A2S	95,6 (0,85)	95,56 (0,86)	0,03	1,03	0,83	1,28	$7,79 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-2}$

¹ nije korigirano na spol i dob

SD - standardna devijacija

3.3.2. Validacijsko istraživanje

Isti statistički pristup primijenjen je i u analizi uzoraka prikupljenih u sklopu validacijskog istraživanja. Pri izračunu deriviranih svojstava uzeta je u obzir najzastupljenija struktura u svakom kromatografskom piknu i u analizu je uvršteno deset deriviranih svojstava. FDR korigirani prag značajnosti bio je $\alpha = 3,92 \times 10^{-2}$ i na osnovi toga je sedam od deset svojstava pokazalo statistički značajnu povezanost glikozilacije i kolorektalnog karcinoma (Tablica 9).

Tablica 9. Rezultati logističke regresije validacijskog istraživanja. Opis deriviranog svojstva naveden u poglavlju 3.3.2. Podebljane vrijednosti su statistički značajne.

Derivirano svojstvo	Kolorektalni karcinom prosječni relativni intenzitet (SD) ¹	Kontrolna skupina prosječni relativni intenzitet (SD) ¹	β	Omjer izgleda (OR)	Interval pouzdanosti 2,5	Interval pouzdanosti 97,5	p	p korigirano
A2S	85,24 (2,83)	83,10 (2,65)	0,85	2,35	1,90	2,95	$3,79 \times 10^{-14}$	$3,57 \times 10^{-3}$
A3SF	48,49 (9,38)	41,51 (8,31)	0,84	2,31	1,87	2,90	$9,28 \times 10^{-14}$	$7,14 \times 10^{-3}$
OFa	1,28 (0,62)	0,99 (0,42)	0,61	1,84	1,49	2,32	$6,27 \times 10^{-8}$	$1,43 \times 10^{-2}$
A3S	85,38 (2,83)	84,54 (1,43)	0,53	1,71	1,41	2,09	$1,02 \times 10^{-7}$	$1,79 \times 10^{-2}$
OF	22,24 (5,08)	19,91 (3,97)	0,52	1,67	1,38	2,05	$3,43 \times 10^{-7}$	$2,50 \times 10^{-2}$
OF0	77,76 (5,10)	80,09 (4,01)	-0,51	0,60	0,49	0,73	$4,48 \times 10^{-7}$	$2,86 \times 10^{-2}$
OA2	64,16 (5,56)	63,16 (4,10)	0,18	1,20	1,01	1,44	$4,45 \times 10^{-2}$	$3,93 \times 10^{-2}$
OA3	35,49 (5,47)	36,46 (4,00)	-0,18	0,83	0,69	1,00	$4,71 \times 10^{-2}$	$4,29 \times 10^{-2}$
OA4	0,36 (0,16)	0,35 (0,16)	0,08	1,08	0,90	1,31	$3,88 \times 10^{-1}$	$4,64 \times 10^{-2}$
A2SF	7,85 (1,98)	7,67 (2,06)	0,06	1,06	0,89	1,27	$5,32 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-2}$

¹ nije korigirano na spol i dob
SD - standardna devijacija

Logistička regresija napravljena unutar validacijskog istraživanja pokazala je značajnu povezanost razina manje razgranatih glikana, fukozilacije i sijalinizacije s kolorektalnim karcinomom. Manje razgranati glikani, diantenarne strukture (OA2), imali su značajno povišene razine u kolorektalnom karcinomu u odnosu na kontrolnu skupinu, dok promjene u više razgranatim strukturama poput triantenarnih (OA3) i tetraantenarnih (OA4) nisu pokazale statistički značajnu povezanost s ovim patološkim stanjem. Ukupna fukozilacija (OF), kao i fukozilacija sijaliniziranih triantenarnih glikana (A3SF) značajno je narasla u kolorektalnom karcinomu, što se posljedično odrazilo na smanjenje razine glikana koji nemaju fukoze u svojoj strukturi (OF0). Pored toga, derivirano svojstvo koje obuhvaća strukture s više od jedne fukoze također je imalo trend rasta. Jedino statistički značajna povezanost nije uočena kod fukozilacije diantenarnih glikana (A2SF). Razine

sijalinizacije bile su u značajnom rastu i kod diantenarnih i triantenarnih glikana u skupini pacijenata s kolorektalnim karcinomom u odnosu na kontrolnu skupinu.




3.3.3. Usporedba rezultata primarnog i validacijskog istraživanja

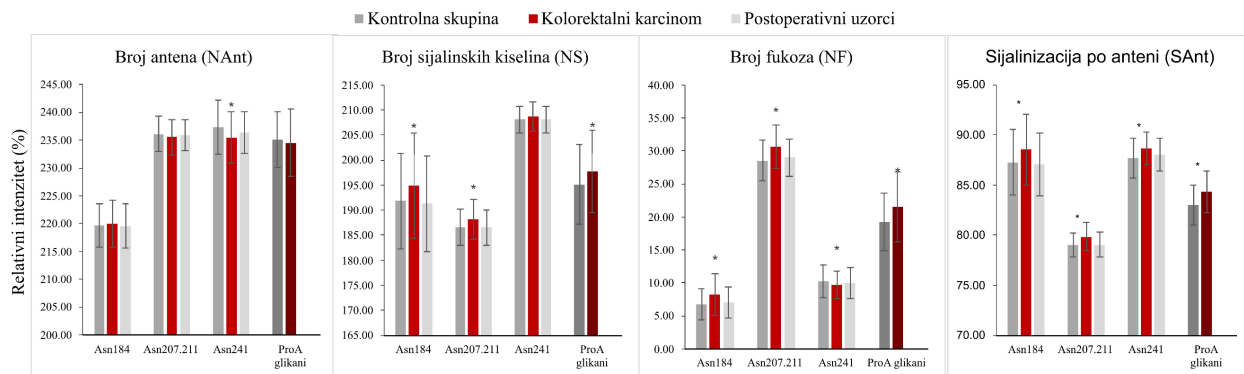
Glikozilacija haptoglobina analizirana je s dva različita pristupa na dvije različite skupine uzoraka koji su neovisno prikupljeni. Prvi pristup podrazumijevao je analizu pojedinog glikozilacijskog mjesta haptoglobina, dok se kroz validacijsko istraživanje analizirao N-glikom haptoglobina što predstavlja sumu svih oslobođenih N-glikana glikoproteina. Pored toga, primijenjen je drugačiji analitički pristup, gdje je u primarnom istraživanju korišten spektrometar masa kao detektor i sustav LC-MS, a u validacijskom istraživanju metoda je uključivala fluorescencijsku detekciju nakon razdvajanja glikanskih struktura UHPLC sustavom. Analiza primarne i validacijske studije ortogonalnim analitičkim metodama dodatni je osigurač da biološki efekt izmjeren u ovom istraživanju zaista potječe od razlike između dviju skupina, a da se ne radi o potencijalnom prikrivenom efektu same analitičke procedure. Niz promjena u glikozilaciji između skupina pacijenata i zdravih kontrola koje su detektirane na pojedinom glikozilacijskom mjestu potvrđene su u validacijskoj studiji provedenoj na razini ukupnih glikana.

Razgranatost glikana provjerena je na razini ukupnih diantenarnih (OA2), triantenarnih (OA3) i tetraantenarnih (OA4) glikana. Razine diantenarnih i triantenarnih glikana imaju suprotan trend promjene na glikozilacijskim mjestima Asn 184 i Asn 241, s tim da ukupni glikani oslikavaju smjer promjene koja je vidljiva na Asn 241. Međutim, statistički značajna je jedino promjena na ukupnim diantenarnim glikanima vidljiva na Asn 241 pa tako i statistički značajno reflektirana na ukupni N-glikom haptoglobina. S druge strane, smjer promjene tetrantenarnih glikana je isti na glikozilacijskim mjestima Asn 184 i Asn 241, na kojem je jedino i statistički značajan, ali na ukupnim N-glikanima, iako nije statistički značajan, smjer promjene je drugačiji. Moguće je da taj smjer promjene dolazi s glikozilacijskih mjesta Asn 204 i Asn 211 za koje nemamo pojedinačnu informaciju u ovoj studiji.

Tablica 10. Izračun zajedničkih deriviranih svojstava NAnt, NS, NF i SAnt. Sastav glikana izražen u obliku NxHxSxFx, pri čemu se N odnosi na N-acetilheksozamin (plavi kvadrat), H na heksozamin (zeleni i žuti krugovi), S na sijalinsku kiselinu (ljubičasti dijament), F na fukozu (crveni trokut), a x na broj tih struktura u sastavu glikana. GP predstavlja glikanski pik.

Derivirano svojstvo	Glikozilacijsko mjesto	Formula za dervirano svojstvo
<p>NAnt</p> $\sum \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \text{---}$ <p>Broj antena</p>	Asn 184	$[2 \times (\text{Asn184_N4H5S1} + \text{Asn184_N4H5S1F1} + \text{Asn184_N4H5S2} + \text{Asn184_N4H5S2F1}) + 3 \times (\text{Asn184_N5H6S1} + \text{Asn184_N5H6S2} + \text{Asn184_N5H6S2F1} + \text{Asn184_N5H6S3} + \text{Asn184_N5H6S3F1}) + 4 \times (\text{Asn184_N6H7S2} + \text{Asn184_N6H7S3})]$
	Asn 207.211	$[[2 \times (\text{Asn207.211_N8H10S2} + \text{Asn207.211_N8H10S2F1} + \text{Asn207.211_N8H10S2F2} + \text{Asn207.211_N8H10S3} + \text{Asn207.211_N8H10S3F1} + \text{Asn207.211_N8H10S3F2} + \text{Asn207.211_N8H10S4} + \text{Asn207.211_N8H10S4F1}) + 2.5 \times (\text{Asn207.211_N9H11S1} + \text{Asn207.211_N9H11S1F1} + \text{Asn207.211_N9H11S2} + \text{Asn207.211_N9H11S2F1} + \text{Asn207.211_N9H11S3} + \text{Asn207.211_N9H11S3F1} + \text{Asn207.211_N9H11S4} + \text{Asn207.211_N9H11S4F1} + \text{Asn207.211_N9H11S5} + \text{Asn207.211_N9H11S5F1} + \text{Asn207.211_N9H11S5F2}) + 3 \times (\text{Asn207.211_N10H12S2} + \text{Asn207.211_N10H12S2F1} + \text{Asn207.211_N10H12S3} + \text{Asn207.211_N10H12S3F1} + \text{Asn207.211_N10H12S4} + \text{Asn207.211_N10H12S4F1} + \text{Asn207.211_N10H12S5} + \text{Asn207.211_N10H12S5F1} + \text{Asn207.211_N10H12S6} + \text{Asn207.211_N10H12S6F1} + \text{Asn207.211_N10H12S6F2}) + 3.5 \times (\text{Asn207.211_N11H13S4} + \text{Asn207.211_N11H13S4F1} + \text{Asn207.211_N11H13S5} + \text{Asn207.211_N11H13S5F1} + \text{Asn207.211_N11H13S6} + \text{Asn207.211_N11H13S6F1}) + 4 \times (\text{Asn207.211_N12H14S4} + \text{Asn207.211_N12H14S5} + \text{Asn207.211_N12H14S6})]$
	Asn 241	$[2 \times (\text{Asn241_N4H5S1} + \text{Asn241_N4H5S1F1} + \text{Asn241_N4H5S2} + \text{Asn241_N4H5S2F1}) + 3 \times (\text{Asn241_N5H6S1} + \text{Asn241_N5H6S2} + \text{Asn241_N5H6S2F1} + \text{Asn241_N5H6S3} + \text{Asn241_N5H6S3F1}) + 4 \times (\text{Asn241_N6H7S1} + \text{Asn241_N6H7S2} + \text{Asn241_N6H7S2F1} + \text{Asn241_N6H7S3} + \text{Asn241_N6H7S3F1} + \text{Asn241_N6H7S4} + \text{Asn241_N6H7S4F1})]$
	ProA glycans	$[1 \times (\text{GP3} + \text{GP4} + \text{GP5} + \text{GP7} + \text{GP10}) + 2 \times (\text{GP8} + \text{GP9} + \text{GP11} + \text{GP12} + \text{GP13} + \text{GP14} + \text{GP15} + \text{GP16} + \text{GP18}) + 3 \times (\text{GP17} + \text{GP19} + \text{GP21} + \text{GP22} + \text{GP23} + \text{GP24} + \text{GP25} + \text{GP26}) + 4 \times (\text{GP27})]$
<p>NS</p> $\sum \text{---}$ <p>Broj sijalinskih kiselina</p>	Asn 184	$[1 \times (\text{Asn184_N4H5S1} + \text{Asn184_N4H5S1F1} + \text{Asn184_N5H6S1}) + 2 \times (\text{Asn184_N4H5S2} + \text{Asn184_N4H5S2F1} + \text{Asn184_N5H6S2} + \text{Asn184_N5H6S2F1} + \text{Asn184_N6H7S2}) + 3 \times (\text{Asn184_N5H6S3} + \text{Asn184_N5H6S3F1} + \text{Asn184_N6H7S3})]$
	Asn 207.211	$[0.5 \times (\text{Asn207.211_N9H11S1} + \text{Asn207.211_N9H11S1F1}) + 1 \times (\text{Asn207.211_N8H10S2} + \text{Asn207.211_N8H10S2F1} + \text{Asn207.211_N8H10S2F2} + \text{Asn207.211_N9H11S2} + \text{Asn207.211_N9H11S2F1} + \text{Asn207.211_N10H12S2} + \text{Asn207.211_N10H12S2F1}) + 1.5 \times (\text{Asn207.211_N8H10S3} + \text{Asn207.211_N8H10S3F1} + \text{Asn207.211_N8H10S3F2} + \text{Asn207.211_N9H11S3} + \text{Asn207.211_N9H11S3F1} + \text{Asn207.211_N10H12S3} + \text{Asn207.211_N10H12S3F1}) + 2 \times (\text{Asn207.211_N8H10S4} + \text{Asn207.211_N8H10S4F1} + \text{Asn207.211_N9H11S4} + \text{Asn207.211_N9H11S4F1} + \text{Asn207.211_N10H12S4} + \text{Asn207.211_N10H12S4F1} + \text{Asn207.211_N11H13S4} + \text{Asn207.211_N11H13S4F1} + \text{Asn207.211_N12H14S4}) + 2.5 \times (\text{Asn207.211_N9H11S5} + \text{Asn207.211_N9H11S5F1} + \text{Asn207.211_N9H11S5F2} + \text{Asn207.211_N10H12S5} + \text{Asn207.211_N10H12S5F1} + \text{Asn207.211_N11H13S5} + \text{Asn207.211_N11H13S5F1} + \text{Asn207.211_N12H14S5}) + 3 \times (\text{Asn207.211_N10H12S6} + \text{Asn207.211_N10H12S6F1} + \text{Asn207.211_N10H12S6F2} + \text{Asn207.211_N11H13S6} + \text{Asn207.211_N11H13S6F1} + \text{Asn207.211_N12H14S6})]$

	Asn 241	$[1 \times (\text{Asn241_N4H5S1} + \text{Asn241_N4H5S1F1} + \text{Asn241_N5H6S1} + \text{Asn241_N6H7S1}) + 2 \times (\text{Asn241_N4H5S2} + \text{Asn241_N4H5S2F1} + \text{Asn241_N5H6S2} + \text{Asn241_N5H6S2F1} + \text{Asn241_N6H7S2} + \text{Asn241_N6H7S2F1}) + 3 \times (\text{Asn241_N5H6S3} + \text{Asn241_N5H6S3F1} + \text{Asn241_N6H7S3} + \text{Asn241_N6H7S3F1}) + 4 \times (\text{Asn241_N6H7S4} + \text{Asn241_N6H7S4F1})]$
	ProA glycans	$[1 \times (\text{GP3} + \text{GP4} + \text{GP5} + \text{GP7} + \text{GP10}) + 2 \times (\text{GP8} + \text{GP9} + \text{GP11} + \text{GP12} + \text{GP13} + \text{GP14} + \text{GP15} + \text{GP16} + \text{GP18}) + 3 \times (\text{GP17} + \text{GP19} + \text{GP21} + \text{GP22} + \text{GP23} + \text{GP24} + \text{GP25} + \text{GP26}) + 4 \times (\text{GP27})]$
NF Σ  Broj fukoza	Asn 184	$1 \times (\text{Asn184_N4H5S1F1} + \text{Asn184_N4H5S2F1} + \text{Asn184_N5H6S2F1} + \text{Asn184_N5H6S3F1})$
	Asn 207.211	$[0.5 \times (\text{Asn207.211_N8H10S2F1} + \text{N10Asn207.211_N8H10S3F1} + \text{Asn207.211_N8H10S4F1} + \text{Asn207.211_N9H11S1F1} + \text{Asn207.211_N9H11S2F1} + \text{Asn207.211_N9H11S3F1} + \text{Asn207.211_N9H11S4F1} + \text{Asn207.211_N9H11S5F1} + \text{Asn207.211_N10H12S2F1} + \text{Asn207.211_N10H12S3F1} + \text{Asn207.211_N10H12S4F1} + \text{Asn207.211_N10H12S5F1} + \text{Asn207.211_N10H12S6F1} + \text{Asn207.211_N11H13S4F1} + \text{Asn207.211_N11H13S5F1} + \text{Asn207.211_N11H13S6F1}) + 1 \times (\text{Asn207.211_N4H5S1F1} + \text{Asn207.211_N4H5S2F1} + \text{Asn207.211_N5H6S2F1} + \text{Asn207.211_N5H6S3F1} + \text{Asn207.211_N6H7S2F1} + \text{Asn207.211_N6H7S3F1} + \text{Asn207.211_N6H7S4F1} + \text{Asn207.211_N8H10S3F2} + \text{Asn207.211_N9H11S5F2} + \text{Asn207.211_N10H12SF2}) + (2 \times (\text{Asn207.211_N5H6S3F2}))]$
	Asn 241	$1 \times (\text{Asn241_N4H5S1F1} + \text{Asn241_N4H5S2F1} + \text{Asn241_N5H6S2F1} + \text{Asn241_N5H6S3F1} + \text{Asn241_N6H7S2F1} + \text{Asn241_N6H7S3F1} + \text{Asn241_N6H7S4F1})$
	ProA glycans	$1 \times (\text{GP5} + \text{GP7} + \text{GP11} + \text{GP12} + \text{GP16} + \text{GP18} + \text{GP21} + \text{GP23} + \text{GP24} + \text{GP25}) + 2 \times \text{GP25}$
SAnt Σ   Sijalinizacija po anteni	Asn 184	NS/NAnt
	Asn 207.211	
	Asn 241	
	ProA glycans	



Slika 23. Usporedba rezultata primarnog i validacijskog istraživanja.

Promjena u fukozilaciji sijaliniziranih diantenarnih glikana (A2SF) statistički je značajna i na Asn 184 i Asn 241. Međutim, ova promjena je specifična za glikozilacijsko mjesto jer se njen smjer razlikuje na Asn 184 (raste u kolorektalnom karcinomu) i Asn 241 (opada u kolorektalnom karcinomu). To je mogući razlog zašto promjene u razini A2SF nisu značajne na razini ukupnih glikana, jer se promjene na glikozilacijskim mjestima međusobno poništavaju. Fukozilacija sijaliniziranih triantenarnih glikana raste i na glikozilacijskim mjestima Asn 184 i Asn 241, kao i na ukupnim glikanima te je statistički značajna za Asn 184 i ukupne N-glikane.

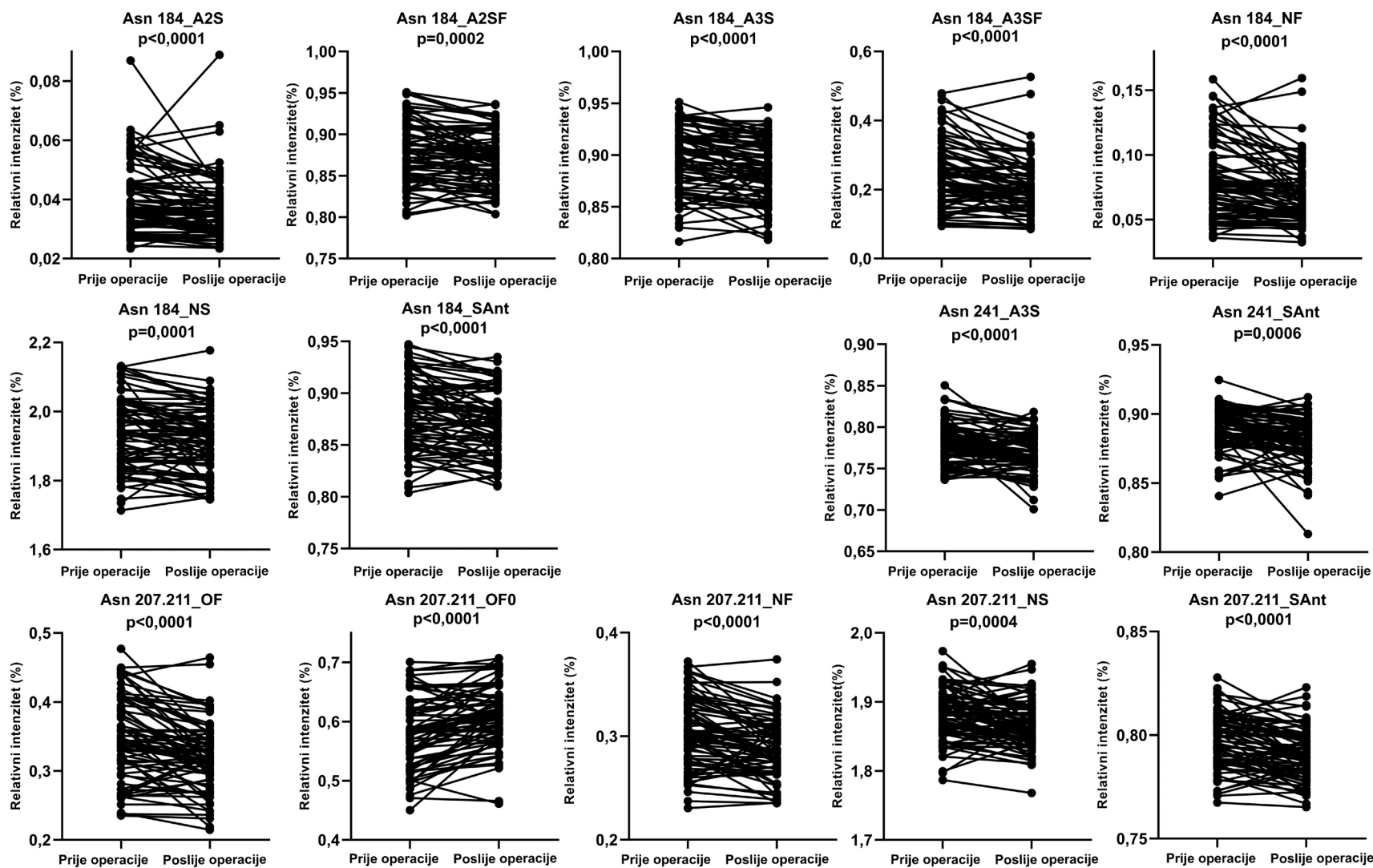
Sijalinizacija među triantenarnim glikanima (A3S) haptoglobina značajno je povišena kako za glikozilacijska mjesta Asn 184 i Asn 241, tako i za ukupne N-glikane, međutim razina sijalinizacije diantenarnih glikana (A2S) značajno je povišena samo na razini glikozilacijskog mjesta Asn 184 i ukupnih N-glikana kod ispitanika s kolorektalnim karcinomom u odnosu na kontrolnu skupinu.

Nadalje, kako bi se jednostavnije usporedili dobiveni kompleksni podatci iz dvije studije, kreirana su dodatna četiri zajednička derivirana svojstva za glikopeptide i obilježene N-glikane. To su: broj antena (NAnt), broj fukoza (NF), broj sijalinskih kiselina (NS) i sijalinizacija po anteni (SAnt) (Tablica 10). Razina deriviranog svojstva NAnt niža je u skupini ispitanika s kolorektalnim karcinomom u usporedbi s kontrolama na glikozilacijskim mjestima Asn 207/211, Asn 241 i na ukupnom N-glikomu, dok su više razine uočene samo za Asn 184, ali statistički značajna povezanost uočena je samo s glikozilacijskim mjestom Asn 241. Promjene u NF svojstvu bile su statistički značajne za sva glikozilacijska mjesta, kao i za ukupne N-glikane, s tim da je Asn 241 jedino imalo smanjene razine ovog deriviranog svojstva u kolorektalnom karcinomu. Povišene

razine NS svojstva za glikozilacijsko mjesto Asn 184, Asn 207/Asn 211 i ukupne N-glikane bile su statistički značajno povezane s kolorektalnim karcinomom, ali ne i za glikozilacijsko mjesto Asn 241, na kojem više razine u kolorektalnom karcinomu nisu bile statistički značajne. S_{Ant} je statistički značajno veća u stanju kolorektalnog karcinoma na svim glikozilacijskim mjestima i ukupnim N-glikanima. Ova analiza pokazuje da su određene promjene specifične za glikozilacijsko mjesto, a ukupni N-glikani oslikavaju promjene vidljive na većini glikozilacijskih mjesta (Slika 23). Promjene u razgranatosti glikana, fukozilacije i sijalinizacije uočene u primarnom istraživanju potvrđene su i u validacijskom istraživanju. Metoda analize ukupnog N-glikoma haptoglobina razvijena i primijenjena za validacijsko istraživanje, može se koristiti za preliminarnu provjeru promjena na razini glikozilacije haptoglobina. Za detaljnije informacije o profilu svakog glikozilacijskog mjesta moguće je koristiti metodu razvijenu i primijenjenu u primarnom istraživanju.

3.3.4. Analiza postoperativnih uzoraka

U sklopu primarnog istraživanja prikupljeno je 85 uzoraka prije i poslije operacije te je nakon kontrole kvalitete relativne kvantifikacije preostalo 75 parova uzoraka za analizu. Analiza ovih uzoraka napravljena je u GraphPad programu. Značajne promjene uočene su kod 17 od 31 deriviranog svojstva). Fukozilacija i sijalinizacija (derivirana svojstva NF i NS) smanjile su se nakon operacije na glikozilacijskim mjestima Asn 184 i Asn 207/Asn211. U postoperativnim uzorcima, razine sijalinizacije po anteni unutar diantenarnih i triantenarnih glikana na Asn 184, kao i triantenarnih glikana na Asn 241 bile su niže. Sveukupno, ova promjena značajna je za Asn 207/Asn211 i uočena je za Asn 184 u diantenarnim i triantenarnim sijaliniziranim glikanima.



Slika 24. Analiza postoperativnih uzoraka. Prikazana su derivirana svojstva koja su statistički značajno različita prije i poslije operacije. Detaljan opis deriviranog svojstva nalazi se u poglavlju 3.3.1.

3.3.5. Glikozilacija haptoglobina u kolorektalnom karcinomu

Promjene u kolorektalnom karcinomu na razini N-glikoma plazme ili seruma analizirane su u nizu studija. Uočena je povećana razgranatost i sijalinizaciji, te snižena razina sržne fukozilacije i snižena razgranatost glikanskih struktura (29,30,65). Također, rezultati istraživanja na tkivima i staničnim linijama potvrđuju promjene u razgranatosti i sijalinizaciji dobivene na razini proteina plazme. Dodatno, na toj razini opisan je i povećani udio oligomanoznih struktura, kao i sržne fukozilacije, dok je s druge strane snižen udio računajućeg N-acetilglukozamina (9). Jedno od ključnih pitanja ostaje odrediti nosioce tih promjena na razini pojedinačnih proteina plazme.

Promjene u sržnoj fukozilaciji mogu biti opisane kroz najzastupljenije protutijelo u plazmi, imunoglobulina G, jer njegova glikozilacija u kolorektalnom karcinomu pokazuje povećane razine sržne fukozilacije među neutralnim glikanima dok su razine snižene za sijalinizirane glikane (66). S druge strane, povećane razine sijalinizacije u ukupnom N-glikomu plazme i seruma su potencijalno rezultat promjena u glikozilaciji haptoglobina i upravo oslikavaju njegovu povišenu sijalinizaciju što je bio rezultat i u ovom provedenom istraživanju. Povećana sijalinizacija može biti rezultat veće aktivnosti ST6Gal1 enzima čija je ekspresija veća u stanicama kolorektalnog karcinoma (67). Iako se haptoglobin sintetizira prvenstveno u jetri, otkriven je i u niskim koncentracijama u stanicama kolona dok su u stanju karcinoma te koncentracije povećane (68). Osim što je povećana ekspresija ST6Gal1, također fukoziltransferaze (npr. FUT1-6 i FUT8) imaju povećanu aktivnost u stanicama kolona te to može rezultirati povećanom fukozilacijom (69,70).

Povećana aktivnost enzima je karakteristika i drugih karcinoma i povezana je s napredovanjem bolesti pa to može objasniti slične promjene u sijalinizaciji i fukozilaciji haptoglobina i u drugim karcinomima (70–72). Glikozilacija haptoglobina proučavana je do sada u karcinomima gušterače, jetre, pluća, prostate, jajnika, želuca i debelog crijeva (71). Prethodna istraživanja navela su fukozilirani haptoglobin kao dijagnostički biljeg karcinoma gušterače, pri čemu je utvrđeno kako je razina fukoziliranog haptoglobina veća u višim stadijima karcinoma gušterače (73–76). Povišena razina fukoziliranog haptoglobina zabilježena je i u karcinomu jetre (77–80), želuca (63,81,82) i prostate (83–85). Karcinom pluća može se razlikovati od kronične opstruktivne bolesti pluća na osnovu sržne i antenarne fukozilacije tetrantenarnih glikanskih struktura (86).

Prethodno su Park i suradnici potvrdili fukožu vezanu α 1-3 ili α 1-4 vezom s *N*-acetilglukozaminom kao dominantnu strukturu u karcinomu kolona što ih je uputilo na to da je α 1-3/4 fukozilacija glikozilacijskog mjesta 241 na β lancu potencijalni biljeg ovog oboljenja (68). S druge strane, ovi rezultati nisu potvrđeni kao statistički značajni u studiji Darebne i suradnika (87). Nedostatak obje studije bio je mali broj analiziranih uzoraka. Međutim, kroz ovu doktorsku disertaciju potvrđene su promjene u fukozilaciji na većem broju i u dva seta uzoraka. S tim da je na glikozilacijskom mjestu Asn 241 zapaženo da ukupna fukozilacija sijaliniziranih diantenarnih i triantenarnih glikana ima suprotan trend promjene u odnosu na prethodnu studiju. Svakako bi trebalo posebno analizirati sržnu i antenarnu fukožilaciju jer možda je to rezultat različitog trenda. Iz anotiranog kromatograma *N*-glikana u ovoj studiji možemo primijetiti kako diantenarni glikani češće imaju sržnu fukožu nego triantenarni u čijoj je strukturi češće anotirana antenarna fukoža; taj se trend poklapa s prethodno objavljenim rezultatima Park i suradnika. Također, Takeda i suradnici su upotrebom lektina analizirali fukožilaciju haptoglobina i njenu ulogu u prognozi kolorektalnog karcinoma te su dobili značajnu povezanost između povišenih razina fukožilacije haptoglobina i lošeg ishoda bolesti (88). Iako su kroz studiju koristili nespecifičnu izolaciju haptoglobina iz plazme i studija je napravljena na manjem broju uzoraka rezultati se poklapaju s rezultatima dobivenim u ovom doktorskom radu.

S druge strane, povišena sijalinizacija i fukožilacija mogu se objasniti akutnim odgovorom organizma koji može biti stimuliran aktivnošću citokina IL-6 pri čemu koncentracija proteina akutne faze, pa tako i haptoglobina, jako raste (89,90), a uz povećanu ekspresiju prethodno navedenih enzima može doći i do promjena u glikozilaciji haptoglobina koje smo uočili u ovoj studiji.

Dodatni aspekt na koji bi bilo dobro obratiti pažnju u narednim studijama glikozilacije haptoglobina svakako je i njegov fenotip (75). Struktura i funkcija haptoglobina razlikuju se među fenotipima, što ima utjecaj i na profil glikana (26), stoga bi u budućim istraživanjima trebalo uzeti u obzir i tu karakteristiku prilikom analize glikozilacije što nije učinjeno kroz ovu studiju.

4. ZAKLJUČCI

Analitičke metode razvijene u sklopu ovog istraživanja omogućuju učinkovitu i brzu imunoafinitetnu izolaciju i obogaćivanje haptoglobina iz plazme ili seruma, te daljnju analizu glikozilacije na razini glikopeptida i ukupnih N-glikana haptoglobina tehnikama LC-MS-a i UHPLC-FLD-a.

Razvijene metode mogu se primijeniti na velikom broju uzoraka u istraživanju nekog drugog oboljenja ili populacijskim studijama. Analiza ukupnog N-glikoma haptoglobina omogućava pregled i preliminarnu procjenu promjena u glikozilaciji ovog proteina. Detaljnije informacije mogu se dobiti analizom svakog glikozilacijskog mjesta haptoglobina.

Generalno, promjene uočene u glikozilaciji haptoglobina u kolorektalnom karcinomu kroz ovo istraživanje su povećan udio manje razgranatih glikanskih struktura, povećana fukozilacija i sijalinizacija u skupini ispitanika s kolorektalnim karcinomom u odnosu na kontrolnu skupinu.

Iako su određene promjene u glikozilaciji haptoglobina specifične za N-glikozilacijska mjesta, većina promjena je slična između glikozilacijskih mjesta i vidljiva je na ukupnim N-glikanima haptoglobina, tako da su povišene razine diantenarnih glikana, fukozilacije i sijalinizacije dobivene u primarnom istraživanju replicirane i kroz validacijsko istraživanje.

Glikozilacijsko mjesto Asn 184 imalo je statistički značajno povećanu fukozilaciju diantenarnih sijaliniziranih i triantenarnih sijaliniziranih glikana, kao i sijalinizaciju diantenarnih, triantenarnih i tetraantenarnih glikana u stanju kolorektalnog karcinoma.

Statistički značajne povišene razine na glikozilacijskom mjestu Asn 241 bile su u ukupnim diantenarnim glikanima, njihovoj sijalinizaciji, te sijalinizaciji triantenarnih i tetraantenarnih glikana, dok je fukozilacija diantenarnih glikana bila značajno niža u kolorektalnom karcinomu u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ukupni N-glikani haptoglobina pacijenata s kolorektalnim karcinomom imali su povišene razine diantenarnih glikana te povišenu razinu sijalinizacije na diantenarnim i triantenarnim glikanima. Fukozilacija je bila značajno viša samo na triantenarnim sijaliniziranim glikanima.

Razine fukožilacije i sijalinizacije u postoperativnih uzorcima bile su snižene u odnosu na uzorke prikupljene prije operacije, što upućuje da se glikožilacija haptoglobina nakon operacije mijenja u smjeru karakterističnom za kontrolnu skupinu.

5. POPIS LITERATURE

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49.
2. Cancer IA for R. Estimated number of deaths in 2020, Croatia both sexes, all ages. Preuzeto s: gco.iarc.fr.2020. (pristupljeno: 18. listopada 2023.)
3. Amersi F, Augustin M, Ko CY. Colorectal cancer: Epidemiology and health services research. *Surg Oncol Clin N Am* 2006;15(1):21–37.
4. Livstone EM. Kolorektalni karcinom. Preuzeto s: <https://www.hemed.hr/Default.aspx?sid=12888>. (pristupljeno: 29. studenoga 2023.)
5. Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol* 2014;20(22):6786–808.
6. Das V, Kalita J, Pal M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother* 2017;87:8–19.
7. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterol Res* 2018;11(4):264–73.
8. Team ACS medical and editorial content. Colorectal Cancer Causes , Risk Factors , and Prevention. *Am Cancer Soc* 2018;1–21.
9. Holst S, Wuhrer M, Rombouts Y. Glycosylation Characteristics of Colorectal Cancer. In: Drake RR, Ball LE, editors. *Advances in cancer research*. Elsevier Inc., 2015: 203–56.
10. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, et al. Improved Diagnosis of Colorectal Cancer Using a Combination of Fecal Occult Blood and Novel Fecal Protein Markers. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6(10):1122–8.
11. Team ACS medical and editorial content. Colorectal Cancer Early Detection , Diagnosis , and Staging. 2017;1–40.
12. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gast* 2008;134(5):1296–310.
13. Moorcraft SY, Smyth EC, Cunningham D. The role of personalized medicine in metastatic colorectal cancer: an evolving landscape. *Therap Adv Gastroenterol* 2013;6(5):381–95.
14. Janciauskiene S, Wrenger S, Günzel S, Gründing AR, Golpon H, Welte T. Potential Roles of Acute Phase Proteins in Cancer : Why Do Cancer Cells Produce or Take Up Exogenous

- Acute Phase Protein Alpha1-Antitrypsin ? 2021;11:622076.
15. Mariño-Crespo Ó, Cuevas-Álvarez E, Harding AL, Murdoch C, Fernández-Briera A, Gil-Martín E. Haptoglobin expression in human colorectal cancer. *Histol Histopathol* 2019;34(8):953–63.
 16. Park SY, Yoon SJ, Jeong YT, Kim JM, Kim JY, Bernert B, et al. N-glycosylation status of β -haptoglobin in sera of patients with colon cancer, chronic inflammatory diseases and normal subjects. *Int J Cancer* 2010;126(1):142–55.
 17. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996;42(10):1589–600.
 18. Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, et al. Haptoglobin: Basic and clinical aspects. *Antioxidants Redox Signal* 2010;12(2):293–304.
 19. Shih AWY, Mcfarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *Am J Hematol* 2014;89(4):443–7.
 20. Márquez L, Shen C, Cleynen I, De Hertogh G, Van Steen K, Machiels K, et al. Effects of haptoglobin polymorphisms and deficiency on susceptibility to inflammatory bowel disease and on severity of murine colitis. *Gut* 2012;61(4):528–34.
 21. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J* 2016;33(3):309–43.
 22. Ratanasopa K, Chakane S, Ilyas M, Nantasenamat C, Bulow L. Trapping of human hemoglobin by haptoglobin: molecular mechanisms and clinical applications. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(17):2364–74.
 23. Alayash AI. Haptoglobin: Old protein with new functions. *Clin Chim Acta* 2011;412:493–8.
 24. MacKellar M, Vigerust DJ. Role of haptoglobin in health and disease: A focus on diabetes. *Clin Diabetes* 2016;34(3):149–57.
 25. Dobryszczycka W. Biological Functions of Haptoglobin - New Pieces to an Old Puzzle. *Clin Chem Lab Med* 1997;35(9):647–54.
 26. Kohansal-Nodehi M, Swiatek-de Lange MS de, Tabares G, Busskamp H. Haptoglobin polymorphism affects its N-glycosylation pattern in serum. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab* 2022;25:61–70.
 27. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of*

- Glycobiology. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022: 859.
28. Taylor ME, Drickamer K. Introduction to Glycobiology. 3rd ed. Oxford University Press, 2011: 283.
 29. Doherty M, Theodoratou E, Walsh I, Adamczyk B, Stöckmann H, Agakov F, et al. Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. *Sci Rep* 2018;8:8655.
 30. de Vroome SW, Holst S, Girondo MR, van der Burgt YEM, Mesker WE, Tollenaar RAEM, et al. Serum N-glycome alterations in colorectal cancer associate with survival. *Oncotarget* 2018;9(55):30610–23.
 31. Sethi MK, Kim H, Park CK, Baker MS, Paik YK, Packer NH, et al. In-depth N-glycome profiling of paired colorectal cancer and non-tumorigenic tissues reveals cancer-, stage- and EGFR-specific protein N-glycosylation. *Glycobiology* 2015;25(10):1064–78.
 32. Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, et al. High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG–Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(10):1–15.
 33. Trbojević-Akmačić I, Nemeč B, Vidic U, Malić S, Miklić K, Černigoj U, et al. Chromatographic monoliths for high-throughput immunoaffinity isolation of transferrin from human plasma. *Croat Chem Acta* 2016;89(2):203–11.
 34. 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;20:100044.
 35. Saroha A, Biswas S, Chatterjee BP, Das HR. Altered glycosylation and expression of plasma alpha-1-acid glycoprotein and haptoglobin in rheumatoid arthritis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2011;879(20):1839–43.
 36. Maresca B, Cigliano L, Spagnuolo MS, Dal Piaz F, Corsaro MM, Balato N, et al. Differences between the Glycosylation Patterns of Haptoglobin Isolated from Skin Scales and Plasma of Psoriatic Patients. *PLoS One* 2012 Dec 18;7(12):e52040.
 37. Šoić D, Keser T, Štambuk J, Kifer D, Pociot F, Lauc G, et al. High-throughput human complement C3 N-glycoproteomic profiling identifies markers of early onset type 1 diabetes mellitus in children. *Mol Cell Proteomics* 2022;21:100407.
 38. Miura Y, Hashii N, Ohta Y, Itakura Y, Tsumoto H, Suzuki J, et al. Characteristic

- glycopeptides associated with extreme human longevity identified through plasma glycoproteomics. *Biochim Biophys Acta* 2018;1862(6):1462–71.
39. Deng W, Cao J, Chen L, McMullin D, Januzzi JL, Buonanno FS, et al. Plasma Glycoproteomic Study of Therapeutic Hypothermia Reveals Novel Markers Predicting Neurologic Outcome Post-cardiac Arrest. *Transl Stroke Res* 2018;9(1):64–73.
 40. Ekuni A, Miyoshi E, Ko JH, Noda K, Kitada T, Ihara S, et al. A glycomic approach to hepatic tumors in N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) transgenic mice induced by diethylnitrosamine (DEN): Identification of haptoglobin as a target molecule of GnT-III. *Free Radic Res* 2002;36(8):827–33.
 41. Heo SH, Lee SJ, Ryoo HM, Park JY, Cho JY. Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC-MS/MS. *Proteomics* 2007;7(23):4292–302.
 42. Demus D, Naber A, Dotz V, Jansen BC, Bladergroen MR, Nouta J, et al. Large-Scale Analysis of Apolipoprotein CIII Glycosylation by Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry. *Front Chem* 2021;9:678883.
 43. Habazin S, Štambuk J, Šimunović J, Keser T, Razdorov G, Novokmet M. Mass Spectrometry-Based Methods for Immunoglobulin G N-Glycosylation Analysis. In: Pezer M, editor. *Antibody Glycosylation*. Springer Nature, 2021: 73–135.
 44. Keser T, Pavic T, Lauc G, Gornik O. Comparison of 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS as derivatizing agents for high-throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan analysis. *Front Chem* 2018;6(324):1–12.
 45. Hanić M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. N-Glycan Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gel Electrophoresis with Fluorescent Labeling. *Curr Protoc Protein Sci* 2019;97(1):1–21.
 46. Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, Petrović T, Deriš H, Wuhrer M, et al. High-Throughput Glycomic Methods. *Chem Rev* 2022;122(20):15865–913.
 47. Dotz V, Wuhrer M. N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Lett* 2019;593(21):2966–76.
 48. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 2010;11:395.

49. Schmid R, Heuckeroth S, Korf A, Smirnov A, Myers O, Dyrland TS, et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat Biotechnol* 2023;41(4):447–9.
50. 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.
51. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 2016;11(12):2301–19.
52. 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.
53. Vidic U, Trbojević-Akmačić I, Černigoj U, Albers M, Gašperšič J, Pučić-Baković M, et al. Semi-high-throughput isolation and N-glycan analysis of human fibrinogen using monolithic supports bearing monoclonal anti-human fibrinogen antibodies. *Electrophoresis* 2017;38:2922–30.
54. Šimunović J, Gašperšič J, Černigoj U, Vidič J, Štrancar A, Novokmet M, et al. High-throughput immunoaffinity enrichment and N-glycan analysis of human plasma haptoglobin. *Biotechnol Bioeng* 2023;120(2):491–502.
55. Trbojević-Akmačić I, Ugrina I, Lauc G. Comparative Analysis and Validation of Different Steps in Glycomics Studies. *Methods Enzymol* 2017;586:37–55.
56. Mann AC, Self CH, Turner GA. A general method for the complete deglycosylation of a wide variety of serum glycoproteins using peptide-N-glycosidase-F. *Glycosylation Dis* 1994;1(4):253–61.
57. Plomp R, Hensbergen PJ, Rombouts Y, Zauner G, Dragan I, Koeleman CAM, et al. Site-Specific N-Glycosylation Analysis of Human Immunoglobulin E. *J Proteome Res* 2012;13(2):536–46.
58. Kozak RP, Tortosa CB, Fernandes DL, Spencer DIR. Comparison of procainamide and 2-aminobenzamide labeling for profiling and identification of glycans liquid chromatography with fluorescence detection coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem* 2015;486:38–40.

59. Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, et al. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res* 2014;13(5):2314–27.
60. O’Flaherty R, Muniyappa M, Walsh I, Stöckmann H, Hilliard M, Hutson R, et al. A robust and versatile automated glycoanalytical technology for serum antibodies and acute phase proteins: Ovarian cancer case study. *Mol Cell Proteomics* 2019;18(11):2191–206.
61. Pompach P, Chandler KB, Lan R, Edwards N, Goldman R. Semi-automated identification of N-glycopeptides by hydrophilic interaction chromatography, nano-reverse-phase LC-MS/MS, and glycan database search. *J Proteome Res* 2012;11(3):1728–40.
62. Chandler KB, Pompach P, Goldman R, Edwards N. Exploring site-specific N-glycosylation microheterogeneity of haptoglobin using glycopeptide CID tandem mass spectra and glycan database search. *J Proteome Res* 2013;12(8):3652–66.
63. Jeong S, Kim U, Oh M, Nam J, Park S, Choi Y, et al. Detection of Aberrant Glycosylation of Serum Haptoglobin for Gastric Cancer Diagnosis Using a Middle-Up-Down Glycoproteome Platform. *J Pers Med* 2021;11:575.
64. Pompach P, Brnakova Z, Sanda M, Wu J, Edwards N, Goldman R. Site-specific glycoforms of haptoglobin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(5):1281–93.
65. Zhao YP, Ruan CP, Wang H, Hu ZQ, Fang M, Gu X, et al. Identification and assessment of new biomarkers for colorectal cancer with serum N-glycan profiling. *Cancer* 2012;118(3):639–50.
66. Vučković F, Theodoratou E, Thaçi K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J, et al. IgG Glycome in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):3078–86.
67. Olio FD, Malagolini N, Stefano GDI, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F. Increased CMP-NeuAc:Gal β 1,4GlcNAc-R α 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *1989;44:434–9*.
68. Park SY, Lee SH, Kawasaki N, Itoh S, Kang K, Hee Ryu S, et al. Alfa1-3/4 fucosylation at Asn 241 of beta-haptoglobin is a novel marker for colon cancer: A combinatorial approach for development of glycan biomarkers. *Int J Cancer* 2012;130(10):2366–76.
69. Liao C, An J, Yi S, Tan Z, Wang H, Li H, et al. FUT8 and Protein Core Fucosylation in Tumours : From Diagnosis to Treatment. *2021;12(13):4109–20*.

70. Fernández-Ponce C, Geribaldi-Doldán N, Sánchez-Gomar I, Quiroz RN, Ibarra LA, Escorcía LG, et al. The role of glycosyltransferases in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(11):1–20.
71. Zhang S, Shang S, Li W, Qin X, Liu Y. Insights on N-glycosylation of human haptoglobin and its association with cancers. *Glycobiology* 2016;26(7):684–92.
72. Blanas A, Sahasrabudhe NM, Rodríguez E, Kooyk Y Van. Fucosylated Antigens in Cancer : An Alliance toward Tumor Progression , Metastasis , and Resistance to Chemotherapy. 2018;8:39.
73. Miyoshi E, Nakano M. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: Detailed analyses of oligosaccharide structures. *Proteomics* 2008;8(16):3257–62.
74. Miyoshi E, Kamada Y. Application of glycoscience to the early detection of pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2016;107(10):1357–62.
75. Morishita K, Ito N, Koda S, Maeda M, Nakayama K, Yoshida K, et al. Haptoglobin phenotype is a critical factor in the use of fucosylated haptoglobin for pancreatic cancer diagnosis. *Clin Chim Acta* 2018;487:84–9.
76. Ito N, Yamada M, Morishita K, Nojima S, Motooka K, Sakata N, et al. Identification of fucosylated haptoglobin-producing cells in pancreatic cancer tissue and its molecular mechanism. *Glycoconj J* 2021;38(1):45–54.
77. Pompach P, Brnakova Z, Sanda M, Wu J, Edwards N, Goldman R. Site-specific glycoforms of haptoglobin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(5):1281–93.
78. Huang Y, Zhou S, Zhu J, Lubman DM, Mechref Y. LC-MS/MS isomeric profiling of permethylated N-glycans derived from serum haptoglobin of hepatocellular carcinoma (HCC) and cirrhotic patients. *Electrophoresis* 2017;38(17):2160–7.
79. Gutierrez Reyes CD, Huang Y, Atashi M, Zhang J, Zhu J, Liu S, et al. PRM-MS Quantitative Analysis of Isomeric N-Glycopeptides Derived from Human Serum Haptoglobin of Patients with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Metabolites* 2021;11(8):563.
80. Sanda M, Pompach P, Brnakova Z, Wu J, Makambi K, Goldman R. Quantitative Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Multiple Reaction Monitoring (LC-MS-MRM) analysis of site-specific glycoforms of haptoglobin in liver disease. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(5):1294–305.

81. Kim J han, Lee SH, Choi S, Kim U, Yeo IS, Hee S, et al. Direct analysis of aberrant glycosylation on haptoglobin in patients with gastric cancer. *Oncotarget* 2017;8(7):11094–104.
82. Lee SH, Jeong S, Lee J, Yeo IS, Oh MJ, Kim U, et al. Glycomic profiling of targeted serum haptoglobin for gastric cancer using nano LC/MS and LC/MS/MS. *Mol Biosyst* 2016;12(12):3611–21.
83. Fujimura T, Shinohara Y, Tissot B, Pang PC, Kurogochi M, Saito S, et al. Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate disease or normal subjects. *Int J Cancer* 2008;122(1):39–49.
84. Yoon SJ, Park SY, Pang PC, Gallagher J, Gottesman JE, Dell A, et al. N-glycosylation status of β -haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate diseases. *Int J Oncol* 2010;36:193–203.
85. Saito S, Murayama Y, Pan Y, Taima T, Fujimura T, Murayama K, et al. Haptoglobin- β chain defined by monoclonal antibody RM2 as a novel serum marker for prostate cancer. *Int J Cancer* 2008;123(3):633–40.
86. Wang D, Hincapie M, Rejtar T, Karger BL. Ultrasensitive Characterization of Site-Specific Glycosylation of Affinity Purified Haptoglobin from Lung Cancer Patient Plasma Using 10 μ m i.d. Porous Layer Open Tubular (PLOT) LC-LTQ-CID/ETD-MS. *Anal Chem* 2012;83(6):2029–37.
87. Darebna P, Novak P, Kucera R, Topolcan O, Sanda M, Goldman R, et al. Changes in the expression of N- and O-glycopeptides in patients with colorectal cancer and hepatocellular carcinoma quantified by full-MS scan FT-ICR and multiple reaction monitoring. *J Proteomics* 2017;153:44–52.
88. Takeda Y, Shinzaki S, Okudo K, Moriwaki K, Murata K, Miyoshi E. Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker linked to the prognosis after an operation in colorectal cancer. *Cancer* 2012;118(12):3036–43.
89. Heinrich PC, Castell J V. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621–36.
90. Dempsey E, Rudd PM. Acute phase glycoproteins: Bystanders or participants in carcinogenesis? *Ann N Y Acad Sci* 2012;1253(1):122–32.
91. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of*

Glycobiology. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017: 823.

6. ŽIVOTOPIS AUTORA

Jelena Šimunović rođena je 1991. u Sarajevu, Bosna i Hercegovina, gdje je završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje te nakon toga upisala integrirani studij na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu, gdje je 2015. stekla zvanje magistra farmacije. Tijekom studija boravila je na dvomjesečnoj razmjeni studenata na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u sklopu programa CEEPUS (*Central European Exchange Programme for University Studies*).

Nakon završetka studija, zaposlena je kao mladi istraživač u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. na Obzor 2020 projektu GlyCoCan (*GlyCoCan – Exploiting Glycosylation of Colorectal Cancer for the Development of Improved Diagnostics and Therapeutics*) u sklopu kojeg je i upisala doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

Svijet glikobiologije počela je upoznavati kroz CEEPUS razmjenu, a nastavila na poziciji u Genosu gdje je usvojila znanje i vještine u polju analitičkih metoda za analizu glikozilacije i tu radi i danas. Imala je priliku usavršavati se u polju spektrometrije masa i primjeni ove metode u analizi glikozilacije u grupi Prof. Manfreda Wuhlera u Centru za proteomiku i metabolomiku u Nizozemskoj, gdje je i izradila dio svoje doktorske disertacije.

Koautor je na sedam znanstvenih radova i jednom poglavlju knjige. Pored toga, sudjelovala je na više međunarodnih kongresa s jednim usmenim i više posterskih priopćenja.

Znanstveni radovi u časopisima koje citiraju baze WoSCC i CC

(podcrtano označeni oni koji kvalificiraju doktoranda za obranu doktorske disertacije)

1. Šimunović, J., Gašperšič, J., Černigoj, U., Vidič, J., Štrancar, A., Novokmet, M., Razdorov, G., Pezer, M., Lauc, G., & Trbojević-Akmačić, I. (2022). High-throughput immunoaffinity enrichment and N-glycan analysis of human plasma haptoglobin. *Biotechnology and Bioengineering*; 120(2), 491-502. <https://doi.org/10.1002/BIT.28280>
2. Trbojević-Akmačić, I., Vučković, F., Vilaj, M., Skelin, A., Karssen, L. C., Krištić, J., Jurić, J., Momčilović, A., Šimunović, J., Mangino, M., De Gregori, M., Marchesini, M., Dagostino, C., Štambuk, J., Novokmet, M., Rauck, R., Aulchenko, Y. S., Primorac, D., Kapural, L., ... Lauc, G. (2018). Plasma N-glycome composition associates with chronic low back pain. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1862(10), 2124–2133. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.07.003>

3. Trbojević-Akmačić, I., Vučković, F., Pribić, T., Vilaj, M., Černigoj, U., Vidič, J., **Šimunović, J.**, Kepek, A., Kolčić, I., Klarić, L., Novokmet, M., Pučić-Baković, M., Rapp, E., Štrancar, A., Polašek, O., Wilson, J. F., & Lauc, G. (2023). Comparative analysis of transferrin and IgG N-glycosylation in two human populations. *Communications Biology*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04685-6>
4. Sharapov, S. Z., Shadrina, A. S., Tsepilov, Y. A., Elgaeva, E. E., Tiys, E. S., Feoktistova, S. G., Zaytseva, O. O., Vuckovic, F., Cuadrat, R., Jager, S., Wittenbecher, C., Karssen, L. C., Timofeeva, M., Tillin, T., Trbojević-Akmačić, I., Štambuk, T., Rudman, N., Krištić, J., **Šimunović, J.**, ... Aulchenko, Y. S. (2020). Replication of Fifteen Loci Involved in Human Plasma Protein N-glycosylation in 4,802 Samples from Four cohorts. *Glycobiology*; 31(2), 82–88. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa053>
5. **Simunovic, J.**, Vilaj, M., Trbojevic-Akmacic, I., Momcilovic, A., Vuckovic, F., Gudelj, I., Juric, J., Nakic, N., Lauc, G., & Pezer, M. (2019). Comprehensive N-glycosylation analysis of immunoglobulin G from dried blood spots. *Glycobiology*, 29(12), 817–821. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz061>
6. Sharapov, S. Z., Tsepilov, Y. A., Klaric, L., Mangino, M., Thareja, G., Shadrina, A. S., Simurina, M., Dagostino, C., Dmitrieva, J., Vilaj, M., Vuckovic, F., Pavic, T., Stambuk, J., Trbojevic-Akmacic, I., Kristic, J., **Simunovic, J.**, Momcilovic, A., Campbell, H., Doherty, M., ... Aulchenko, Y. S. (2019). Defining the genetic control of human blood plasma N-glycome using genome-wide association study. *Human Molecular Genetics*, 28(12), 2062–2077. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz054>

Ostali znanstveni radovi

7. Jurić, J., Peng, H., Song, M., Vučković, F., **Šimunović, J.**, Trbojević-Akmačić, I., Wang, Y., Liu, J., Gao, Q., Wang, H., Chu, Q., Pezer, M., Wang, W., & Lauc, G. (2023). Periodic Changes in the N-Glycosylation of Immunoglobulin G During the Menstrual Cycle. *Engineering*, 26, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.10.020>

Poglavlje u knjizi

1. Habazin, S., Štambuk, J., **Šimunović, J.**, Keser, T., Razdorov, G., & Novokmet, M. (2021). Mass Spectrometry-Based Methods for Immunoglobulin G N-Glycosylation Analysis. In *Antibody Glycosylation* (Vol. 112, pp. 73–135). Exp Suppl. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3_3

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Farmaceutsko-biokemijske znanosti
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

GLIKOZILACIJA HAPTOGLOBINA U KOLOREKTALNOM KARCINOMU

Jelena Šimunović

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom drugi je uzročnik smrti među karcinomima kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Najčešće se javlja sporadično, ali može imati i nasljednu komponentu. Otkrivanje novih, specifičnijih, učinkovitijih i manje invazivnih biljega kolorektalnog karcinoma unaprijedilo bi dijagnostičke i prognostičke mogućnosti u kliničkoj praksi. Prethodna istraživanja pokazala su promjene u N-glikozilaciji proteina plazme u kolorektalnom karcinomu. Jedan od potencijalnih nositelja tih promjena je haptoglobin, protein akutne faze, koji ima četiri glikozilacijska mjesta u svojoj strukturi. U ovom doktorskom radu razvijene su analitičke metode za analizu glikozilacije haptoglobina iz seruma ili plazme velikog broja uzoraka na razini glikopeptida i ukupnih N-glikana. Primarno istraživanje napravljeno je na 185 uzoraka seruma ispitanika s kolorektalnim karcinomom i 185 kontrola prikupljenih u biobanci LUMC (engl. Leiden University Medical Center) u Nizozemskoj. Analiza je napravljena specifično za svako glikozilacijsko mjesto upotrebom spregnutog sustava tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa. Validacijsko istraživanje provedeno je na 224 uzorka plazme ispitanika s kolorektalnim karcinomom i 269 kontrola. Ovi uzorci su prikupljeni u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu u Hrvatskoj. Ukupni N-glikom haptoglobina analiziran je na uzorcima validacijskog istraživanja metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti s fluorescentnom detekcijom. Primjenom metode logističke regresije ispitana je značajnost povezanosti promjena u glikozilaciji haptoglobina i stanja kolorektalnog karcinoma. Statistički značajne promjene uočene su u povećanoj razini manje razgranatih glikanskih struktura, ukupnoj fukozilaciji i sijalinizaciji. Iako su određene promjene specifične za glikozilacijsko mjesto, rezultati primarnog istraživanja potvrđeni su u validacijskom istraživanju. Promjene u fukozilaciji i sijalinizaciji oslikavaju promjene prethodno objavljene na ukupnim proteinima plazme.

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

Rad sadrži: 75 stranica, 24 grafička prikaza, 10 tablica i 91 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, haptoglobin, N-glikozilacija, tekućinska kromatografija, spektrometrija masa

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

Ocjenjivači: **dr. sc. Sanja Dabelić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

dr. sc. Dunja Rogić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

dr. sc. Neven Ljubičić, redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 17. siječnja 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Pharmaceutical-Biochemical Sciences
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral dissertation

HAPTOGLOBIN GLYCOSYLATION IN COLORECTAL CANCER

Jelena Šimunović

SUMMARY

Colorectal cancer is the second leading cause of cancer-related deaths both worldwide and in Croatia. It often occurs sporadically but can also have a hereditary component. The development of new, more specific, effective, and less invasive tools for colorectal cancer would enhance diagnostics and prognostics in clinical practice. Previously, alterations in the N-glycosylation of plasma proteins in colorectal cancer were reported. One potential carrier of these changes is haptoglobin, an acute-phase protein that has four N-glycosylation sites in its structure. In this doctoral thesis, we developed high-throughput analytical methods for site-specific haptoglobin glycosylation analysis and haptoglobin N-glycome analysis from serum or plasma samples. Method for site specific analysis was applied to the discovery cohort, consisting of 370 participants, 185 colorectal cancer patients and 185 controls. Samples were obtained from the biobank Leiden University Medical Center in the Netherlands. Furthermore, haptoglobin N-glycome analysis using UHPLC-FLR was performed on samples from the validation cohort. The validation included 224 plasma samples from colorectal cancer patients and 269 controls collected at the Sestre milosrdnice University Hospital Center in Zagreb, Croatia. Logistic regression was used to test for associations of glycopeptide and labeled N-glycans features with case-control status. Statistically significant changes were observed in increased levels of less branched glycan structures, total fucosylation, and sialylation. While certain changes were specific for the glycosylation site, the discovery cohort findings were replicated in the validation study. Changes in fucosylation and sialylation reflect alterations previously reported in total plasma N-glycome.

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

Thesis includes: 75 pages, 24 figures, 10 tables and 91 references. Original is in Croatian language.

Keywords: colorectal cancer, haptoglobin, N-glycosylation, liquid chromatography, mass spectrometry

Mentor: **Gordan Lauc, PhD**, *Full Professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Sanja Dabelić, PhD**, *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Dunja Rogić, PhD, *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Neven Ljubičić, PhD, *Full Professor with tenure, University of Zagreb School of Medicine*

The thesis was accepted: January 17th 2024