

Određivanje stupnja glikozilacije alfa-1-kiselog glikoproteina na pet glikozilacijskih mjesta korištenjem LC-MS metode

Rajković, Ema

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:405050>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-13**



Repository / Repozitorij:

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



Ema Rajković

**Određivanje stupnja glikozilacije alfa-1-kiselog
glikoproteina na pet glikozilacijskih mjesta
korištenjem LC-MS metode**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Tome Kesera.

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Tomi Keseru na vodstvu, strpljenju, trudu i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem obitelji na nepokolebljivoj podršci i ohrabrenju tijekom svih godina studiranja.

Zahvaljujem svim prijateljima s kojima sam provodila sate i dane učeći, bez kojih bi ti dani bili puno teži.

Posebno zahvaljujem kolegicama Ani i Silviji na međusobnoj potpori i motivaciji tijekom studija te na divnom prijateljstvu koje nam je ovaj studij omogućio.

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Glikani, glikom i glikozilacija.....	1
1.1.1.	Struktura i sinteza glikoproteina	2
1.1.2.	Uloga glikana u organizmu	5
1.1.3.	Glikani kao biomarkeri.....	5
1.2.	AGP	7
1.2.1.	Struktura AGP	7
1.2.2.	Uloga AGP u organizmu	9
1.2.3.	AGP kao biomarker	9
1.3.	LC-ESI-MS	12
1.3.1.	Određivanje zaokupljenosti glikozilacijskog mjesta pomoću LC-MS metode....	16
2.	Obrazloženje teme.....	17
3.	Materijali i metode	18
3.1.	Uzorci	18
3.2.	Materijali	18
3.3.	Oprema	20
3.4.	Metode.....	21
3.4.1.	Obogaćivanje AGP taloženjem.....	21
3.4.2.	Redukcija, alkilacija i digestija tripsinom	21
3.4.3.	C18-SPE obogaćivanje glikopeptida.....	22
3.4.4.	LC-MS analiza	22
4.	Rezultati i rasprava	24
5.	Zaključak.....	32
6.	Popis kratica, oznaka i simbola.....	33
7.	Literatura.....	36
8.	Sažetak/summary	40

1. Uvod

1.1. Glikani, glikom i glikozilacija

Glikani su molekule sastavljene od šećernih jedinica povezanih glikozidnom vezom u razgranate strukture (Cohen i Varki, 2014). Na površini stanica sisavaca sastoje se od 10 vrsta monosaharida: glukoze (Glc), galaktoze (Gal), manoze (Man), fukoze (Fuc), N-acetilglukozamina (GlcNAc), N-acetilgalaktozamina (GalNAc), ksiloze (Xyl), glukuronske kiseline (GlcA), iduronske kiseline (IdA) i sijalinske kiseline (SiA) (Sharma i sur., 2020). Uključeni su u osnovne funkcije stanice i organizma, kao što su međustanične interakcije posredovane receptorima, a pokrivaju površine svih stanica u prirodi, tvoreći gusti i složeni sloj poznat kao glikokaliks. Glikani su također mnogobrojni na sekretornim proteinima i u izvanstaničnom matriksu (Cohen i Varki, 2014; Smith i Bertozzi, 2021).

Glikom se sastoji od ugljikohidratnih lanaca (tj. glikana) koji mogu biti slobodni (npr. hijaluronan) ili kovalentno povezani na molekulu proteina (glikoproteini i proteoglikani) ili lipida (glikolipidi) (Cohen i Varki, 2014; Reily i sur., 2019). Svaka poznata stanica prekrivena je glikanima što sugerira da je glikom bitan za život jednako kao genom, transkriptom, proteom, lipidom ili metabolom (Cohen i Varki, 2014).

Adicija oligosaharidnog lanca (glikana), tj. glikozilacija jedna je od najbrojnijih kotranslacijskih i posttranslacijskih modifikacija (Keser i sur., 2021). Reakcije glikozilacije događaju se kod cijelog spektra živih bića, od arheja i eubakterija do eukariota (Spiro, 2002). Glikokonjugati se razlikuju u sekvencama glikana te njihovim vezama i duljinom. Različitosti glikokonjugata doprinose različite preferencije enzimatskih mjesta te stereokemija alfa i beta konjugacija (Reily i sur., 2019).

Glikozilacija je najčešća posttranslacijska modifikacija proteina. Proteinska glikozilacija doprinosi strukturnoj raznolikosti molekula i utječe na funkciju proteina. Osim proteina, glikozilacija se događa na različitim biomolekulama te tako nastaju glikoproteini, proteoglikani, glikosfingolipidi. Također postoje i slobodni oligosaharidi, glikozaminoglikani i glikozilirana ribonukleinska kiselina (RNA). Najznačajniji i najistraživaniji su glikoproteini (Trbojević-Akmačić, 2022). Glikozilacija lipida i proteina događa se u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu (GA). U procesu sudjeluju glikoziltransferaze i glikozidaze u nizu koraka koji su kontrolirani slobodnošću supstrata, enzimskom aktivnošću, nivou genske transkripcije i enzimskom lokacijom. Zapravo, glikom određene stanice odražava

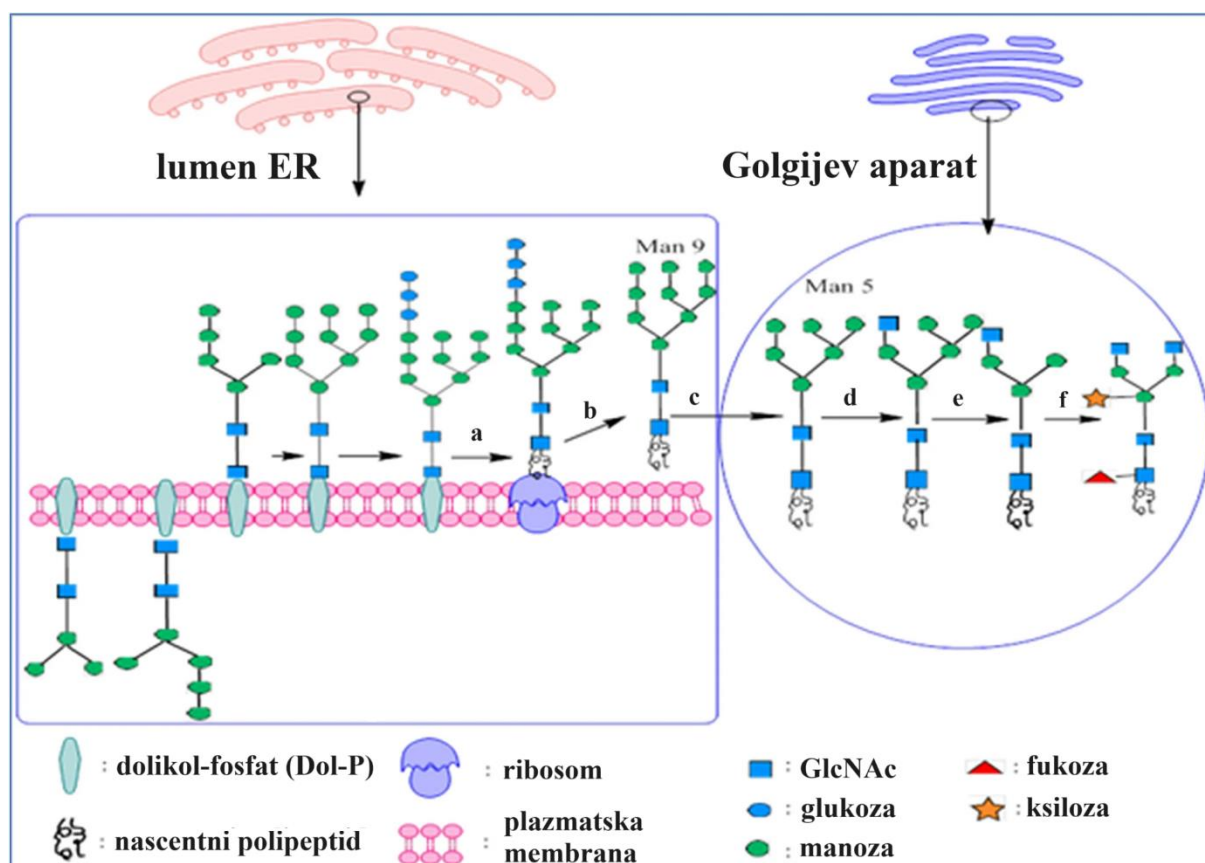
njezin jedinstveni obrazac ekspresije gena, koji kontrolira razine enzima odgovornih za glikokonjugaciju. Za razliku od genoma, egzoma ili proteoma, glikom se ne proizvodi na šablonski način te je složeno kontroliran na više razina u ER i GA. Proteinska glikozilacija uključuje dodavanje N-vezanih i O-vezanih glikana, fosforiliranih glikana, glikozaminoglikana i glikozilfosfatidilinozitol (GPI) sidra na peptidnu kost, također i C-manozilaciju triptofanskih ostataka. Glikolipidi uključuju glikosfingolipide (Reily i sur., 2019).

1.1.1. Struktura i sinteza glikoproteina

Glikoproteine možemo podijeliti na N-glikozilirane (šećer povezan preko atoma dušika) i O-glikozilirane glikoproteine. N-glikozilacija se događa kod specifične sekvence aminokiselina: asparagin-X-serin/treonin (Asn-X-Ser/Thr), gdje X može biti bilo koja aminokiselina (AK) osim prolina (Pro). Kod O-glikozilacije ne postoji specifična sekvenca AK. Jedino je bitno da je glikan povezan za Ser ili Thr. Glikoprotein može imati više glikozilacijskih mjesta (makroheterogenija) i više glikanskih vrsta na jednom mjestu (mikroheterogenija) (Trbojević-Akmačić, 2022). Međutim, ne moraju sva glikozilacijska mjesta biti u potpunosti zauzeta. Neke sekvence aminokiselina mogu ostati neprepoznate od strane mehanizma glikozilacije, budući da je proces glikozilacije složen i pod utjecajem različitih staničnih čimbenika i stanja (Hou i sur., 2023).

N-glikozilacija opisuje vezanje N-acetilglukoamina (GlcNAc) na atom dušika bočnog lanca asparagina (Asn) putem β -1N veze. Glikokonjugati povezani s Asn sadrže jezgru GlcNAc₂ i 3 manoze (Man), kojoj se može dodati ili ukloniti različiti broj drugih monosaharida. Tako može doći do galaktolizacije, GlcNAcilacije, sijalinizacije te fukozilacije (Reily i sur., 2019). Biosinteza N-glikana odvija se u dvije faze i u dva odjeljka eukariotskih stanica, ER i GA (prikazano na Slici 1). Prva faza je visoko očuvani put koji započinje na membrani ER na lipidnom nosaču dolikol-fosfatu (Dol-P). Dolazi do formiranja prekursora lipida u kojem GlcNAc i Man tvore razgranatu strukturu ugljikohidrata koja je vezana za Dol-P na citoplazmatskoj strani ER. Ovaj prekursor lipida zatim se okreće prema lumenu ER, gdje se dodaju Man i jedinice glukoze da formiraju strukturu od 14 šećera — Glc3Man9GlcNAc2. Uz pomoć oligosahariltransferaze, oligosaharid sastavljen na Dol-P prenosi se na Asn u odabranim Asn-X-Ser/Thr (u kojem X označava bilo koju AK osim Pro) sekvencama sekretornih i membranskih proteina tijekom njihove translokacije u ER. Druga faza započinje procesiranjem N-glikana pomoću glikozidaza i glikoziltransferaza u lumenu ER-a te dolazi do cijepanja triju jedinica glukoze pomoću α -glukozidaza (I i II) i jedne jedinice manoze uz pomoć ER α -manozidaze. Faza se nastavlja u GA na način specifičan za vrstu, tip stanice, protein, pa čak i

mjesto. Mnoge od glikozidaza i glikoziltransferaza različito su izražene i njihova je aktivnost izrazito osjetljiva na fiziološko stanje stanice. U cis-Golgijevom aparatu se strukture ugljikohidrata dodatno skraćuju nizom specifičnih manozidaza prije nego što se prebace u medijalni-Golgijev aparat na sazrijevanje. Unutar medijalnih i trans-Golgijevih odjeljaka proizvode se hibridni i složeni N-glikani dodatkom GlcNAc, galaktoze, sijalinske kiseline i šećera fukoze. Dakle, zreli glikoprotein nosi N-glikane koji ovise o specifičnom skupu gena za glikozilaciju izraženih u tipu stanice u kojoj se glikoprotein proizvodi. Dodatno, fiziološko stanje stanice, koje utječe na lokalizaciju i aktivnost enzima glikozilacije i transportera nukleotidnih šećera, također igra značajnu ulogu u određivanju sastava N-glikana (Reily i sur., 2019; Stanley i sur., 2022).



Slika 1: Pojednostavljeni prikaz N-glikozilacije u ER i GA. Malim slovima obilježeni su enzimi uključeni u proces biosinteze N-glikana: (a) oligosahariltransferaza (b) glukozidaza I i II (c) manozidaza I (d) N-acetilglukozaminiltransferaza-I (e) manozidaza II (f) različite modifikacije strukture N-glikana pomoću enzima N-acetilglukozaminiltransferaza-II (GnT-II), ksiloziltransferaza i fukoziltransferaza (preuzeto i prilagođeno prema Pandey i sur. (2022))

O-glikozilacija je prilično raznolika i opisani su različiti tipovi O-glikana za sekretorne proteine u eukariotima. Dok se biosinteza N-glikana može pokrenuti već u ER-u, većina

modifikacija O-glikana odvija se u Golgijevom aparatu. Tu se glikani vežu za atom kisika hidroksilnih skupina Ser ili Thr, tako da se dodaje jedan po jedan monosaharid (N-acetilgalaktozamin (GalNAc), fukoza, glukoza, ksiloza ili manaza) (Schoberer i sur., 2018; Thompson i Wakarchuk, 2022). U ljudi, najčešći šećeri povezani sa Ser ili Thr su GlcNAc i GalNAc.

Glikani vezani na GalNAc, također poznati kao O-glikani mucinskog tipa, visoko su zastupljeni u izvanstaničnim i izlučenim glikoproteinima, posebno mucinima, koji čine zaštitnu barijeru na površini sluznice. Mucini sadrže tandem ponavljanja bogata Pro, Ser i Thr, osiguravajući brojna mjesta za O-glikozilaciju. Ovi glikani stvaraju tvar sličnu gelu koja štiti glikoproteine i stanične površine od vanjskog stresa, mikrobne infekcije i imunološkog prepoznavanja. Početak sinteze O-glikana mucinskog tipa događa se u Golgijevom aparatu, gdje polipeptidne GalNAc transferaze (GALNTs) kataliziraju dodavanje O-GalNAc glikana na Ser/Thr ostatke proteina. GALNT-ovi pokazuju specifičnost za sekvence aminokiselina, ali također mogu pokazati promiskuitet, regulirajući mjesto i način vezanja O-glikana. Sekvencijalno dodavanje glikana početnom GalNAc dovodi do različitih struktura ugljikohidrata, koje su gusto grupirane na određenim glikoproteinima poput mucina i humanog imunoglobulina A1 (IgA1). Šećeri se dodaju dok se protein kreće kroz cis-, medijalni- i trans-Golgijev odjeljak. Za razliku od N-glikana, lanci O-glikana nisu podložni prethodnoj i naknadnoj obradi u Golgijevim odjeljcima. Umjesto toga, glikopeptidni O-glikani prolaze modifikaciju glikoziltransferazama, proširujući postojeće strukture galaktozom, GlcNAc, sijalinskom kiselinom i ponekad fukozom. Substancična lokalizacija, razine aktivnosti i specifičnosti supstrata ovih glikoziltransferaza određuju raspon sintetiziranih O-glikana (Reilly i sur, 2019).

Glikozilacija O-GlcNAc značajno se razlikuje od drugih uobičajenih oblika glikozilacije proteina u nekoliko ključnih aspekata: po lokaciji, strukturi i dinamičkoj regulaciji. Modifikacija O-GlcNAc događa se isključivo unutar jezgrinih i citoplazmatskih odjeljaka stanice, za razliku od drugih vrsta glikozilacije koje se mogu dogoditi na izvanstaničnim i membranski vezanim proteinima. GlcNAc dio tipično nije izdužen ili modificiran kako bi tvorio složenije glikanske strukture, što ga razlikuje od drugih oblika glikozilacije koji često uključuju opsežnije remodeliranje glikana. Modifikaciju O-GlcNAc reguliraju O-povezane GlcNAc transferaze (OGT) i O-GlcNAkaze (OGA), a karakterizirana je svojom dinamičkom prirodom, pri čemu se GlcNAc veže i uklanja više puta tijekom životnog vijeka polipeptida. Taj se proces može odvijati brzo i različitim brzinama na različitim mjestima na polipeptidu te igra ključnu

ulogu u regulaciji različitih staničnih funkcija, uključujući stanični metabolizam (Reily i sur, 2019; Zachara i sur., 2022).

1.1.2. Uloga glikana u organizmu

Glikani igraju više ključnih uloga u staničnom odgovoru na podražaje iz okoliša, staničnom rastu i diferencijaciji. Specifične promjene u sastavu glikana izravno su povezane s mnogim bolestima. Studije rijetkih genskih poremećaja koji utječu na glikozilaciju isprva su istaknule biološku važnost glikoma, a tehnološki napredak poboljšao je razumijevanje njegove heterogenosti i složenosti. Biološke funkcije glikana mogu se općenito kategorizirati u tri područja: (1) strukturni doprinosi: glikani doprinose strukturi npr. stanične stijenke i izvanstaničnog matriksa, a također igraju ulogu u savijanju i funkcioniranju proteina; (2) energetske metabolizam: ugljikohidrati služe kao izvori ugljika za skladištenje i uključeni su u manipuliranje ponašanjem životinja, poput oprašivanja i širenja sjemena; (3) nosači informacija: glikani djeluju kao prijenosnici informacija predstavljanjem molekularnih uzoraka koje prepoznaju proteini koji vežu glikane (GBP, engl. *glycan-binding proteins*). Ove interakcije posreduju u različitim staničnim procesima i signalnim putovima (Gagneux i sur., 2022; Reily i sur, 2019).

1.1.3. Glikani kao biomarkeri

Heterogenost glikana asocira se s brojnih bolestima, a analiza glikana pokazuje odličan dijagnostički potencijal (Keser i sur., 2021). Glikani imaju ključnu ulogu u funkcijama glikokonjugata, staničnim procesima i ukupnoj homeostazi organizma. Zato su mutacije u genima odgovornim za biosintezu glikana od vrlo visoke važnosti. Te mutacije mogu dovesti do smrtnosti embrija ili dovesti do kongenitalnih poremećaja glikozilacije. Štoviše, promjene u glikozilaciji primijećene su u bolestima središnjeg živčanog sustava, uključujući neurodegenerativna stanja poput Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti. Karakteriziranje obrazaca glikozilacije i specifičnih epitopa glikana u mozgu, kao i razumijevanje njihove deregulacije u stanjima bolesti, pokazuje veliki potencijal za razjašnjavanje mehanizama bolesti, identificiranje biomarkera i razvoj terapijskih ciljeva (Costa i sur., 2023).

Bolesti su rezultat mnoštva čimbenika, uključujući genske varijacije, epigenske promjene i utjecaje okoliša. Geni dominantno upravljaju embrionalnim razvojem i prijenosom svojstava na sljedeću generaciju, dok glikani odražavaju utjecaj unutarnjih i vanjskih okolišnih čimbenika, kao što su bolesti, životni izbori i društveni čimbenici, na zdravlje i bolest pojedinca. Za razliku od gena, glikani nisu izravno kodirani u genskom predlošku. Umjesto toga,

dinamički ih okupljaju brojni enzimi organizirani u složene biosintetske putove (Hu i sur., 2019). Među raznim posttranslacijskim modifikacijama (PTM), glikozilacija je posebna po sposobnosti odražavanja dinamike ovih zamršenih interakcija u stvarnom vremenu, nudeći potencijalne dijagnostičke i prognostičke biomarkere za multifaktorske bolesti.

Glikani igraju ključnu ulogu u modificiranju funkcija proteina i sudjeluju u različitim unutarstaničnim i međustaničnim biološkim aktivnostima. Većina staničnih površinskih i izlučenih proteina ukrašeni su glikanima, koji su sastavni dio procesa molekularnog prepoznavanja tijekom virusnih infekcija, adhezije stanica u upalama, metastaza tumora i drugih kritičnih događaja. Štoviše, prepoznato je da interakcije proteina i glikana značajno doprinose procesima koji utječu na progresiju bolesti. Na primjer, abnormalni obrasci glikozilacije često se opažaju i kod pacijenata s rakom, dijabetesom, upalama i drugim srodnim stanjima (Paton i sur., 2021). Desetljećima su promjene u glikozilaciji proteina prepoznate kod pacijenata s rakom i autoimunim stanjima, zato su većina odobrenih biomarkera raka glikoproteini. Međutim, analiza glikozilacije predstavlja izazov zbog zamršene i heterogene prirode glikanskih struktura u usporedbi s drugim PTM. Preko 70% proteina ljudske krvi je glikozilirano, igrajući značajnu ulogu u staničnoj adheziji, komunikaciji i metabolizmu. Unatoč tome, samo je nekoliko glikoproteina profilirano na glikanski način specifičan za mjesto, budući da je profiliranje glikana specifično za mjesto i dalje izazovno. Umjesto toga, trenutačni naponi u otkrivanju glikanskih biomarkera obično se usredotočuju na otpuštene glikane. Analiza otpuštenih N-glikana odvojenih od njihovih mjesta vezivanja nudi sveobuhvatan pogled na promjene glikozilacije cijelog sustava, što se pokazalo obećavajućim u istraživanju biomarkera. Otpušteni glikani povezani su s raznim bolestima, uključujući rak prostate i jajnika (Li i sur., 2019).

Produkti glikozilacije, često promijenjeni kod raka, nude ključne prednosti u odnosu na proteine kao mete. Prvo, promjene u mehanizmu glikozilacije mogu se identificirati iz podataka mikromreža i prevesti u strukturne termine. U tom kontekstu kao primjer, pojačane glikoziltransferaze u stanicama raka ukazuju na strukturne anomalije povezane s bolešću. Drugo, jedan protein može nositi više kopija izmijenjenog glikana, pojačavajući osjetljivost detekcije. Na kraju, glikozilacija štiti okosnice peptida od razgradnje, što ukazuje na veću stabilnost biomarkera temeljenih na glikanu u usporedbi s nemodificiranim proteinima (Drake i sur., 2010).

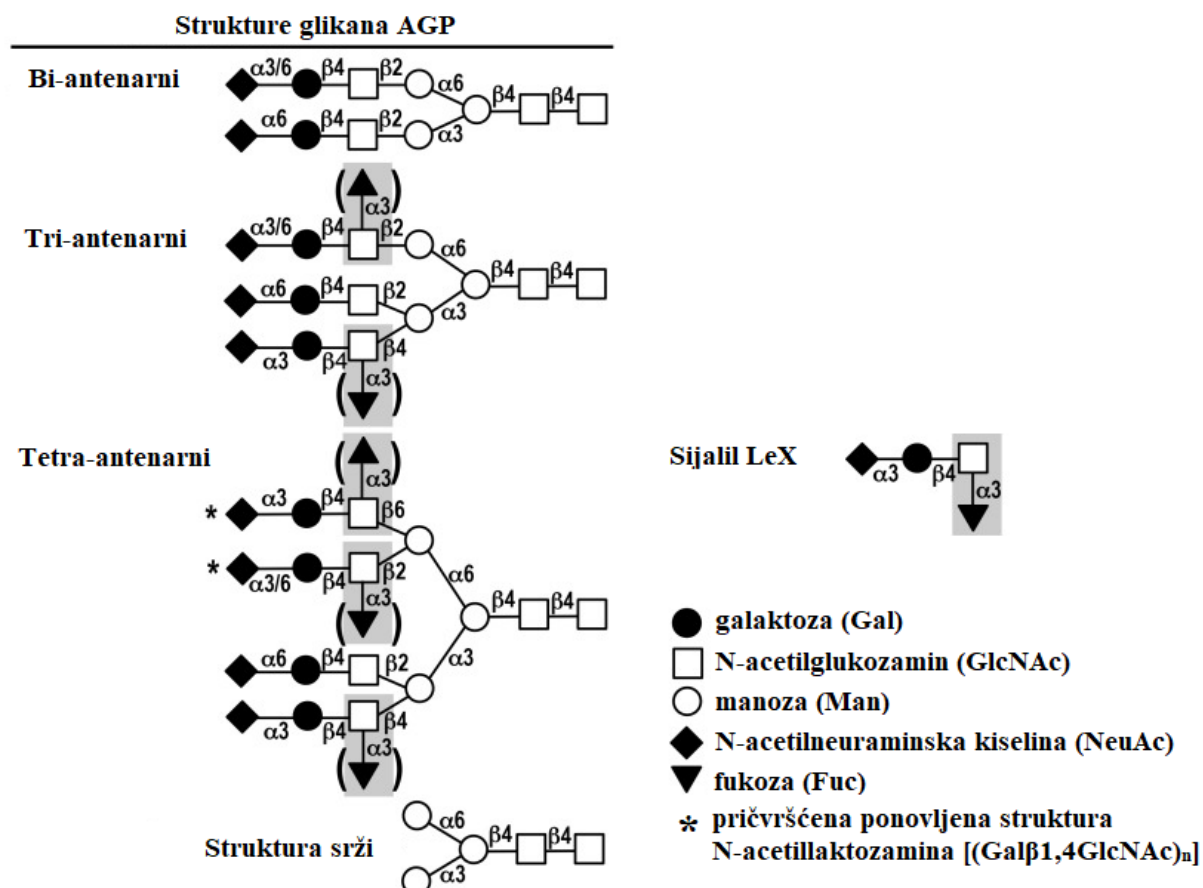
1.2. AGP

Alfa-1-kiseli glikoprotein (AGP), također zvan i orosomukoid (ORM), pripadnik je proteinske obitelji lipokaina. AGP se sintetizira u jetri i većinom se nalazi u plazmi, ali također se može naći u drugim tkivima kao što je mozak ili adipozno tkivo (Ruiz, 2021). AGP je jedan od glavnih proteina akutne faze (APP) kod čovjeka, miševa, štakora i drugih vrsta. Proteine akutne faze proizvodi jetra kao odgovor na različite stresore, uključujući fizičke traume poput operacije ili ozljede, bakterijske infekcije ili nespecifične upalne okidače. Iako su hepatociti glavni lučitelji AGP-a, uočena je i izvanjetrena ekspresija AGP gena. Ekspresiju AGP-a kontrolira kombinacija glavnih regulatornih medijatora, glukokortikoida i mreža citokina, najviše interleukin-1 β (IL-1 β), faktor nekroze tumora- α (TNF- α), interleukin-6 i interleukin-6 srodni citokini. U mnogim slučajevima njihovo zajedničko djelovanje rezultira snažnim sinergističkim učinkom. Nedavne studije su otkrile da interleukin-8 (IL-8) također može stimulirati proizvodnju AGP-a u izoliranim ljudskim hepatocitima. Osim citokina i glukokortikoida, retinske kiseline (RA) uključene su u modulaciju proizvodnje proteina akutne faze. Što se tiče ekspresije AGP-a, RA pojačava odgovor IL-6, ali djeluje kao negativni regulator sinteze glasničke RNA (mRNA) AGP izazvane glukokortikoidima (Fournier i sur., 2000).

1.2.1. Struktura AGP

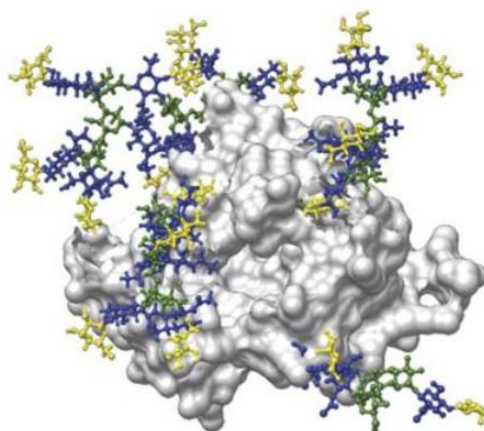
Ljudski AGP ima molekularnu masu 41-43 kDa, od čega otprilike 45% sadržaja čine ugljikohidrati raspoređeni kao pet N-povezanih glikana kompleksnog tipa (Fournier i sur., 2000; Keser i sur., 2021).

AGP je jedan od rijetkih serumskih glikoproteina koji sadrži tetra-antenne N-vezane glikane, uz bi-antenne i tri-antenne (Slika 2). Glikani su vezani na asparaginska mjesta: Asn-33, -56, -72, -93, -103. Strukturna raznolikost ovih glikana proizlazi iz širokog spektra završnih šećera koje posjeduju. Sijalinska kiselina ističe se kao uobičajeni završni šećer, sposoban vezati se na ostatak galaktoze preko α 2-3 ili α 2-6 veze. U obliku N-acetil neuraminske kiseline čini 10-12% ukupnih monosaharida zbog čega AGP ima nisku izoelektričnu točku (pI=2,8-3,8) te negativan naboj na površini (Taguchi i sur., 2013; Keser i sur., 2021).



Slika 2: Strukture bi-, tri- i tetra-antenarnih glikana AGP-a, struktura srži koja je zajednička svim oblicima te struktura sijalil Lewisovog^x antigena (preuzeto i prilagođeno prema Yazawa i sur. (2016))

Dodatno, fukoza služi kao još jedan završni šećer, povećavajući ekspresiju sijalil Lewisovog^x epitopa (sLeX) u akutnim i kroničnim upalnim stanjima. Ovi različiti obrasci grananja i završni šećeri doprinose heterogenosti AGP-a, a literatura izvještava o najmanje 20 različitih glikanskih struktura unutar AGP-a (Taguchi i sur., 2013).



Slika 3: Struktura AGP-a: sivo prikazan protein te pet glikozilacijskih mjesta prikazano bojama (preuzeto i prilagođeno prema Wu i sur. (2018))

Ljudski AGP (prikazan na Slici 3) kodiran je s tri gena — AGP-A, AGP-B i AGP-B' — koji se nalaze na kromosomu 9. U znanstvenoj literaturi, AGP-A se alternativno naziva ORM1, dok su AGP-B i AGP-B' sinonimi za ORM2. AGP-A pretežno eksprimira AGP1 u jetri, s razinama ekspresije koje premašuju 100 puta one od AGP-B i AGP-B'. AGP-B i AGP-B' dijele identične strukture i kodiraju AGP2, koji se od AGP1 razlikuje po 22 aminokiseline. AGP1 pokazuje polimorfizam s tri blisko povezane genske varijante: F1, F2 i S, koje se razlikuju u manje od pet aminokiselina. Ove varijante se obično nazivaju AGP1*F1, AGP1*F2 i AGP1*S. AGP-B i AGP-B' (AGP2) kodiraju gensku varijantu AGP2*A. Većina pojedinaca ima kombinaciju ovih varijanti. Najzastupljeniji fenotip je F1 + S + A (50%), zatim F1 + A (35%) i S + A (15%). Dok su F1 i S varijante globalno rasprostranjene, F2 varijanta ograničena je na Europljane, Sjevernoafrikance i Zapadnu Aziju. U većine zdravih osoba, molarni omjer F1*S prema A varijanti u krvi je približno 2 do 3:1. Međutim, ovaj omjer može porasti do 8:1 u bolesnim stanjima zbog inducibilnosti AGP1 (Fournier i sur., 2000; Keser i sur., 2021).

1.2.2. Uloga AGP u organizmu

AGP se često opisuje kao transportni protein s imunomodulirajućim svojstvima. Biološka uloga mu nije u potpunosti poznata, iako su dokumentirane različite *in vitro* i *in vivo* aktivnosti, uključujući protuupalne i imunomodulatorne učinke (npr. modulaciju proliferacije limfocita i inhibiciju agregacije trombocita) te prijenos raznolikog niza endogenih (kao što su serotonin, faktor aktivacije trombocita, histamin i melatonin) i egzogenih liganada (uključujući lijekove i kontaminante) (Bteich, 2019; Taguchi i sur., 2013).

Funkcije AGP-a osiguravaju nespecifičnu zaštitu od gram-negativnih bakterijskih infekcija i smrtnosti izazvane TNF-om, dok također potiču protuupalni fenotip M2 monocita koji može spriječiti odgovor na bakterijsku infekciju. AGP inhibira migraciju neutrofila u sepsi, pridonoseći infekciji. AGP je uključen u odbacivanje alografta nakon transplantacije bubrega, ima antiheparinske učinke smanjujući antikoagulaciju krvi i povezan je s većom incidencijom ishemijskog moždanog udara i karotidnih plakova. Stabilizira aktivnost inhibitora aktivatora plazminogena tipa I, utječući na trombozu, ali također inhibira agregaciju trombocita, nudeći zaštitu od ishemije/reperfuzijske ozljede sprječavanjem apoptoze i upale (Sumanth i sur., 2020).

1.2.3. AGP kao biomarker

Jedna potencijalna primjena AGP-a je njegova uporaba kao biomarkera za procjenu zdravstvenog statusa životinja u razvoju lijekova. Korištenje AGP-a kao specifičnog biomarkera za praćenje i identifikaciju bolesnih životinja i/ili predviđanje potencijalnog

utjecaja subkliničke infekcije na farmakokinetiku/farmakodinamiku lijeka (PK/PD) vrlo je korisno. Takav alat za probir mogao bi pomoći u optimiziranju odabira životinja točnim identificiranjem zdravih jedinki. Poboljšano praćenje zdravlja unutar studije povećalo bi povjerenje u PK/PD podatke i njihovu prediktivnu učinkovitost (Boyle i sur., 2021).

Metode koje se koriste u korištenju upalnih biomarkera, poput AGP, uključuju različite tehnike za predviđanje rizika, praćenje odgovora na terapiju i prilagođavanje nutritivnih biomarkera za preciznu interpretaciju. Serum služi kao temeljni izvor biomarkera, dok se urin i slina pojavljuju kao alternativne biotekućine zbog svoje brze dostupnosti, neinvazivnosti, minimalnih zahtjeva za obradu uzoraka i smanjenih rizika od biološke opasnosti.

AGP se često koristi zajedno s C-reaktivnim proteinom (CRP) za određivanje vremena i ozbiljnosti infekcija koje utječu na biomarkere mikronutrijenata. Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje mjerenje AGP-a i CRP-a za prilagodbu i tumačenje biomarkera vitamina A i željeza u istraživanjima i opsežnim anketama. AGP je također dio prognostičkog inflamatornog nutricionističkog indeksa, predviđajući komplikacije, gubitak tjelesne težine i smrtnost nakon operacije za karcinome probavnog sustava.

Razine AGP-a u serumu obično se kreću od 0,4 do 1,2 mg/mL, ali mogu doseći i do 3 mg/mL. AGP raste sporije i ostaje povišen dulje nego CRP, što ga čini korisnim za procjenu kronične upale. Granična vrijednost AGP-a od 1,0 mg/mL obično se koristi za podešavanje biomarkera nutritivnog statusa, iako regresijski pristupi mogu koristiti kontinuirane varijable za biomarkere upale (Gannon i sur., 2019). Promijenjene razine AGP proteina povezane su s različitim stanjima, uključujući rak pluća i dojke te maligni mezoteliom. Povećanje koncentracije AGP-a može smanjiti nuspojave poput upale putem negativne povratne sprege. Povišene koncentracije povezane su s ekspresijom ORM1 i ORM2 genskih varijanti AGP-a; međutim, udjeli svake varijante ne moraju se nužno razlikovati od onih kod zdrave osobe. U bolesnika s rakom dojke, razine AGP-a u plazmi rastu s progresijom bolesti, ali se normaliziraju nakon liječenja tamoksifenom, što ukazuje na vezu između odgovora akutne faze (APR) općenito (posebno s razinama AGP-a) i prognoze raka dojke i razina AGP-a (Smith i sur., 2012).

Dok koncentracija AGP-a sama po sebi nije dijagnostička, promjene u glikozilaciji AGP-a (mikroheterogenost) bi potencijalno mogle poslužiti kao marker bolesti. Promjene u glikoformama AGP-a, uključujući varijacije u njihovim antenskim strukturama, razinama α 1,3-fukozilacije ili obrascima sijalinizacije, opažene su u različitim patološkim i fiziološkim stanjima. Povišene razine bi-antenarnih i α 1,3-fukoziliranih N-glikanskih struktura

dokumentirane su kod pojedinaca pogođenih upalom, reumatoidnim artritisom, rakom i dijabetes melitusom. Suprotno tome, tijekom trudnoće i liječenja estrogenom primijećeno je povećanje visoko razgranatih N-glikana i smanjenje α 1,3-fukozilacije (Higai i sur., 2005).

Virag i sur., (2021) razvili su i optimizirali HILIC-MS/MS (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry*) metodu za karakterizaciju obilježenih N-glikana otpuštenih s AGP-a u ljudskom serumu. Pokazali su da su promjene u sastavu glikana AGP-a u ljudskom serumu značajne za dijagnosticiranje malignog melanoma, a razlike između zdravih i kancerogenih skupina primarno su vidljive u regulaciji fukoziliranih izomera glikana i smanjenoj regulaciji njihovih nefukoziliranih parova kod kancerogenih skupina. Dodatno, pomaci u omjerima određenih izomera ukazuju na povećani stupanj povezivanja α -2,6 sijalinske kiseline u nekim strukturama glikana. Keser i sur., (2021) predstavili su ekonomičnu metodu za LC-MS (engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*) analizu N-glikozilacije AGP visokog protoka i specifičnu za mjesto glikozilacije na razini glikopeptida koju su testirali na populaciji koja uključuje osobe s povećanim rizikom od razvoja dijabetesa tipa 2. Pojedinci s većim rizikom od dijabetesa pokazali su povećano grananje AGP N-glikana i nižu sijalinizaciju na nekim glikozilacijskim mjestima u usporedbi s kontrolama. Opaženo relativno smanjenje sijalinizacije u AGP glikanima moglo bi biti specifično za predispoziciju za dijabetes tipa 2. Tijardović i sur., (2022) analizirali su N-glikozilaciju AGP-a kod osoba s dijagnozom dijabetesa zrele dobi kod mladih uzrokovanom varijantama HNF1A, tj. HNF1A-MODY (engl. *Maturity-Onset Diabetes of the Young caused by HNF1A variants*). U usporedbi s drugim podtipovima dijabetesa, analiza je otkrila značajno smanjenje fukozilacije. Pacijenti s varijantama koje uzrokuju bolest imali su niže razine fukoziliranih glikopeptida u usporedbi s onima s benignim ili vjerojatno benignim varijantama. Ovo saznanje omogućuje upotrebu analize glikopeptida AGP kao dijagnostičkog alata za HNF1A-MODY.

Promjene u glikozilaciji AGP-a povezane su s progresijom raka. Više razine sijaliniziranih i fukoziliranih AGP glikana nalaze se u hepatocelularnom karcinomu (HCC) i cirozi u usporedbi sa zdravim pojedincima, što potencijalno identificira stadije raka (Choi i sur., 2020). Profiliranjem masenom spektrometrijom otkriven je jedinstveni trifukozilirani tetra-antenarni N-glikan AGP-a, pretežno pronađen u bolesnika s HCC-om. Ova nova glikanska struktura, koja nije primijećena u drugim glikoproteinima u serumu, značajno je povišena u pacijenata s HCC-om u usporedbi s onima s cirozom, što ukazuje na njen potencijal kao ranog biomarkera za HCC (Liang i sur., 2019). Visoko fukozilirane AGP glikoforme povezane su s lošom prognozom nakon operacije, dok niske razine ukazuju na bolju prognozu. Povišene

fukozilirane glikoforme opažene su kod raka gušterače i općenito pacijenata oboljelih od raka, što sugerira da smanjenje ovih formi može pomoći u procjeni kirurške prognoze. Sve u svemu, razine AGP u serumu i promjene glikozilacije ključni su pokazatelji progresije raka (Choi i sur., 2020).

1.3. LC-ESI-MS

Za proizvodnju i analizu kemijskih spojeva ključno je razdvajanje spojeva. Tekućinska kromatografija (LC) jedan je od najčešće korištenih alata za razdvajanje spojeva različite veličine, od malih organskih spojeva do velikih biomakromolekula. Osnova tekućinske kromatografije je razdvajanje analita prema njihovim kemijskim i fizikalnim značajkama zbog različitih interakcija sa stacionarnom i mobilnom fazom (Rusli i sur., 2022). LC je prikladna za analizu spojeva topljivih u tekućinama jer mobilnu fazu čine tekućine, kao što su voda, metanol, acetonitril ili heksan. Silika gel (s dodatkom funkcionalnih skupina) čini stacionarnu fazu. Kromatografske kolone punjene su mikrometarskim česticama koje se obično sastoje od silicija ili aluminijevog oksida i kemijski su povezane s polarnim (hidrofilnim) ili nepolarnim (hidrofobnim) funkcionalnim skupinama. Tekućinska kromatografija u kojoj je stacionarna faza polarna naziva se kromatografija normalne faze, dok je ona gdje je stacionarna faza nepolarna kromatografija reverzne faze (Yamamoto, 2023).

Masena spektrometrija (MS) je analitička metoda u kojoj dolazi do pretvorbe molekule analita u nabijeno (ionizirano) stanje, nakon čega slijedi analiza tih iona i svih fragmenata iona proizvedenih tijekom ionizacije (Pitt, 2009). Podaci masene spektrometrije obično se izražavaju u jedinicama omjera mase i naboja ili m/z , gdje m predstavlja molekulsku masu iona (u daltonima), a z označava broj naboja prisutnih na izmjerenoj molekuli. Masena spektrometrija vrlo je moćna tehnika koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju širokog spektra klinički relevantnih analita. U kombinaciji s plinskom ili tekućinskom kromatografijom, maseni spektrometri proširuju analitičke mogućnosti na različite kliničke primjene (Garg i Zubair, 2023).

Maseni spektrometar uvijek sadrži sljedeće elemente: ulaz za uzorak koji se analizira, izvor ionizacije za proizvodnju iona iz uzorka, jedan ili više analizatora mase za odvajanje iona, detektor za kvantificiranje iona koji izlaze iz posljednjeg analizatora te sustav za obradu podataka pomoću kojeg se dobiva maseni spektar (Hoffmann i Stroobant, 2007). Pomoću ulaznog sustava uvodi se mikro količina uzorka u izvor iona. Tamo se zbog bombardiranja

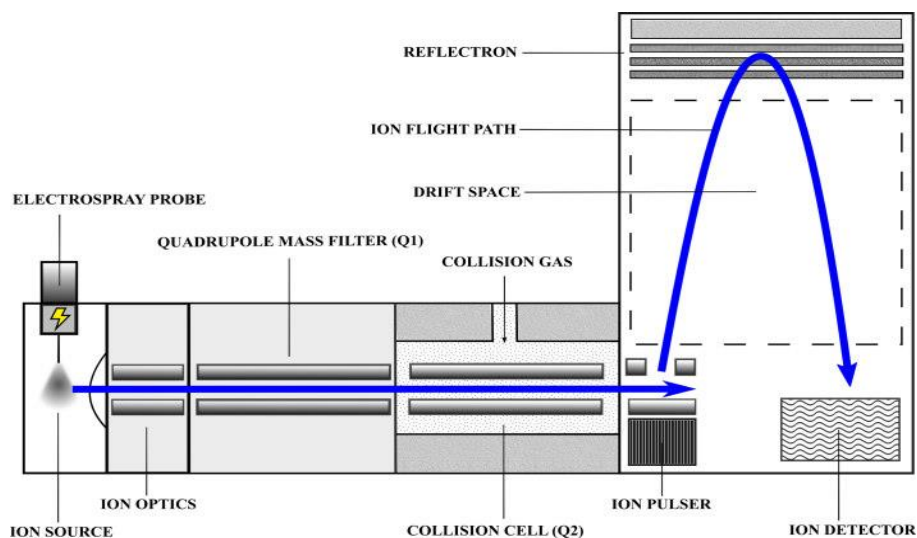
elektronima, fotonima, ionima ili molekulama, komponente uzorka pretvaraju u plinovite ione. Izvor ionizacije u atomskoj masenoj spektrometriji nalazi se izvan evakuiranog područja, a postiže se primjenom toplinske ili električne energije. Ionizacija rezultira stvaranjem struje pozitivnih ili negativnih plinovitih iona. Nastali ioni ubrzavaju se u analizator mase, a analizator ih zatim razdvaja na temelju njihovih omjera mase i naboja. Ioni određenih m/z vrijednosti potom se skupljaju i pretvaraju u električni signal pomoću ionskog pretvarača. Na kraju, sustav za obradu podataka obrađuje rezultate za generiranje masenog spektra. Ova obrada može uključivati usporedbu dobivenih spektara s poznatim spektrima, tabeliranje rezultata i pohranjivanje podataka za daljnju analizu (Skoog, 2014).

Razdvajanje iona na temelju omjera njihove mase i naboja može biti bazirano na različitim principima. Tako postoji raznolikost masenih analizatora. Svi analizatori koriste statičko, dinamičko električno ili magnetsko polje koje može biti samostalno ili kombinirano. Osnovna razlika među analizatorima je način na koji se takva polja koriste za postizanje odvajanja. Analizatori se mogu općenito kategorizirati u dva razreda na temelju različitih svojstava.

Skenirajući analizatori sekvencijalno odašilju ione različitih masa duž vremenskog perioda. To su ili sektorski analizatori s magnetnim i električnim poljem ili kvadrupolni instrumenti (Hoffmann i Stroobant, 2007). U analizatoru magnetskog sektora odvajanje se događa otklonom u magnetskom polju, a njihov put je određen njihovim omjerom mase i naboja (m/z). Magnetsko polje se postupno prilagođava kako bi se ioni različitih m/z vrijednosti uskladili s detektorom. U masenom spektrometru s dvostrukim fokusom, električni sektor prethodi magnetskom sektoru. Elektrostatsko polje koncentrira snop iona s uskim rasponom kinetičkih energija na prorez koji vodi do magnetskog sektora, omogućujući analizu visoke razlučivosti. Kvadrupolni analizator mase ima četiri cilindrične elektrode koje funkcioniraju kao filteri mase koji omogućuju prolaz ionima specifičnog omjera mase i naboja. Gibanjem iona unutar električnog polja dolazi do odvajanja. Elektrode jedna nasuprot drugoj spojene su na istosmjerni i radiofrekventni napon, a jedan par elektroda ima pozitivni, dok drugi ima negativni naboj. Podešavanjem napona, ioni s određenim omjerom m/z prolaze kroz analizator do pretvarača. Maseni spektri dobiveni su skeniranjem napona elektrode. Kvadrupolni analizatori nude visoku propusnost, ali nižu razlučivost, obično oko jedinice mase (1 Da), prikladni za mnoge primjene elementarne masene spektrometrije ili kada se koriste kao detektori za molekule odvojene kromatografijom (Cindrić i sur., 2009; Skoog, 2014).

S druge strane, drugi analizatori dopuštaju istodobni prijenos svih iona, kao što su disperzivni magnetski analizatori, analizatori mase vremena leta (TOF) i analizatori mase zarobljenih iona koji odgovaraju instrumentima za ionske zamke, ionsku ciklotronsku rezonanciju ili orbitrap (Hoffmann i Stroobant, 2007). U masenom spektrometru za mjerenje vremena leta (TOF), ioni slične kinetičke energije brzo se uzorkuju i šalju u područje bez polja. Budući da brzina iona varira obrnuto s masom, ioni s nižim vrijednostima m/z dosežu detektor brže od onih s višim vrijednostima m/z . To omogućuje sekvencijalno otkrivanje svake m/z vrijednosti. TOF instrumenti su jednostavni i izdržljivi, s neograničenim rasponom mase, ali imaju ograničenu rezoluciju i osjetljivost u usporedbi s drugim analizatorima, što ih čini rjeđim (Skoog, 2014).

Q-TOF-MS (engl. *quadrupole time-of-flight mass spectrometer*) je hibridni maseni spektrometar koji kombinira kvadrupolnu tehnologiju s TOF (prikazan na Slici 4). Funkcionira slično kao trostruki kvadrupolni maseni spektrometar, ali zamjenjuje treći kvadrupol s TOF cijevi. Prvi kvadrupol (Q1) može djelovati kao filter mase ili propuštati sve ione. Drugi kvadrupol (Q2) služi kao kolizijska ćelija za fragmentaciju iona kroz disocijaciju izazvanu sudarom ili može prenositi ione bez fragmentacije. Ioni se zatim ubrzavaju u ionskom modulatoru analizatora vremena leta gdje ih pulsira električno polje. Svi ioni koji su stekli istu kinetičku energiju potom ulaze u „let cijev“ koja je područje drifta bez polja gdje dolazi do razdvajanja mase jer lakši ioni putuju brže od težih. Reflektron uređaj ispravlja disperziju kinetičke energije i prostorno širenje, osiguravajući da ioni s istim omjerom mase i naboja (m/z) istovremeno dođu do detektora i povećavaju duljinu putanje leta za bolju rezoluciju mase (Allen i McWhinney, 2019).



Slika 4: Shematski prikaz qTOF masenog spektrometra (preuzeto iz Allen i McWhinney (2019))

Visoka senzitivnost i specifičnost masene spektrometrije dovela je do povezivanja ove tehnike s kromatografskim tehnikama. Prva kombinacija bila je s plinskom kromatografijom 1950-ih. Takva kombinacija je jednostavna jer je uzorak već u plinovitom stanju, a takvo stanje je potrebno za analizu na MS. Povezivanje s tekućinskom kromatografijom zahtjevnije je jer kako bi se pripremio uzorak plinovite faze za masenu spektrometriju, otopljena tvar otopljena u otapalu izlaznom iz LC kolone mora proći kroz isparavanje. Međutim, LC otapalo, nakon isparavanja, proizvodi volumen plina 10 do 1000 puta veći od plina nosača u GC. Posljedično, značajan dio otapala također se mora eliminirati. Tako su razvijeni različiti uređaji za rješavanje izazova uklanjanja otapala i sučelja LC kolone (Hoffmann i Stroobant, 2007; Pitt, 2009; Skoog, 2014).

Maseni spektrometar i tekućinski kromatograf povezani su međuspojem (engl. *Interface*) koji ima nekoliko uloga uključujući isparavanje tekućine, ionizaciju neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator. U međuspoju se događaju dva međufazna prijelaza: otparavanje i desorpcija (Cindrić i sur., 2009).

Elektrosprejna ionizacija (ESI) omogućila je spajanje tekućinskih kromatografija s masenim spektrometrima. ESI koristi električnu energiju kako bi olakšao prijenos iona iz otopine u plinovitu fazu prije masene spektrometrijske analize. Omogućuje ionizaciju izravno iz otopine izvan masenog spektrometra, što ih čini kompatibilnima sa svim HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) i UPLC (engl. *ultra performance liquid chromatography*) sustavima. ESI dobro radi s umjereno polarnim molekulama i stoga je dobro prikladan za analizu mnogih metabolita, ksenobiotika i peptida. Prijenos ionskih vrsta iz otopine u plinovitu fazu putem ESI uključuje tri glavna koraka: disperzija finog spreja nabijenih kapljica, zatim isparavanje otapala, te na kraju izbacivanje iona iz visoko nabijenih kapljica.

ESI se stvara primjenom jakog električnog polja, obično 3–6 kV, na tekućinu koja teče kroz kapilarnu cijev pri malom protoku (obično 1–10 $\mu\text{l min}^{-1}$) pod atmosferskim tlakom. Ovo električno polje inducira nakupljanje naboja na površini tekućine, što dovodi do stvaranja visoko nabijenih kapljica. Plin za raspršivanje (npr. dušik) povećava brzinu protoka uzorka smicanjem oko eluirane otopine uzorka. Nabijene kapljice, formirane na izlazu vrha elektrospreja, kreću se niz gradijent tlaka i potencijala prema području analizatora spektrometra mase. Povišena temperatura izvora ESI i/ili plin za sušenje dušika kontinuirano smanjuju veličinu kapljice isparavanjem otapala, povećavajući gustoću površinskog naboja i smanjujući polumjer kapljice. Kada jakost električnog polja unutar nabijene kapljice dosegne kritičnu

točku, ioni na površini kapljice izbacuju se u plinovitu fazu (Cindrić i sur., 2009; Ho i sur., 2003; Hoffmann i Stroobant, 2007; Pitt, 2009).

1.3.1. Određivanje zaokupljenosti glikozilacijskog mjesta pomoću LC-MS metode

Karakteriziranje glikozilacije specifične za mjesto ključno je za razumijevanje patologije i napredovanja bolesti, a potencijalno može pomoći u dijagnozi i liječenju. Koriste se različite metode masene spektrometrije (MS) i strategije analize podataka, koje zahtijevaju oprez pri odabiru izvora ionizacije, analizatora mase i tehnika detekcije. Glikozilirani oblici se obično pretvaraju u deglikozilirane oblike za kvantificiranje, a točna identifikacija ovih peptida je ključna. Odabir endoproteaze i slijed enzimske hidrolize također utječu na rezultate. Neke metode kvantificiraju popunjenost bez tretmana glikozidazom, koristeći teško označene interne standarde s LC-MS analizom. Ova metoda omogućuje istovremenu analizu intaktnih glikopeptida. Drugi pristup traži odgovarajuće neglikozilirane peptide za mjerenje popunjenosti. Zauzetost mjesta N-glikozilacije, udio glikoziliranih mjesta, izračunava se ili usporedbom intenziteta glikoziliranih i neglikoziliranih peptida ili povezivanjem glikoziliranih oblika specifičnih za mjesto s razinama proteina. Masena spektrometrija je najučinkovitiji alat za identifikaciju i karakterizaciju mjesta glikozilacije. Međutim, postoji potreba za osjetljivijim pristupima obogaćivanja i nepristranim metodama kvantifikacije za sveobuhvatno proučavanje glikozilacije u raznim bolestima.

LC-MS se naširoko koristi za analize popunjenosti mjesta u složenim ili kliničkim uzorcima. Napredak u LC-MS tehnologijama značajno je poboljšao kvantifikaciju zauzetosti mjesta N-glikozilacije, koristeći metode označavanja i metode bez označavanja (engl. *labeling and label-free methods*). Metode označavanja kao što su SILAC (engl. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), dimetilacija, TMT (engl. *tandem mass tags*) i iTRAQ (engl. *Isobaric tags for absolute and relative quantification*) uvode 'teške' i 'lake' izotope ili izobarne oznake u različite uzorke. Kvantitativni rezultati dobiveni su usporedbom zastupljenosti ovih izotopologa. Metode bez označavanja, koje nude jednostavnost u pripremi uzorka, oslanjaju se ili na spektralno brojanje ili na intenzitet peptidnih iona za kvantificiranje (Zhang i sur., 2017).

2. Obrazloženje teme

AGP je izrazito glikozilirani protein čija je N-glikozilacija promijenjena u mnogim različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Za razliku od imunoglobulina G, čija glikozilacija odražava opću imunološku aktivaciju, promjene glikozilacije AGP-a mogu biti specifične za bolest, naglašavajući njegov potencijal za otkrivanje novih biomarkera (Keser i sur., 2021). Stupanj glikozilacije pojedinog glikozilacijskog mjesta AGP-a dosad je neistražen. Poznato je da u različitim bolestima dolazi do promjene u glikozilaciji AGP-a te se postavlja pitanje dolazi li do promjene i u zauzetosti glikozilacijskih mjesta proteina.

Kako bi se po prvi puta ispitao stupanj glikozilacije AGP-a, u ovom je istraživanju korištena je metoda u kojoj se AGP obogaćuje taloženjem „seromukoidne“ frakcije iz dobivenih uzoraka ljudske plazme, nakon čega slijedi redukcija i alkilacija. Za određivanje zauzetosti mjesta glikozilacije, korišten je enzim peptid-N-glikozidaza F (PNGaza F) koji uklanja glikane s proteina, pretvarajući glikozilirani asparagin u asparaginsku kiselinu. Zauzetost se procjenjivala usporedbom količine peptida koji sadrže asparaginsku kiselinu s onima koji sadrže neglikozilirani asparagin. Međutim, spontana kemijska deamidacija asparagina tijekom pripreme uzorka može dovesti do netočnosti, budući da se neglikozilirani asparagin može pogrešno identificirati kao deglikozilirani asparagin (Zhu i sur., 2014), stoga su se u ovom istraživanju uzorci podijelili u 4 grupe. U prvu skupinu dodala se PNGaza F te nakon toga je slijedila tripsinizacija. U drugoj skupini prvo se izvršila tripsinizacija, a onda dodala PNGaza F. U treću i četvrtu skupinu umjesto PNGaze dodala se voda (u trećoj prije, a u četvrtoj nakon tripsinizacije) te one predstavljaju kontrolne uzorke u kojima ne dolazi do cijepanja glikana pomoću PNGaze. Nakon dodatka enzima ili vode glikopeptidi su se obogatili pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi uz C18 čestice na polipropilenskoj filtarskoj ploči. Dobiveni glikopeptidi analizirali su se obrnuto faznom kromatografijom na UPLC uređaju koji je bio spregnut s elektrosprej ionizatorom i qTOF masenim spektrometrom. U svakom uzorku analizirani su glikopeptidi, peptidi i deamidirani peptidi te se izračunao postotak stupnja glikozilacije svakog glikozilacijskog mjesta. Postotak neglikoziliranih peptida dobio se iz omjera zbroja nedeamidiranih i deamidiranih peptida kontrole te zbroja nedeamidiranih i deamidiranih peptida uzorka s dodanom PNGazom F.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci

Korišteni su uzorci pomiješane krvne plazme dobivene od velikog broja ispitanika iz prijašnje populacijske studije.

3.2. Materijali

Tablica 1. Anorganske kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
70% Perklorna kiselina	Merck
Fosfotungistična kiselina	Sigma-Aldrich
35% Klorovodična kiselina (HCl)	VWR International
10M Natrijev hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich
2M Amonijev bikarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Acros Organics

Tablica 2. Organske kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
Acetonitril (ACN)	VWR International
Chromabond® C18 kuglice	Macherey-Nagel
Ditiotrietol (DTT)	Sigma-Aldrich
Jodoacetamid	Sigma-Aldrich
50mM Octena kiselina	Promega
1,5% RapiGest SF surfaktant	Waters
0,1% Trifluorooctena kiselina (TFA)	Sigma-Aldrich

Tablica 3. Enzimi

Enzim	Proizvođač
TPCK-tretirani tripsin	Promega

PNGaza F	Promega
----------	---------

Tablica 4. Pripremljene otopine i suspenzije

Otopine i suspenzije	Priprema
0,75M Perklorna kiselina	Za 10mL otopine: potrebno je dodati 647 μ L 70% perklorne kiseline i ostatak (9353 μ L) vode
2% Fosfotungistična kiselina u 2N HCl	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 0,02g fosfotungistične kiseline, 177 μ L 35% HCl-a i ostatak (823 μ L) vode
1M HCl	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 88 μ L 35% HCl-a i ostatak (912 μ L) vode
0,1N NaOH	Za 10mL otopine: potrebno je dodati 100 μ L 10N NaOH i ostatak (9900 μ L) vode
30mM NH ₄ HCO ₃	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 15 μ L 2M NH ₄ HCO ₃ i ostatak (985 μ L) vode
15% RapiGest u 30mM NH ₄ HCO ₃	Za ~ 0.670 mL otopine: potrebno je dodati 657 μ L 30mM NH ₄ HCO ₃ u 10 μ g RapiGest-a koji se nalazi u originalnoj bočici
200mM DTT	Za 0,5mL otopine: potrebno je dodati 0,0154g DTT-a u 0,5mL vode
60mM DTT	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 300 μ L 200mM DTT-a i ostatak (700 μ L) vode
160mM Jodoacetamid	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 0,0296g jodoacetamida u 1mL vode
4.0 μ g/ μ L Otopina tripsina	Za 0.25mL otopine: 1mg tripsina otopi se u 0.25mL 50mM octene kiseline
2,0 μ g/ μ L Otopina tripsina	Za 0,2 mL otpine: u 100 μ L otopine koncentracije 4,0 μ g/ μ L dodaje se 100 μ L vode
0,4 μ g/ μ L Otopina tripsina	Za 1mL otopine: u 100 μ L 4.0 μ g/ μ L otopine tripsina dodaje se 900 μ L vode

0,08µg/µL Otopina tripsina	Za 0,5 mL otpine: u 100 µL otopine koncentracije 0,4 µg/µL dodaje se 400 µL vode
0,1% TFA	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 1ml TFA u 1000ml vode
50mg/mL Suspenzija Chromabond® C18 kuglica u 80% ACN + 0,1% TFA	Za 10mL suspenzije: potrebno je dodati 0,5g Chromabond® C18 kuglica u 10mL 0,1% TFA
90% ACN	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 100ml vode u 900ml ACN-a
95% ACN	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 50ml vode u 950ml ACN-a
80% ACN + 0,1% TFA	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 800ml vode u 200ml ACN-a i 1ml TFA

3.3. Oprema

Tablica 5. Laboratorijska oprema i pribor

Oprema i pribor	Proizvođač
PCR pločice u formatu s 96 jažica	Thermo Scientific
Jouan CT centrifuga	Thermo Scientific
Polipropilenska filter pločica s 96 jažica	Orochem
Vakuumska pumpa	Millipore Corporation
SpeedVac vakuumski koncentrat	Thermo Scientific
Vaga	Ohaus
Mikropipete	Mettler-Toledo Rainin
ACQUITY H-class UPLC sustav	Waters
Synapt G2-Si ESI-qTOF maseni spektrometar	Waters

Acclaim PepMap100 C8 (5 mm×300 µm i.d.) pretkolona	Waters
ACQUITY UPLC BEH C18 kolona, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 150 mm	Advanced Materials Technology

3.4. Metode

3.4.1. Obogaćivanje AGP taloženjem

AGP se obogaćuje taloženjem „seromukoidne“ frakcije iz dobivenih uzoraka ljudske plazme. U PCR ploči s 96 jažica potrebno je pomiješati 80 µl 0.75 M perklorne kiseline po jažici s 20 µl uzorka plazme kako bi se dobilo 0.6 M perklorne kiseline. Nakon toga uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 2250g pri temperaturi od 5°C. Supernatant se prebaci na novu PCR ploču pomoću 3D printanih adaptera, nakon čega se ponovo centrifugira malom brzinom na 15g u trajanju od 30 sekundi. Zatim se supernatantima dodaje 1/10 volumena (9 µL) 2% fosfotungistične kiseline u 2M HCl i ponovo centrifugira 10 minuta na 2250g na 5°C. Supernatanti se odbacuju, a talog koji je sadržavao obogaćeni AGP topi se s 30 µl 0,1 M NaOH dok otopina ne postane bistra.

3.4.2. Redukcija, alkilacija i digestija tripsinom

Solubiliziranim precipitatima dodaje se 2.5 µL 1,5% RapiGest SF surfaktanta u 30 mM amonijevog bikarbonata pa se uzorci inkubiraju 5 minuta u pećnici pri 60°C. Zatim se dodaje 5 µl 60 mM ditiotreitol (DTT) koji služi kao reducirajuće sredstvo. Potom se ploča inkubira 30 minuta na 60°C, a nakon hlađenja na sobnoj temperaturi uzorcima se dodaje 5 µl 160 mM jodoacetamida. Jodoacetamid djeluje kao alkilirajuće sredstvo te se nakon njegovog dodavanja uzorci ponovno inkubiraju, ovog puta u mraku uz miješanje na tresilici, 30 minuta. Zatim se dodaje 1 µl 200 mM DTT kako bi se ugasio višak jodoacetamida, a 2 µl 1 M amonijevog bikarbonata dodaje se kako bi se postavio odgovarajući pH za digestiju enzimima. Nakon toga ukupno 16 uzoraka podijeljeno je u 4 grupe po 4 uzorka (prikazano u Tablici 6). U prvu skupinu se prvo stavlja 4 µl PNGaze F i ostavlja se inkubirati preko noći na 37°C kako bi se oslobodili glikani. Idućeg dana se uzorcima dodaje 2 µl 0,4 µg/µl tripsina tretiranog TPCK (engl. *N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*) u 50 mM octene kiseline te tako započinje tripsinizacija preko noći na 37°C. U drugu skupinu uzoraka dodaje se na isti način tripsin i PNGaza F, ali obrnutim redoslijedom. U trećoj i četvrtoj skupini uzoraka umjesto PNGaze F se dodaje voda (to će biti kontrolni uzorci) - u trećoj skupini prije tripsinizacije, a u četvrtoj nakon

tripsinizacije. Nakon enzima, dodaje se 3 μl 1 M HCl u uzorke i 4 μl HCl u slijepe probe. Inkubiraju se na 37°C tijekom 45 minuta, kako bi se postigao pH $\approx$ 2 potreban za razgradnju surfaktanta RapiGest SF koji bi mogao ometati daljnju analizu.

Tablica 6. Raspored uzoraka

	SKUPINA 1	SKUPINA 2	SKUPINA 3	SKUPINA 4
Uzorak 1	PNGaza F + tripsin	tripsin + PNGaza F	H ₂ O + tripsin	tripsin + H ₂ O
Uzorak 2	PNGaza F + tripsin	tripsin + PNGaza F	H ₂ O + tripsin	tripsin + H ₂ O
Uzorak 3	PNGaza F + tripsin	tripsin + PNGaza F	H ₂ O + tripsin	tripsin + H ₂ O
Uzorak 4	PNGaza F + tripsin	tripsin + PNGaza F	H ₂ O + tripsin	tripsin + H ₂ O

3.4.3. C18-SPE obogaćivanje glikopeptida

Dobiveni glikopeptidi obogaćuju se pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi uz C18 čestice na polipropilenskoj filtarskoj ploči s 96 jažica. U svaku jažicu dodaje se 5 mg Chromabond C18 kuglica u 80% ACN + 0,1% TFA (50 mg/ml suspenzija), tj. 100 μL suspenzije. Otapalo se zatim uklanja korištenjem vakuumske pumpe ispod koje se nalaze filter pločice i pločica za otpad. Jažice se prethodno ispiru dva puta s 250 μl 80% ACN + 0,1 % TFA u vodi i uravnotežuju dvostrukim ispiranjem s 250 μl 0,1 % TFA u vodi. Uzorci se razrjeđuju s 450 μl 0,1% TFA u vodi, stavljaju u jažice i ispiru dva puta s 250 μl 0,1% TFA u vodi. Nakon toga ispod pumpe, umjesto pločice za otpad, stavlja se PCR pločica. Pročišćeni peptidi eluiraju se s 180 μl 80% ACN + 0,1% TFA u vodi, osuše u SpeedVac vakuumskom koncentratoru i pohrane na -20°C do analize.

3.4.4. LC-MS analiza

Peptidi su razdvojeni pomoću C18 kolone na instrumentu Acquity H-class tekućinske kromatografije vrlo visoke učinkovitosti (UPLC) koji se sastoji od kvaternarnog upravitelja otapala, upravitelja uzorka spregnutim sa Synapt G2-Si ESI-QTOF-MS sustavom. Instrument je bio pod kontrolom softvera MassLynx v.4.1.

0,1% TFA u vodi je korišten kao otapalo A, a 100% ACN + 0,1% TFA kao otapalo B. Metoda odvajanja koristila je linearni gradijent od 4-50% otapala B (vol/vol) pri brzini protoka od 0,4 ml/min u 60-minutnom analitičkom ciklusu. Uzorci su držani na 10°C prije ubrizgavanja, a temperatura odvajanja bila je 30°C. Volumen injekcije bio je 40 μl .

Uvjeti MS uređaja postavljeni su kako slijedi: pozitivni ionski mod, kapilarni napon 3 kV, napon konusa za uzorkovanje 30 V, temperatura izvora 120°C, temperatura desolvacije 350°C, protok plina desolvacije 800 l/h. Maseni spektri su snimljeni od 500 do 2500 m/z na frekvenciji od 1 Hz. Dobiveni kromatogrami i spektri su analizirani pomoću softvera MassLynx v.4.1.

4. Rezultati i rasprava

Cilj ovog diplomskog rada je odrediti stupanj glikozilacije proteina na 5 glikozilacijskih mjesta AGP-a. Kako bi se to moglo odrediti, potrebno je znati gdje se pojedino mjesto nalazi, tj. kojom sekvencom aminokiselina je određeno te izračunati masu peptida. U Tablici 7 prikazani su podaci pomoću kojih su analizirani kromatogrami i spektri dobiveni LC-MS metodom.

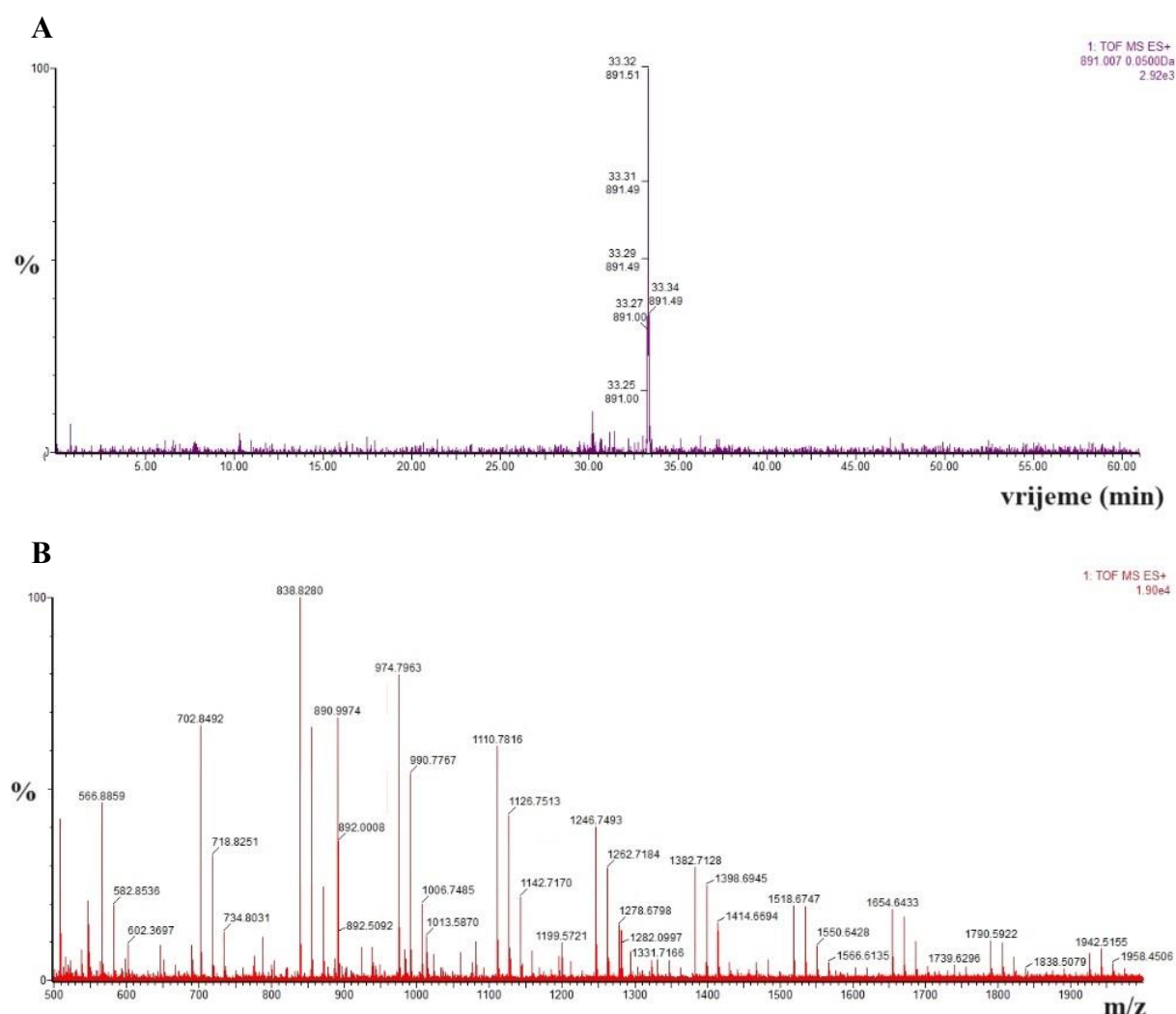
S obzirom na to da su korišteni uzorci dobiveni miješanjem krvne plazme dobivene od velikog broja ispitanika iz prijašnje populacijske studije, u njima su prisutne različite varijante gena AGP-a (označene s F1, F2, S i A), s mjestima glikozilacije označenim s obzirom na gen koji kodira određenu varijantu (*ORM1* odnosno AGP-A te *ORM2* odnosno AGP-B i AGP-B'). Za neke glikopeptide ne može se odrediti specifična varijanta jer imaju jednaku sekvencu na glikopeptidu dobivenom tripsinizacijom kao i neka druga pa su ta mjesta glikozilacije označena kao skup dvije moguće varijante (razdvojene s „/“).

Tablica 7. Oznake glikozilacijskih mjesta za određene AGP varijante, sekvence aminokiselina koje sadrži pojedino glikozilacijsko mjesto te masa njihovih peptidnih iona pri ESI ionizaciji, mase dvostruko nabijenih peptidnih iona ($m/2+1$), mase deamidiranih jednostruko nabijenih i dvostruko nabijenih peptidnih iona

Glikozila -cijsko mjesto	AGP varijanta	Sekvenca aminokiselina	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	Deamidirani [M+H] ⁺	Deamidirani [M+2H] ²⁺
Mjesto I	ORM1*F1/ ORM1*F2	LVPVPITNATLDQITGK	1780,021	890,515	1781,005	891,007
	ORM1*S/ ORM2*A	LVPVPITNATLDR	1408,816	704,912	1409,800	705,404
Mjesto II	ORM1/ORM2	NEEYNK	796,347	398,677	797,331	399,169
Mjesto III	ORM1/ORM2	SVQEIQATFFYFTPKNK	1919,954	960,481	1920,938	960,973
Mjesto IV	ORM1	QDQCIYNTTYLNVQR	1915,897	958,452	1916,881	958,944
Mjesto V	ORM1	ENGTISR	776,390	388,699	777,374	389,191
	ORM2	ENGTVSR	762,374	381,691	763,358	382,183

U Tablici 8 su prikazani intenziteti dobiveni analizom LC-MS kromatograma za glikozilacijsko mjesto broj I AGP varijante ORM1*F1/ORM1*F2. Intenziteti su dobiveni integracijom monoizotopnog vrška zbrojenog spektra za cjelokupni interval retencijskog vremena za svaku pojedinačnu masu – pripadajuće retencijsko vrijeme je određeno kromatogramom izdvojenog iona (engl. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) za svaku

pojedinačnu masu (primjer kromatograma i spektra prikazan je na Slici 5). Na isti način su određeni intenziteti i za ostala glikozilacijska mjesta.



Slika 5: A - Primjer EIC kromatograma za uzorak tripsin + PNGaza F₁ na glikozilacijskom mjestu I_{ORM1}*F1/ORM1*F2. Pik odgovara retencijskom vremenu iona deamidiranog peptida mase 891,007. B – Sirovi spektar za cjelokupni interval retencijskog vremena istog deamidiranog peptida.

Tablica 8. Intenziteti na mjestu broj I AGP varijante ORM1*F1/ORM1*F2

I _{ORM1}	GLIKOPEPTID	PEPTID [M+2H] ²⁺	DEAMIDIRANI PEPTID [M+2H] ²⁺
Masa (m/z)	1548,351*	890,515	891,007
H ₂ O + tripsin ₁	7477	12760	0
H ₂ O + tripsin ₂	3287	4655	0
H ₂ O + tripsin ₃	6380	6458	0
H ₂ O + tripsin ₄	11370	2236	0

PNGaza F + trypsin_1	0	0	43200
PNGaza F + trypsin_2	0	0	16780
PNGaza F + trypsin_3	0	0	18080
PNGaza F + trypsin_4	0	3652	33920
trypsin + H ₂ O_1	65220	7937	0
trypsin + H ₂ O_2	60530	4948	0
trypsin + H ₂ O_3	50140	3368	0
trypsin + H ₂ O_4	43140	2366	0
trypsin + PNGaza F_1	0	13260	1355000
trypsin + PNGaza F_2	0	3956	1203000
trypsin + PNGaza F_3	0	3042	1118000
trypsin + PNGaza F_4	0	2318	838800

* Masa $[M+3H]^{3+}$ glikopeptida s jednim od najzastupljenijih glikana na tom glikozilacijskom mjestu - N5H6S3 (oznake u formuli glikana predstavljaju monosaharide od kojih se sastoji: N – N-acetilglukozamin, H – heksoza (manoza i galaktoza), S – sijalinska kiselina)

Kod analize glikozilacijskog mjesta broj I AGP varijante ORM1*F1/ORM1*F2 u svim kontrolnim uzorcima (negativnim kontrolama) pronađeni su glikopeptidi što je očekivano jer nije dodana PNGaza koja bi cijepala glikane. Također vide se i nedeamidirani peptidi što znači da postoje proteini koji nisu glikozilirani. Nije uočena spontana deamidacija pripadajućeg peptida. U uzorcima kojima je dodana PNGaza prije dodatka tripsina, došlo je do cijepanja glikana te se više ne vidi vršak glikoproteina. Također nisu uočeni ni nedeamidirani proteini, osim u četvrtom uzorku. Pretpostavka je da proteini nedeamidirani u toj peptidnoj sekvenci postoje, ali je premali intenzitet da bi se mogli uočiti. Uočeni su deamidirani peptidi koji su nastali deamidacijom deglikoziliranih proteina. U uzorcima u kojima se prvo odvila tripsinizacija, a potom cijepanje glikana PNGazom jasno se vidi cijepanje glikana, jer se glikoproteini ne mogu uočiti. Vide se i nedeamidirani i deamidirani peptidi. Intenziteti nedeamidiranih peptida u kontroli i ispitivanom uzorku su vrlo slični što ukazuje da su to uistinu neglikozilirani peptidi. Postotak deamidiranih peptida može biti viši zbog spontane deamidacije asparagina pri pripremi uzorka.

Postotak neglikoziliranih peptida izračunat je prema Jednadžbi 1. Postotak glikoziliranih proteina potom se izračuna iz Jednadžbe 2.

Jednadžba 1:

$$\text{NEGLIKOZILIRANI PEPTIDI} = \frac{\text{NEDEAMIDIRANA NEGATIVNA KONTROLA} + \text{DEAMIDIRANA NEGATIVNA KONTROLA}}{\text{NEDEAMIDIRAN DEGLIKOZILIRAN PEPTID} + \text{DEAMIDIRAN DEGLIKOZILIRAN PEPTID}}$$

Jednadžba 2:

$$\text{GLIKOZILIRANI PEPTIDI (\%)} = (1 - \text{NEGLIKOZILIRANI PEPTIDI}) \times 100$$

Pomoću tih jednadžbi dobiju se dva rezultata prikazana u Tablici 9.

*Tablica 9. Postotak glikoziliranih peptida na mjestu I_ORM1*F1/ORM1*F2*

UZORAK	GLIKOZILIRANI PEPTIDI (%)
PNGaza + tripsin	75,263
tripsin + PNGaza	99,607

S obzirom na to da je kod uzoraka u kojima se prvo dodaje PNGaza, a potom tripsin, manji apsolutni intenzitet vršaka peptida, možemo zaključiti da je rezultat dobiven analizom uzoraka u kojima se prvo dogodila tripsinizacija pa onda dodana PNGaza realniji. AGP je protein kompleksne strukture i zbog toga je moguće da PNGaza ne može lako doći do svih glikozilacijskih mjesta gdje treba cijepati glikane. Nakon tripsinizacije, u kojoj dolazi do cijepanja aminokiselina u peptidu, PNGaza ima bolji pristup glikanima. Stoga možemo zaključiti da je mjesto I_ORM1*F1/ORM1*F2 gotovo potpuno glikozilirano, ali ipak ne u cijelosti.

Intenziteti na glikozilacijskom mjestu broj 1 AGP varijante ORM1*S/ORM2*A prikazani su u Tablici 10.

*Tablica 10. Intenziteti na mjestu I AGP varijante ORM1*S/ORM2*A*

I_ORM1ORM2	GLIKOPEPTID	PEPTID [M+2H] ²⁺	DEAMIDIRANI PEPTID [M+2H] ²⁺
Masa (m/z)	1424,616*	704,912	705,404
H ₂ O + tripsin_1	6406	0	0
H ₂ O + tripsin_2	2540	0	0
H ₂ O + tripsin_3	6034	0	0
H ₂ O + tripsin_4	14830	0	0
PNGaza F + tripsin_1	0	0	38970
PNGaza F + tripsin_2	0	0	13610
PNGaza F + tripsin_3	0	0	11450
PNGaza F + tripsin_4	0	0	29340
tripsin + H ₂ O_1	96540	0	0
tripsin + H ₂ O_2	85630	0	0
tripsin + H ₂ O_3	71440	0	0
tripsin + H ₂ O_4	58910	0	0
tripsin + PNGaza F_1	0	0	2976000

trypsin + PNGaza F_2	0	0	2743000
trypsin + PNGaza F_3	0	0	2761000
trypsin + PNGaza F_4	0	0	2185000

* Masa $[M+3H]^{3+}$ glikopeptida s jednim od najzastupljenijih glikana na tom glikozilacijskom mjestu - N5H6S3 (oznake u formuli glikana predstavljaju monosaharide od kojih se sastoji: N – N-acetilglukozamin, H – heksoza (manoza i galaktoza), S – sijalinska kiselina)

Ovdje se u kontrolnim uzorcima vidi samo glikoprotein što ukazuje na to da ne postoje slobodni peptidi, tj. glikozilacijsko mjesto je u potpunosti glikozilirano. U uzorcima s PNGazom vide se samo deamidirani proteini koji su nastali deamidacijom deglikoziliranih proteina. Ovo je potvrda da je glikozilacijsko mjesto 100%-tno glikozilirano.

Glikozilacijsko mjesto broj dva prikazano je u Tablici 11.

Tablica 11. Intenziteti na mjestu II AGP varijante ORM1/ORM2

II ORM1ORM2	GLIKOPEPTID	PEPTID $[M+H]^+$	DEAMIDIRANI PEPTID $[M+H]^+$
Masa (m/z)	1001,717*	796,347	797,331
H ₂ O + trypsin_1	22360	0	0
H ₂ O + trypsin_2	8796	0	0
H ₂ O + trypsin_3	22560	0	0
H ₂ O + trypsin_4	47660	0	0
PNGaza F + trypsin_1	23820	0	2238
PNGaza F + trypsin_2	8782	0	0
PNGaza F + trypsin_3	8969	0	0
PNGaza F + trypsin_4	10740	0	0
trypsin + H ₂ O_1	75710	4769	0
trypsin + H ₂ O_2	93620	12900	0
trypsin + H ₂ O_3	81420	8837	0
trypsin + H ₂ O_4	68420	7247	0
trypsin + PNGaza F_1	0	7511	419000
trypsin + PNGaza F_2	10730	5753	312500
trypsin + PNGaza F_3	40670	7889	309800
trypsin + PNGaza F_4	24300	6968	277200

* Masa $[M+3H]^{3+}$ glikopeptida s jednim od najzastupljenijih glikana na tom glikozilacijskom mjestu - N4H5S2 (oznake u formuli glikana predstavljaju monosaharide od kojih se sastoji: N – N-acetilglukozamin, H – heksoza (manoza i galaktoza), S – sijalinska kiselina)

U ovim uzorcima svugdje se vide glikopeptidi. To znači da nigdje nije došlo do cijepanja glikana, ni kod dodatka PNGaza. S obzirom na to da se kod kontrolnih uzoraka, gdje je prvo došlo do tripsinizacije, vide nedeamidirani proteini, možemo zaključiti da postoje slobodni,

neglikozilirani proteini te da ovo mjesto nije u potpunosti glikozilirano. Ali pošto nije došlo do cijepanja glikana ne postoji mogućnost računanja stupnja glikozilacije.

Intenziteti na glikozilacijskom mjestu broj tri prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Intenziteti na mjestu III AGP varijante ORM1/ORM2

III_ORM1ORM2	GLIKOPEPTID	PEPTID [M+2H] ²⁺	DEAMIDIRANI PEPTID [M+2H] ²⁺
Masa (m/z)	1716,706*	960,481	960,973
H ₂ O + trypsin_1	0	0	9298
H ₂ O + trypsin_2	0	0	3839
H ₂ O + trypsin_3	0	0	7475
H ₂ O + trypsin_4	0	0	5301
PNGaza F + trypsin_1	0	0	3188
PNGaza F + trypsin_2	0	0	0
PNGaza F + trypsin_3	0	0	0
PNGaza F + trypsin_4	0	0	3527
trypsin + H ₂ O_1	3409	0	0
trypsin + H ₂ O_2	13430	0	0
trypsin + H ₂ O_3	12100	0	0
trypsin + H ₂ O_4	8895	0	0
trypsin + PNGaza F_1	8287	4526	4497
trypsin + PNGaza F_2	7900	3380	4465
trypsin + PNGaza F_3	12050	5582	7384
trypsin + PNGaza F_4	5774	3757	3329

* Masa [M+3H]³⁺ glikopeptida s jednim od najzastupljenijih glikana na tom glikozilacijskom mjestu - N6H7S3 (oznake u formuli glikana predstavljaju monosaharide od kojih se sastoji: N – N-acetilglukozamin, H – heksoza (manoza i galaktoza), S – sijalinska kiselina)

U uzorcima u kojima se tripsinizacija dogodila nakon dodatka PNGaze/vode, premali je intenzitet da bi se išta moglo zaključiti. Ne vide se glikoproteini u kontrolnim uzorcima, jedino se vide deamidirani proteini. U trećoj i četvrtoj skupini uzoraka, iako se vide glikopeptidi i u uzorcima kojima je dodana PNGaza, može se pretpostaviti da je ovo mjesto u potpunosti glikozilirano jer se u kontrolnim uzorcima ne vide nikakvi peptidi, a nakon cijepanja glikana se vide.

Glikozilacijsko mjesto broj četiri prikazano je u Tablici 13.

Tablica 13. Intenziteti na mjestu IV AGP varijante ORM1

IV_ORM1	GLIKOPEPTID	PEPTID [M+2H] ²⁺	DEAMIDIRANI PEPTID [M+2H] ²⁺
Masa (m/z)	1593,643*	958,452	958,944

H ₂ O + trypsin_1	18240	0	0
H ₂ O + trypsin_2	15010	0	0
H ₂ O + trypsin_3	13830	0	0
H ₂ O + trypsin_4	18260	0	0
PNGaza F + trypsin_1	0	0	172500
PNGaza F + trypsin_2	0	0	197500
PNGaza F + trypsin_3	0	0	202100
PNGaza F + trypsin_4	0	0	243700
trypsin + H ₂ O_1	24430	0	0
trypsin + H ₂ O_2	26670	0	0
trypsin + H ₂ O_3	14330	0	0
trypsin + H ₂ O_4	13490	0	0
trypsin + PNGaza F_1	0	0	308600
trypsin + PNGaza F_2	0	0	387600
trypsin + PNGaza F_3	0	0	560000
trypsin + PNGaza F_4	0	0	325400

* Masa $[M+3H]^{3+}$ glikopeptida s jednim od najzastupljenijih glikana na tom glikozilacijskom mjestu - N5H6S3 (oznake u formuli glikana predstavljaju monosaharide od kojih se sastoji: N – N-acetilglukozamin, H – heksoza (manoza i galaktoza), S – sijalinska kiselina)

Na mjestu IV može se zaključiti da su svi proteini u potpunosti glikozilirani. Nakon dodatka PNGaze u obje skupine došlo je do cijepanja glikana te su nakon deglikozilacije uočeni samo deamidirani peptidi.

Intenzitetu na glikozilacijskom mjestu broj pet AGP varijanti ORM1 i ORM2 prikazani su u Tablicama 14 i 15.

Tablica 14. Intenziteti na mjestu V kodiranom AGP varijante ORM1

V_ORM1	GLIKOPEPTID	PEPTID $[M+H]^+$	DEAMIDIRANI PEPTID $[M+H]^+$
Masa (m/z)	1432,550*	776,390	777,374
H ₂ O + trypsin_1	16810	0	0
H ₂ O + trypsin_2	19470	0	0
H ₂ O + trypsin_3	13940	0	0
H ₂ O + trypsin_4	22710	0	0
PNGaza F + trypsin_1	15970	0	49560
PNGaza F + trypsin_2	21900	0	26820
PNGaza F + trypsin_3	14300	0	35890
PNGaza F + trypsin_4	10130	0	65420
trypsin + H ₂ O_1	19740	0	0
trypsin + H ₂ O_2	24410	0	0
trypsin + H ₂ O_3	17650	0	0
trypsin + H ₂ O_4	17880	0	0

trypsin + PNGaza F_1	0	0	547500
trypsin + PNGaza F_2	0	0	440900
trypsin + PNGaza F_3	0	0	603600
trypsin + PNGaza F_4	0	0	483000

* Masa $[M+3H]^{3+}$ glikopeptida s jednim od najzastupljenijih glikana na tom glikozilacijskom mjestu - N6H7S4 (oznake u formuli glikana predstavljaju monosaharide od kojih se sastoji: N – N-acetilglukozamin, H – heksoza (manoza i galaktoza), S – sijalinska kiselina)

Tablica 15. Intenziteti na mjestu V AGP varijante ORM2

V_ORM2	GLIKOPEPTID	PEPTID $[M+H]^+$	DEAMIDIRANI PEPTID $[M+H]^+$
Masa (m/z)	1476,564*	762,374	763,358
H ₂ O + trypsin_1	2731	0	0
H ₂ O + trypsin_2	3090	0	0
H ₂ O + trypsin_3	2710	0	0
H ₂ O + trypsin_4	5548	0	0
PNGaza F + trypsin_1	4380	0	11440
PNGaza F + trypsin_2	5605	0	7271
PNGaza F + trypsin_3	3690	0	6646
PNGaza F + trypsin_4	2319	0	12500
trypsin + H ₂ O_1	5450	0	0
trypsin + H ₂ O_2	5898	0	0
trypsin + H ₂ O_3	5118	0	0
trypsin + H ₂ O_4	4654	0	0
trypsin + PNGaza F_1	0	0	125600
trypsin + PNGaza F_2	0	0	85420
trypsin + PNGaza F_3	0	0	121000
trypsin + PNGaza F_4	0	0	76310

* Masa $[M+3H]^{3+}$ glikopeptida s jednim od najzastupljenijih glikana na tom glikozilacijskom mjestu - N6H7S4F1 (oznake u formuli glikana predstavljaju monosaharide od kojih se sastoji: N – N-acetilglukozamin, H – heksoza (manoza i galaktoza), S – sijalinska kiselina, F – fukoza)

Na mjestu V AGP varijante ORM1 i ORM2 u skupini u kojoj je dodana PNGaza prije tripsinizacije nije došlo do potpunog cijepanja glikana, ali se vide samo deamidirani proteini te možemo zaključiti da je to mjesto u potpunosti glikozilirano. U skupini u kojoj je prvo provedena tripsinizacija došlo je do potpunog cijepanja glikana te se jasno vide intenziteti deamidiranih proteina što nam potvrđuje da je ovo mjesto 100%-tno glikozilirano.

5. Zaključak

Cilj ovog rada bio je ispitati stupanj glikoziliranosti pojedinih glikozilacijskih mjesta AGP-a. Korištenom metodom pomoću enzima PNGaze i tripsina te analize LC-ESI-MS-om po prvi puta je uspješno određen stupanj glikozilacije za većinu glikozilacijskih mjesta AGP-a. Mjesta I_ORM1*S/ORM2*A, IV_ORM1, V_ORM1 i V_ORM2 u potpunosti su glikozilirana. I_ORM1*F1/ORM1*F2 nije u potpunosti, nego otprilike 99%. II_ORM1/ORM2 nije u potpunosti, ali ne može se zaključiti u kojem je stupnju jer dobiveni intenziteti su premali za točan izračun. Mjesto broj III_ORM1/ORM2 nije dalo nikakve rezultate jer su intenziteti vršaka peptida u masenim spektrima bili premali. U budućim radovima mogao bi se ispitati stupanj glikozilacije kod bolesnika oboljelih od šećerne bolesti tipa 2, raka i drugih bolesti za kojih se pretpostavlja da bi se glikozilacija AGP-a mogla koristiti kao biomarker. Promjena u stupnju glikozilacije potencijalno može biti dijagnostički alat za ove bolesti.

6. Popis kratica, oznaka i simbola

ACN = acetonitril

AGP = alfa-1-kiseli glikoprotein (engl. *alpha-1-acid glycoprotein*)

AK = aminokiselina

APP = protein akutne faze (engl. *acute-phase protein*)

Asn = asparagin

CRP = C-reaktivni protein

Dol-P = dolikol-fosfat (engl. *dolichol-phosphate*)

DTT = ditiotrietol

EIC = kromatogram izdvojenog iona (engl. *extracted ion chromatogram*)

ER = endoplazmatski retikulum

ESI = elektrosprejna ionizacija

Fuc = fukoza (engl. *fucose*)

GA = Golgijev aparat

Gal = galaktoza

GalNAc = N-acetilgalaktozamin

GALNT = GalNAc transferaza

GBP = proteini koji vežu glikane (engl. *glycan-binding proteins*)

Glc = glukoza (engl. *glucose*)

GlcA = glukuronska kiselina (engl. *glucuronic acid*)

GlcNAc = N-acetilglukozamin (engl. *N-acetylglucosamine*)

GPI = glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)

HCC = hepatocelularni karcinom (engl. *hepatocellular carcinoma*)

HCl = klorovodična kiselina (engl. *hydrochloric acid*)

HILIC-MS/MS = tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama - tandemna spektrometrija masa (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography - tandem mass spectrometry*)

HNF1A-MODY = dijabetes zrele dobi kod mladih uzrokovan varijantama HNF1A (engl. *maturity-onset diabetes of the young caused by HNF1A variants*)

HPLC = tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

IdA = iduronska kiselina (engl. *iduronic acid*)

IgA1 = imunoglobulin A1

IL-1 β = interleukin-1 β

iTRAQ = izobarne oznake za apsolutnu i relativnu kvantifikaciju (engl. *isobaric tags for absolute and relative quantification*)

LC = tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

LC-MS = tekućinska kromatografija - masena spektrometrija (engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*)

Man = manaza

MS = masena spektrometrija

NaOH = natrijev hidroksid

NH₄HCO₃ = amonijev bikarbonat

ORM = orosomukoid

PK/PD= farmakokinetika/farmakodinamika (engl. *pharmacokinetics/pharmacodynamics*)

PNGaza F = peptid-N-glikozidaza F

Pro = prolin

PTM = posttranslacijske modifikacije

Q-TOF-MS = maseni spektrometar s hibridom kvadrupola i analizatora koji mjeri vrijeme leta (engl. *quadrupole time-of-flight mass spectrometer*)

RA = retinska kiselina (engl. *retinoic acid*)

RNA = ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

Ser = serin

SiA = sijalinska kiselina (engl. *sialic acid*)

SILAC = označavanje stabilnog izotopa aminokiselinama u staničnoj kulturi (engl. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)

sLeX = sijalil LewisovX epitop

TFA = trifluorooctena kiselina (engl. *trifluoroacetic acid*)

Thr = treonin (engl. *threonine*)

TMT = oznaka tandemskim masenim tagom (engl. *tandem mass tags*)

TNF- α = faktor nekroze tumora-alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

TOF = vrijeme leta (engl. *time-of-flight*)

TPCK = N-tosil-L-fenilalanin klorometil keton (engl. *N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*)

UPLC = tekućinska kromatografija vrlo visoke učinkovitosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*)

Xyl = ksiloza (engl. *xylose*)

7. Literatura

Allen D, McWhinney B. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications, 2019, 40(3), 135-146.

Boyle CA, Coatney RW, Wickham A, Mukherjee SK, Meunier LD. Alpha-1 Acid Glycoprotein as a Biomarker for Subclinical Illness and Altered Drug Binding in Rats. *Comparative Medicine*, 2021, 71(2), 123-132.

Bteich M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon*, 2019, 5(11), e02879.

Choi JW, Jeong KH, You JW, Lee JW, Moon BI, Kim HJ, Kim HJ. Serum Levels and Glycosylation Changes of Alpha-1-Acid Glycoprotein According to Severity of Breast Cancer in Korean Women. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(9), 1297-1304.

Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Fluminensis*, 2009, 45, 218–232.

Cohen M, Varki A. Modulation of Glycan Recognition by Clustered Saccharide Patches. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2014, 75-125.

Costa J, Hayes C, Lisacek F. Protein glycosylation and glycoinformatics for novel biomarker discovery in neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, 2023, 89, 101991.

Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL, Regnier FE, Gibson BW, Fisher SJ. Sweetening the Pot: Adding Glycosylation to the Biomarker Discovery Equation. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(2), 223-236.

Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, 1482(1-2), 157-171.

Gagneux P, Hennot T, Varki A. Biological Functions of Glycans. U: *Essentials of Glycobiology* (4th edition) [Internet]. Varki A, Cummings RD, Esko JD, i sur., urednici, Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.

Gannon BM, Glesby MJ, Finkelstein JL, Raj T, Erickson D, Mehta S. A point-of-care assay for alpha-1-acid glycoprotein as a diagnostic tool for rapid, mobile-based determination of inflammation. *Current Research in Biotechnology*, 2019, 1, 41-48.

Garg E, Zubair M. Mass Spectrometer. U: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2024. Zadnji put ažurirano: 21.1.2023. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589702/>, pristupljeno 17.5.2024.

Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2005, 1725(1), 128-135.

Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2003, 24(1), 3-12.

Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: principles and applications*, Chichester, John Wiley and Sons, 2007, 4-126.

Hou X, Wang Y, Bu D, Wang Y, Sun S. EMNGly: predicting N-linked glycosylation sites using the language models for feature extraction. *Bioinformatics*, 2023, 39(11).

Hu M, Lan Y, Lu A, Ma X, Zhang L. Glycan-based biomarkers for diagnosis of cancers and other diseases: Past, present, and future. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2019, 162, 1-24.

Keser T, Tijardović M, Gornik I, Lukić E, Lauc G, Gornik O, Novokmet M. High-Throughput and Site-Specific N-Glycosylation Analysis of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein Offers a Great Potential for New Biomarker Discovery. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, 20, 100044.

Li Q, Kailemia MJ, Merleev AA, Xu G, Serie D, Danan LM, Haj FG, Maverakis E, Lebrilla CB. Site-Specific Glycosylation Quantitation of 50 Serum Glycoproteins Enhanced by Predictive Glycopeptidomics for Improved Disease Biomarker Discovery. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(8), 5433-5445.

Liang J, Zhu J, Wang M, Singal AG, Odewole M, Kagan S, Renteria V, Liu S, Parikh ND, Lubman DM. Evaluation of AGP Fucosylation as a Marker for Hepatocellular Carcinoma of Three Different Etiologies. *Scientific Reports*, 2019, 9(1).

Pandey VK, Sharma R, Prajapati GK, Mohanta TK, Mishra AK. N-glycosylation, a leading role in viral infection and immunity development. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(8), 8109-8120.

Paton B, Suarez M, Herrero P, Canela N. Glycosylation Biomarkers Associated with Age-Related Diseases and Current Methods for Glycan Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11), 5788.

Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2009, 30(1), 19-34.

Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(6), 346-366.

Ruiz M. Into the Labyrinth of the Lipocalin α 1-Acid Glycoprotein. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12.

Rusli H, Putri RM, Alni A. Recent Developments of Liquid Chromatography Stationary Phases for Compound Separation: From Proteins to Small Organic Compounds. *Molecules*, 2022, 27(3), 907.

Schoberer J, Shin YJ, Vavra U, Veit C, Strasser R. Analysis of Protein Glycosylation in the ER. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1691, 205-222.

Sharma S, Shekhar S, Sharma B, Jain P. Decoding glycans: deciphering the sugary secrets to be coherent on the implication. *RSC Advances*, 2020, 10(56), 34099-34113.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Stanley RC. *Foundamentals of analytical chemistry* 9th edition. Belmont; Brooks/Cole, 2014, 802-814.

Smith BAH, Bertozzi CR. The clinical impact of glycobiology: targeting selectins, Siglecs and mammalian glycans. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3), 217-243.

Smith KD, Behan J, Matthews-Smith G, Magliocco AM. Alpha-1-Acid Glycoprotein (AGP) as a Potential Biomarker for Breast Cancer. *InTech eBooks*, 2012.

Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002, 12(4), 43R-56R.

Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. U: *Essentials of Glycobiology* (4th edition) [Internet]. Varki A, Cummings RD, Esko JD, i sur., urednici, Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.

Sumanth MS, Jacob SP, Abhilasha KV, Manne BK, Basrur V, Lehoux S, Campbell RA, Yost CC, McIntyre TM, Cummings RD, Weyrich AS, Rondina MT, Marathe GK. Different

glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein contribute to its functional alterations in platelets and neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 109(5), 915-930.

Taguchi K, Nishi K, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Molecular aspects of human alpha-1 acid glycoprotein – structure and function, U: *Acute phase proteins*, urednici, Janciauskiene S, London, IntechOpen, 2013, poglavlje 6.

Thompson N, Wakarchuk W. O-glycosylation and its role in therapeutic proteins. *Bioscience Reports*, 2022, 42(10).

Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, Petrović T, Deriš H, Wuhrer M, Lauc G. High-Throughput Glycomic Methods. *Chemical Reviews*, 2022, 122(20), 15865-15913.

Virág D, Kremmer T, Lőrincz K, Kiss N, Jobbágy A, Bozsányi S, Gulyás L, Wikonkál N, Schlosser G, Borbély A, Huba Z, Kiss BD, Antal I, Ludányi K. Altered Glycosylation of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein as a Biomarker for Malignant Melanoma. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 2021, 26(19), 6003.

Wu D, Struwe WB, Harvey DJ, Ferguson M a. J, Robinson CV. N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(35), 8763-8768.

Yamamoto N. Analytical methods. *Fundamentals of Bioaerosols Science*, Published online 2023, 295-358.

Yazawa S, Takahashi R, Yokobori T, Sano R, Mogi A, Saniabadi AR, Kuwano H, Asao T. Fucosylated Glycans in α 1-Acid Glycoprotein for Monitoring Treatment Outcomes and Prognosis of Cancer Patients. *PloS One*, 2016, 11(6), e0156277.

Zachara NE, Akimoto Y, Boyce M, Hart GW. The O-GlcNAc Modification. U: *Essentials of Glycobiology* (4th edition) [Internet]. Varki A, Cummings RD, Esko JD, i sur., urednici, Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.

Zhang S, Li W, Lu H, Liu Y. Quantification of N-glycosylation site occupancy status based on labeling/label-free strategies with LC-MS/MS. *Talanta*, 2017, 170, 509-513.

Zhu Z, Go EP, Desaire H. Absolute Quantitation of Glycosylation Site Occupancy Using Isotopically Labeled Standards and LC-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2014, 25(6), 1012-1017.

8. Sažetak/summary

SAŽETAK

Alfa-1-kiseli glikoprotein (AGP) je jedan od glavnih proteina akutne faze koji se ističe svojom izrazitom glikoziliranošću. Sadrži pet glikozilacijskih mjesta na kojima su povezani strukturno raznoliki N-glikani kompleksnog tipa. Biološka uloga mu nije u potpunosti poznata, ali uključuje različite protuupalne i imunomodulatorne učinke te prijenos raznolikog niza endogenih i egzogenih liganada. Koncentracija AGP se mijenja u različitim akutnim i kroničnim stanjima, a promjene u glikoformama AGP-a, uključujući varijacije u njihovim antenskim strukturama, razinama α 1,3-fukozilacije ili obrascima sijalinizacije, opažene su u različitim patološkim i fiziološkim stanjima (npr. diabetes mellitus tipa II i rak).

Poznato je da u različitim bolestima dolazi do promjene u obrascima glikozilacije AGP-a te se postavlja pitanje dolazi li do promjene i u zauzetosti glikozilacijskih mjesta proteina. U ovom radu po prvi puta se ispituje stupanj glikozilacije AGP-a. AGP je obogaćen taloženjem "seromukoidne" frakcije iz uzoraka ljudske plazme, nakon čega je uslijedila redukcija i alkilacija. Zauzetost glikozilacije određena je uporabom PNGaze F, koja uklanja glikane s proteina pri čemu se glikozilirani asparagin pretvara u asparaginsku kiselinu. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: PNGaza F dodana prije tripsinizacije, PNGaza F dodana nakon tripsinizacije, voda dodana prije tripsinizacije (kontrola) i voda dodana nakon tripsinizacije (kontrola). Nakon dodatka enzima ili vode, glikopeptidi su obogaćeni ekstrakcijom čvrste faze i analizirani kromatografijom reverzne faze spregnutom s qTOF masenim spektrometrom. Postotak neglikoziliranih peptida dobio se iz omjera zbroja nedeamidiranih i deamidiranih peptida kontrole te zbroja nedeamidiranih i deamidiranih peptida uzorka s dodanom PNGazom F.

Dokazana je potpuna glikozilacija triju mjesta (I_ORM1*S/ORM2*A, IV_ORM1, V_ORM1 i V_ORM2), djelomična, ali visoka glikoziliranost I_ORM1*F1/ORM1*F i II_ORM1/ORM2, a za mjesto III_ORM1/ORM2 nije bilo moguće odrediti zbog premalog intenziteta. Ove spoznaje mogu poslužiti za daljnju usporedbu sa stupnjem glikozilacije kod osoba oboljelih od različitih bolesti te bi onda stupanj glikozilacije potencijalno mogao biti dijagnostički alat tih bolesti.

SUMMARY

Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) is one of the main acute-phase proteins, which is extremely glycosylated. It contains five glycosylation sites with structurally diverse N-linked complex glycans. Its biological role is not fully known, but it includes various anti-inflammatory and immunomodulatory effects, plus the transfer of a diverse range of endogenous and exogenous ligands. AGP concentration changes in various acute and chronic conditions, and changes in AGP glycoforms, including variations in their antenna structures, levels of α 1,3-fucosylation or sialinization patterns, have been observed in various pathological and physiological conditions (e.g. diabetes mellitus type II and cancer).

It is known that in various diseases there is a change in the glycosylation patterns of AGP, and the question arises whether there is also a change in the occupancy of glycosylation sites of the protein. In this paper, AGP glycosylation site occupancy is examined for the first time. AGP was enriched by precipitation of the "seromucoid" fraction from human plasma samples, followed by reduction and alkylation. Glycosylation occupancy was determined using PNGase F, which removes glycans from proteins, converting glycosylated asparagine to aspartic acid. The samples were divided into four groups: PNGase F added before trypsinization, PNGase F added after trypsinization, water added before trypsinization (control group), and water added after trypsinization (control group). After addition of enzymes or water, glycopeptides were enriched by solid phase extraction and analyzed by reverse phase chromatography coupled to a qTOF mass spectrometer. The percentage of non-glycosylated peptides was obtained from the ratio of the sum of non-deamidated and deamidated control peptides and the sum of non-deamidated and deamidated peptides of the sample with added PNGase F.

Complete glycosylation of three sites (I_ORM1*S/ORM2*A, IV_ORM1, V_ORM1 and V_ORM2), partial glycosylation of I_ORM1*F1/ORM1*F and II_ORM1/ORM2 was demonstrated, and site III_ORM1/ORM2 gave no results. These findings can be used for further comparison with the glycosylation site occupancy in people suffering from various diseases, and then AGP glycosylation site occupancy could potentially be a diagnostic tool for these diseases.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ODREĐIVANJE STUPNJA GLIKOZILACIJE ALFA-1-KISELOG GLIKOPROTEINA NA PET GLIKOZILACIJSKIH MJESTA KORIŠTENJEM LC-MS METODE

Ema Rajković

SAŽETAK

Alfa-1-kiseli glikoprotein (AGP) je jedan od glavnih proteina akutne faze koji se ističe svojom izrazitom glikoziliranosti. Sadrži pet glikozilacijskih mjesta na kojima su povezani strukturno raznoliki N-glikani kompleksnog tipa. Biološka uloga mu nije u potpunosti poznata, ali uključuje različite protuupalne i imunomodulatorne učinke te prijenos raznolikog niza endogenih i egzogenih liganada. Koncentracija AGP se mijenja u različitim akutnim i kroničnim stanjima, a promjene u glikoformama AGP-a, uključujući varijacije u njihovim antenskim strukturama, razinama α 1,3-fukozilacije ili obrascima sijalinizacije, opažene su u različitim patološkim i fiziološkim stanjima (npr. diabetes mellitus tipa II i rak).

Poznato je da u različitim bolestima dolazi do promjene u obrascima glikozilacije AGP-a te se postavlja pitanje dolazi li do promjene i u zauzetosti glikozilacijskih mjesta proteina. U ovom radu po prvi puta se ispituje stupanj glikozilacije AGP-a. AGP je obogaćen taloženjem "seromukoidne" frakcije iz uzoraka ljudske plazme, nakon čega je uslijedila redukcija i alkilacija. Zauzetost glikozilacije određena je uporabom PNGase F, koja uklanja glikane s proteina pri čemu se glikozilirani asparagin pretvara u asparaginsku kiselinu. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine: PNGase F dodana prije tripsinizacije, PNGase F dodana nakon tripsinizacije, voda dodana prije tripsinizacije (kontrola) i voda dodana nakon tripsinizacije (kontrola). Nakon dodatka enzima ili vode, glikopeptidi su obogaćeni ekstrakcijom čvrste faze i analizirani kromatografijom reverzne faze spregnutom s qTOF masenim spektrometrom. Postotak neglikoziliranih peptida dobio se iz omjera zbroja nedeamidiranih i deamidiranih peptida kontrole te zbroja nedeamidiranih i deamidiranih peptida uzorka s dodanom PNGazom F.

Dokazana je potpuna glikozilacija triju mjesta (I_ORM1*S/ORM2*A, IV_ORM1, V_ORM1 i V_ORM2), djelomična, ali visoka glikoziliranost I_ORM1*F1/ORM1*F i II_ORM1/ORM2, a za mjesto III_ORM1/ORM2 nije bilo moguće odrediti zbog premalog intenziteta. Ove spoznaje mogu poslužiti za daljnju usporedbu sa stupnjem glikozilacije kod osoba oboljelih od različitih bolesti te bi onda stupanj glikozilacije potencijalno mogao biti dijagnostički alat tih bolesti.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 5 grafičkih prikaza, 15 tablica i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: alfa-1-kiseli glikoprotein, glikozilacija, LC-MS

Mentor: **Dr. sc. Toma Keser**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Branimir Plavša, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

AGP GLYCOSYLATION SITE OCCUPANCY ASSESSMENT AT FIVE GLYCOSYLATION SITES USING THE LC-MS METHOD

Ema Rajković

SUMMARY

Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) is one of the main acute-phase proteins, which is extremely glycosylated. It contains five glycosylation sites with structurally diverse N-linked complex glycans. Its biological role is not fully known, but it includes various anti-inflammatory and immunomodulatory effects, plus the transfer of a diverse range of endogenous and exogenous ligands. AGP concentration changes in various acute and chronic conditions, and changes in AGP glycoforms, including variations in their antenna structures, levels of α 1,3-fucosylation or sialinization patterns, have been observed in various pathological and physiological conditions (e.g. diabetes mellitus type II and cancer).

It is known that in various diseases there is a change in the glycosylation patterns of AGP, and the question arises whether there is also a change in the occupancy of glycosylation sites of the protein. In this paper, AGP glycosylation site occupancy is examined for the first time. AGP was enriched by precipitation of the "seromuroid" fraction from human plasma samples, followed by reduction and alkylation. Glycosylation occupancy was determined using PNGase F, which removes glycans from proteins, converting glycosylated asparagine to aspartic acid. The samples were divided into four groups: PNGase F added before trypsinization, PNGase F added after trypsinization, water added before trypsinization (control group), and water added after trypsinization (control group). After addition of enzymes or water, glycopeptides were enriched by solid phase extraction and analyzed by reverse phase chromatography coupled to a qTOF mass spectrometer. The percentage of non-glycosylated peptides was obtained from the ratio of the sum of non-deamidated and deamidated control peptides and the sum of non-deamidated and deamidated peptides of the sample with added PNGase F.

Complete glycosylation of three sites (I ORM1*S/ORM2*A, IV ORM1, V ORM1 and V ORM2), partial glycosylation of I ORM1*F1/ORM1*F and II ORM1/ORM2 was demonstrated, and site III ORM1/ORM2 gave no results. These findings can be used for further comparison with the glycosylation site occupancy in people suffering from various diseases, and then AGP glycosylation site occupancy could potentially be a diagnostic tool for these diseases.

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

Thesis includes: 45 pages, 5 figures, 15 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: alpha-1-acid glycoprotein, glycosylation, LC-MS

Mentor: **Toma Keser, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor Tenure*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Branimir Plavša, Ph.D. *Postdoctoral researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024.