# Uspostavljanje protokola za analizu glikozilacije male količine imunoglobulina G iz početnog uzorka velikog volumena

**Milanović, Angela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:163:097771

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**




*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb








**Angela Milanović**

# Uspostavljanje protokola za analizu glikozilacije male količine imunoglobulina G iz početnog uzorka velikog volumena

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordanu Laucu na iskazanom povjerenju i pruženoj prilici za usvajanje novih znanja.*

*Posebno želim zahvaliti dr. sc. Jasminki Krištić na pristupačnosti te svoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svim bliskim prijateljima uz čije je ohrabrenje lakše podnijeti neuspjeh, u čijem je društvu zadovoljstvo proslaviti uspjeh. Zbog vas ću se rado sjećati studentskih dana!*

*Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima koji su mi omogućili da upišem studij i bili bezuvjetna podrška svo vrijeme. Mom Dominiku, nepresušnom izvoru utjehe, nade i ljubavi. Hvala vam što vjerujete u mene!*

# SADRŽAJ

1. UVOD....1
1.1. Imunoglobulin G....1
1.2. Glikozilacija....3
1.2.1. Glikozilacija imunoglobulina G....4
1.3. Metode analize N-glikana imunoglobulina G....6
2. OBRAZLOŽENJE TEME....10
3. MATERIJALI I METODE....11
3.1. Kemikalije....11
3.2. Priprema otopina....12
3.3. Uzorci....14
3.4. Izolacija imunoglobulina G....14
3.5. SDS-PAGE....16
3.6. Odsoljavanje....17
3.6.1. Odsoljavanje hladnim metanolom....17
3.6.2. Odsoljavanje pomoću sustava Amicon sustava za ultrafiltraciju Ultra Centrifugal filtera....17
3.6.3. Odsoljavanje pomoću MF-Millipore membranskog filtra....18
3.7. Deglikozilacija....19
3.8. Obilježavanje glikana....20
3.9. Pročišćavanje....20
3.10. Priprema uzoraka za CGE-LIF analizu....21
3.11. CGE-LIF analiza uzoraka....22
3.11.1. Pregledavanje i obrada rezultata....22
4. REZULTATI I RASPRAVA....23

4.1. Izolacija IgG-a iz uzorka velikog volumena pomoću CIM protein G disk monolitne kolone na instrumentu ÄKTA avant 25 .....23

4.2. Utjecaj soli na CGE-LIF analizu APTS-om obilježenih glikana izoliranog IgG-a ..29

4.3. Učinak koncentriranja uzoraka na analizu.....38

4.4. Analiza uzoraka male količine IgG-a u velikom volumenu CGE-LIF metodom prema uspostavljenom protokolu .....40

5. ZAKLJUČCI .....45

6. LITERATURA .....46

7. SAŽETAK/SUMMARY .....50

8. PRILOZI .....52

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

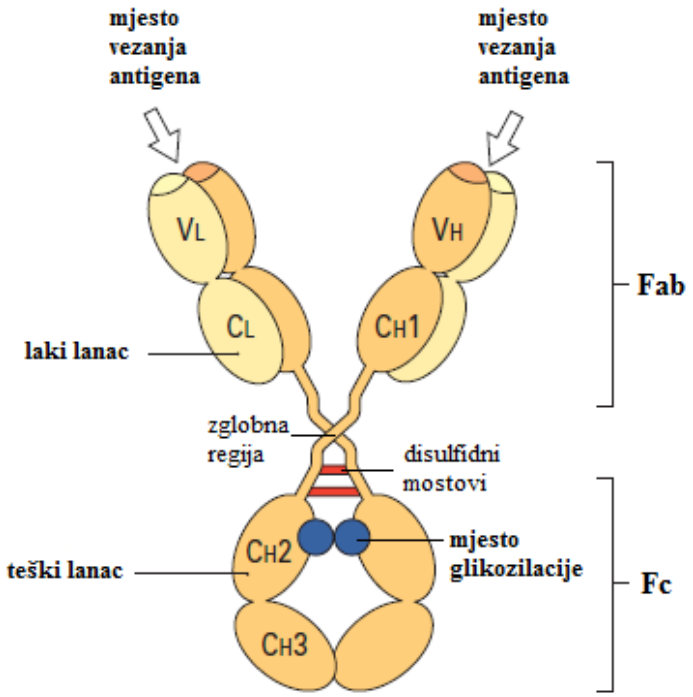
# 1. UVOD

## 1.1. Imunoglobulin G

Uz T-limfocite, antitijela, odnosno imunoglobulini su temelj stečenog imunosnog odgovora. Imunoglobulini su glikoproteini koji u ljudskom organizmu postoje u obliku receptora vezanih na membranu B-limfocita te topljivih molekula izlučenih iz plazma stanica. Kontakt antigena s receptorom na membrani B-limfocita uzrokuje aktivaciju stanice i diferencijaciju u plazma stanicu koja zatim izlučuje antitijelo koje će specifično vezati antigen koji je aktivirao B-stanicu (Male i sur., 2012).

Antitijela imaju dvije glavne funkcije koje predstavljaju oprečne zahtjeve za strukturu. Prva funkcija je prepoznavanje i vezanje različitih stranih antigena što uvjetuje veliku raznolikost antitijela. Druga pak funkcija zahtjeva ograničenu raznolikost strukture antitijela budući se vežu na ograničen broj liganada u svrhu izvršavanja efektorskih funkcija s ciljem eliminacije antigena. Karakteristična struktura antitijela, prikazana na Slika 1., uspijeva udovoljiti objema navedenim funkcijama (Delves i sur., 2011). Antitijela su građena od dva lakša i dva teža lanca koji čine strukturu nalik slovu Y, a za otkriće kemijske strukture antitijela 1972. godine uručena je Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu Geraldu M. Edelmanu i Rodneyu R. Porteru (www.nobelprize.org). Molekula antitijela sastoji se od dva identična dijela koji zadržavaju sposobnost vezanja antigena pa su nazvani Fab fragmentima (engl. *fragment antigen binding*) te trećeg dijela koji nema sposobnost vezanja antigena, ali je primijećeno da lako kristalizira pa je nazvan Fc (engl. *fragment crystallizable*) (Janeway i sur., 2001; Delves i sur., 2011).

Razlikujemo 5 glavnih klasa imunoglobulina: Imunoglobulin A (IgA), imunoglobulin D (IgD), imunoglobulin E (IgE), imunoglobulin G (IgG) i imunoglobulin M (IgM) određeni teškim lancima redom α, δ, ε, μ, i γ. U humanom serumu se IgG nalazi u koncentraciji od 6 do 16 g/L čineći 75 % imunoglobulina i 10-20 % svih plazmatskih proteina. IgG dalje možemo podijeliti na 4 podvrste, IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 navedene prema opadajućoj zastupljenosti (Roth i sur., 2012). IgG se sastoji od dvije vrste polipeptidnih lanaca koji su međusobno povezani disulfidnim mostovima i nekovalentnim interakcijama (Slika 1.), lanca veličine oko 55 kDa nazvanog teškim lancem (engl. *heavy chain*, H) te tzv. lakog lanca (engl. *light chain*, L) veličine oko 25 kDa (Janeway i sur., 2001).




**Slika 1. Shematski prikaz strukture imunoglobulina G1** (preuzeto i prilagođeno iz Male i sur., 2012.)

U humoralnom imunosnom odgovoru IgG je uključen u ključne procese poput reakcija preosjetljivosti, neutralizacije, opsonizacije i fagocitoze antigena, aktivacije komplementa i stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelu (engl. *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) (Gudelj i sur., 2018). Iako je struktura na razini aminokiselinskog slijeda više od 90% identična, svaka podvrsta IgG jedinstvena je po pitanju vezanja antigena, formacije imunosnog kompleksa i aktivacije efektorskih funkcija. Tako je, na primjer, pokazano da je sinteza IgG1 i IgG3 uglavnom posljedica prisutnosti antigena proteinske građe, dok polisaharidni antigeni potiču stvaranje IgG2 i IgG4. Nadalje, IgG1 najefikasnije aktivira klasični put aktivacije komplementa vezujući C1q komponentu komplementa, IgG2 i IgG3 to čine manje uspješno, a IgG4 nema tu sposobnost. Osim toga, prilikom infekcije HIV-om, IgG3 antitijela su učinkovitija u neutralizaciji virusa nego IgG1 (zbog veće fleksibilnosti strukture antitijela i moguće indukcije promjena oligomerne strukture virusa). Među podvrstama postoje također i razlike u afinitetu za pojedinu od tri vrste FcγR receptora pa se tako IgG1 i IgG3 vežu na sve tri vrste receptora, IgG4 na FcγRII i III (slabijim afinitetom nego IgG1), a IgG2 se veže isključivo za FcγRII. Vezanje IgG na FcγR receptore u glavnini slučajeva podržava prezentaciju antigena te aktivaciju fagocitoze i ADCC. Nadalje, postoje razlike i u signalnim putevima

karakterističnima za pojedinu vrstu FcγR receptora. Na primjer, FcγRI, FcγRIIA i FcγRIIIA pokreću aktivirajući signal posljedično vezanju IgG-a, dok FcγRIIB šalje inhibirajući signal (Schroeder i Cavacini, 2010; Vidarsson i sur., 2014).

Pokazano je da navedene razlike u efektorskim funkcijama pojedine vrste IgG-a nisu posljedica isključivo razlike u slijedu aminokiselina u polipeptidnom lancu, nego i prisutnosti različitih glikanskih struktura čiji je utjecaj na funkciju imunoglobulina G opisan u nastavku.

### 1.2. Glikozilacija

Budući da sekvenciranjem cjelokupnog ljudskog genoma nije dobila odgovore na sva pitanja kojima se nadala, znanstvena je zajednica promijenila pogled na proteine i gene koji ih kodiraju. Odgovori po pitanju raznolikosti organizama počeli su se tražiti u kompleksnim procesima posttranslacijskih modifikacija, epigenetici, nekodirajućim DNA i ostalim još nedovoljno poznatim mehanizmima. Glikozilacija je vrlo učestala posttranslacijska modifikacija, a znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem strukture, kemije, biosinteze i biološke funkcije glikana i njihovih derivata naziva se glikobiologija. Glikani su jedni od četiri temeljne makromolekule koje izgrađuju stanicu i nužni su za opstanak višestaničnog organizma što potvrđuje činjenica da je apsolutni nedostatak glikana smrtonosan za embrij (Marek i sur., 1999). Glikani imaju ključnu ulogu u mnogim molekularnim procesima poput pravilnog smatanja proteina, staničnoj adheziji, razvrstavanju i prijenosu molekula, endocitozi, provođenju signala i modulaciji aktivnosti receptora (Ohtsubo i Marth, 2006). Obzirom da su uključeni u gotovo sve biološke procese, od oplodnje i embriogeneze, preko stanične proliferacije, diferencijacije do imunosti i starenja, ne čudi da su u brojnim bolestima uočeni poremećaji u glikozilaciji proteina, kao ni da se mnogi specifični glikani koriste kao dijagnostički biomarkeri i terapeutske mete (Lauc i sur., 2016). Da je značaj glikana prepoznat u znanstvenoj zajednici, svjedoči izjava *Nacional Academy-a* da će biti potrebna dodatna saznanja iz područja glikoznanosti kako bi se mogli ostvariti ciljevi personalizirane medicine te kako bi se moglo iskoristiti ono što je dobiveno znatnim ulaganjem u istraživanje ljudskog genoma i proteoma, posebno vezano uz utjecaj na ljudsko zdravlje (Walt i sur., 2012).

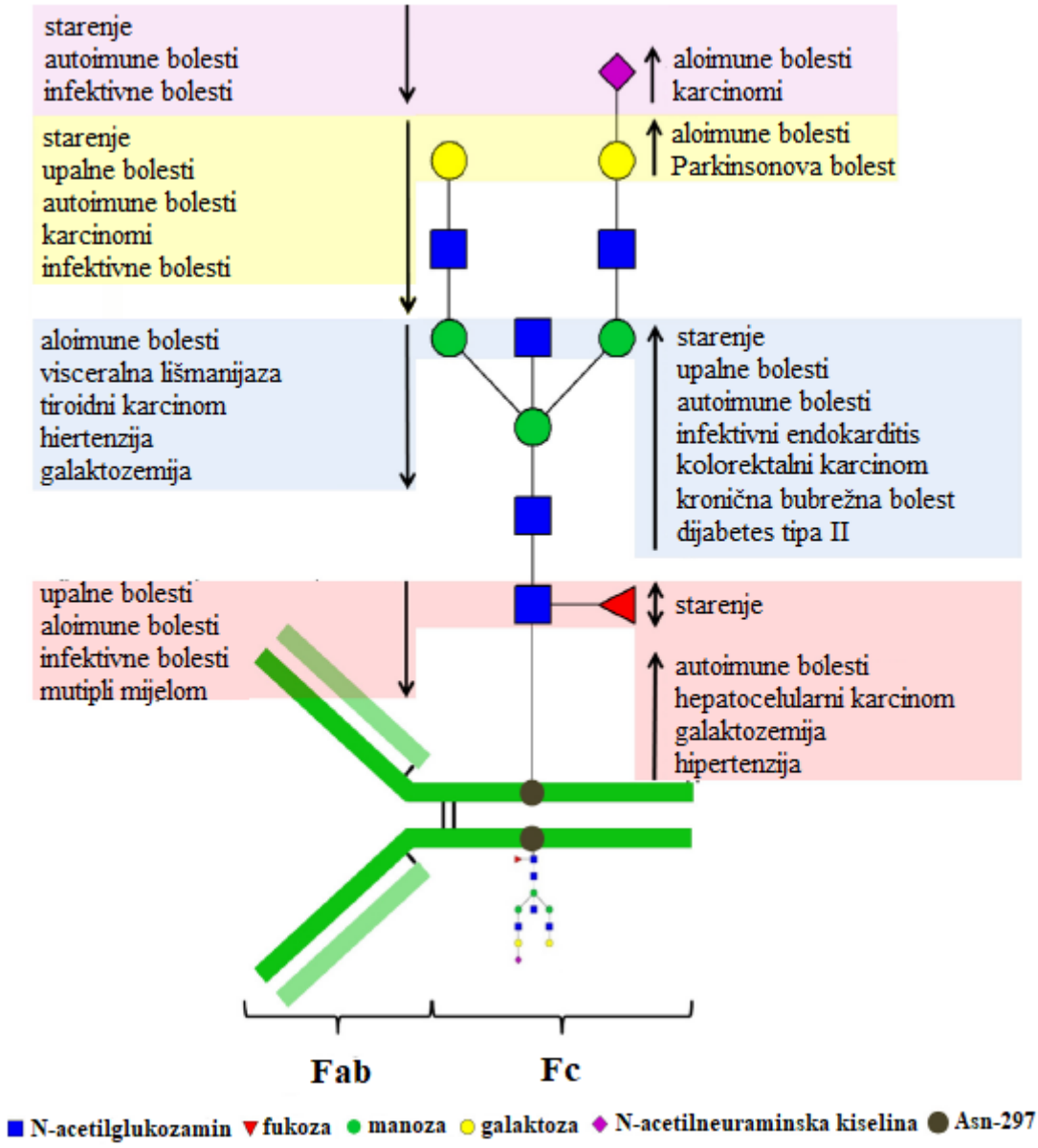
Na polipeptidni lanac, glikanska struktura može biti vezana amidnom vezom na bočni ogranak aminokiseline asparagina (N-glikozilacija) ili glikozidnom vezom preko bočnog lanca aminokiselina serina/treonina (O-glikozilacija) (Moremen i sur., 2014). S obzirom da su gotovo svi membranski, sekretorni i mnogobrojni intracelularni proteini ko- i post-translacijski

modificirani kovalentnom adicijom glikana, ne čudi da glikoproteini čine više od polovice ukupnih proteina od kojih je značajan dio (90%) N-glikoziliran. Budući su najzastupljeniji, N-glikani su do sada i najproučavanija vrsta ugljikohidratne modifikacije proteina (Cummings, 2009); Apweiler i sur., 1999)

### 1.2.1. Glikozilacija imunoglobulina G

Svih pet vrsta imunoglobulina su također glikoproteini, a udio ugljikohidratnog dijela može biti i do 15% mase antitijela, ovisno o vrsti (Arnold i sur., 2007). Svaki teški lanac IgG-a kovalentno je modificiran glikanskom strukturom vezanom na visoko konzerviranu poziciju, aminokiselinski ostatak asparagina na poziciji 297 u CH2 domeni Fc regije (Slika 2.). Osnovna (sržna) struktura N-glikana IgG građena je od N-acetilglukozamina (GlcNAc) i manoze. Vezanjem galaktoze, sijalinske kiseline, sržne fruktoze i račvajućeg GlcNAc-a na osnovnu strukturu u različitim kombinacijama nastaje nekoliko desetaka različitih glikanskih struktura (Vidarsson i sur., 2014). Procjenjuje se da 15 do 20 % IgG molekula sadrži barem jedno glikozilacijsko mjesto i u Fab regiji koje, za razliku od onog u Fc regiji, nije konzervirano. Iako su manje istraživani, smatra se da utječu na stabilnost IgG-a, vrijeme poluživota i vezanje antigena. Razlika između Fc i Fab glikana očituje se u većoj prisutnosti račvajućeg GlcNAc-a te većoj razini galaktozilacije i sijalinizacije, ali manjoj razini fukozilacije Fab glikana (Vidarsson i sur., 2014; Gudelj i sur., 2018).

Sastav glikoma IgG-a (ukupnost svih glikana koji su vezani na IgG) pojedinca relativno je stabilan tijekom kraćeg vremena i u stanju homeostaze, a uočeno je da ovisi o, između ostalog, dobi, spolnim hormonima i životnim navikama. Značajne promjene su uočene u raznim upalnim i autoimunim bolestima te karcinomima (Slika 2.). Osim toga, varijacija sastava glikoma unutar populacije uvjetovana je genetikom pojedinca te okolišnim utjecajima kojima je pojedinac bio izložen tijekom životnog vijeka (Gudelj i sur., 2018).




**Slika 2. Promjene glikozilacije Fc domene imunoglobulina G u starenju i bolesti kod odraslih** (preuzeto i prilagođeno iz Gudelj i sur., 2018)

Male promjene u strukturi N-glikana IgG-a imaju znatne posljedice po konformaciju Fc regije i posljedično utjecaj na efektorske funkcije IgG-a (Gornik i sur., 2012). Na primjer, smanjena galaktozilacija za posljedicu ima smanjenje imunosupresivnog potencijala IgG-a, a opažena je kod nekoliko upalnih i autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa, upalnih bolesti crijeva i sistemskog eritomatoznog lupusa. Smatra se da je galaktozilacija preduvjet za uspješnu interakciju FcγRIIB i dektina-1 odgovornu za protuupalnu aktivnost IgG-a. Također, pronađeno je da imunokompleksi bogati galaktozom inhibiraju proupalnu aktivnost C5a komponente komplementa što predstavlja još jedan potencijalni mehanizam kojim smanjena glikozilacija sudjeluje u patologiji navedenih stanja (Lauc i sur., 2016). Nadalje, važne

promjene u fiziološkoj funkciji IgG-a uzrokuje i prisutnost terminalne sijalinske kiseline. Budući sijalinizacija glikana IgG-a smanjuje sposobnost vezanja IgG-a na aktivirajuće, a povećava sposobnost vezanja na inhibirajuće FcγRIIB receptore, čini ga protuupalnim, umjesto proupalnim agensom. Iako većina molekula IgG-a nije sijalizirana, smatra se kako je protuupalna i imunosupresivna aktivnost visoko sijaliziranog IgG-a ključna za održavanje homeostaze imunosnog sustava (Kaneko i sur., 2001). Bitno je istaknuti i kako više od 95% cirkulirajućeg humanog IgG-a sadrži fukozu vezanu na prvi N-acetilglukozamin u srži glikana, tj. sadrži takozvanu sržnu fukozu (Pučić i sur., 2011). Poznato je da o prisutnosti/odsutnosti sržne fukoze ovisi sposobnost vezanja IgG-a na FcγRIIIa receptore, aktivirajuće Fc receptore izražene na površini stanica imunosnog sustava, poput makrofaga i NK stanica (engl. *natural killer*). Nefukozilirana antitijela se puno jače vežu na receptor što za posljedicu ima 100 puta efikasniju inicijaciju ADCC (Shields i sur., 2002; Masuda i sur., 2007). Zato se smatra da visoki udio fukoziliranog IgG-a predstavlja sigurnosni prekidač koji umanjuje potencijalno štetnu ADCC aktivnost (Scanlan i sur., 2008).

### 1.3. Metode analize N-glikana imunoglobulina G

Za uspostavljanje korelacije između funkcionalnih značajki i strukturnih parametara, potrebna je detaljna analiza glikana. Metode koje se koriste za analizu glikana uključuju kromatografske metode, spektrometriju masa, kapilarnu gel elektroforezu te korištenje lektina (Mariño i sur., 2010). Navedenim metodama moguće je analizirati slobodne glikane i/ili glikopeptide. Razjašnjavanje cjelovite strukture glikana podrazumijeva određivanje ugljikohidratnog sastava, sekvence, grananja monosaharida, intersaharidnih veza i anomerne konfiguracije što zahtjeva uzastopno korištenje nekoliko različitih analitičkih tehnika i iznimno znanje/stručnost (Morelle i Michalski, 2016). Osim određivanja strukture glikana, metode za analizu glikana omogućuju dobivanje informacije o zastupljenosti pojedinih glikanskih struktura.

Prvi korak u analizi glikozilacije imunoglobulina G uključuje pročišćavanje IgG-a iz uzoraka poput plazme ili seruma. Metoda pročišćavanja IgG-a anion-izmjenjivačkom kromatografijom nakon precipitacije amonijevim sulfatom danas je zamijenjena sofisticiranijim metodama koje se temelje na principima afinitetne kromatografije. Najčešće se u tu svrhu koriste protein A i protein G imobilizirani na česticama sefaroze. Pučić i sur. (2011) opisali su metodu izolacije IgG-a iz plazme afinitetnom kromatografijom pomoću proteina G vezanog na monolit, po uzoru na koju je razvijana metoda izolacije i u ovom radu. Alternativni pristup pročišćavanju

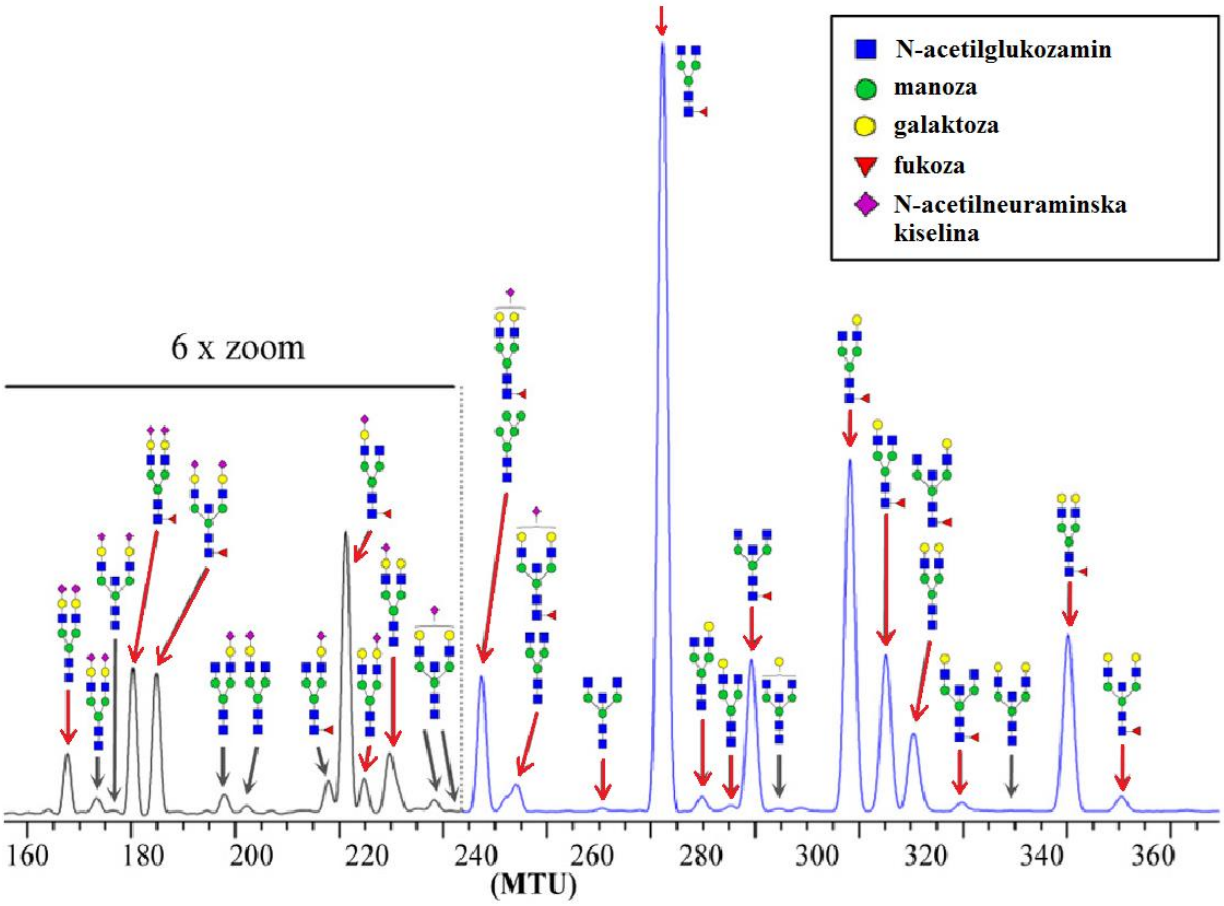
IgG-a iz plazme/seruma predstavlja uporaba SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze na koju se može nastaviti deglikozilacija proteina u gelu. Ovisno o krajnjoj metodi analize glikanskog profila, mogu biti potrebni dodatni koraci poput izmjene pufera i odsoljavanja (Huhn i sur., 2009). N-glikani s IgG-a najčešće se oslobađaju enzimskim djelovanjem glikoamidaza, poglavito glikoamidaze F ([peptid-N-(N-acetil-β-glukozaminil) asparagin amidaza F, PNGaza F). PNGaza F kida vezu između asparaginskog ostatka i sržnog N-acetilglukozamina svih vrsta N-glikana, osim onih koji sadrže fukozu α(1,3) vezanu na sržni GlcNAc (u tom slučaju enzim izbora je PNGaza A) (Mariño i sur.,2010). Kako bi se smanjila sterička smetnja i povećala dostupnost glikana enzimu, preporuča se denaturirati proteine, posebno ako se radi o velikim proteinima ili malim količinama proteina. Denaturacija IgG-a može biti postignuta pomoću natrij-dodecil sulfata (SDS) i zagrijavanja, dok se istodobna denaturacija i samog enzima sprječava dodatkom ne-ionskog deterdženta poput Igepal-a (Huhn i sur., 2009; Morelle i Michalski, 2016). Neke metode detekcije glikana zahtijevaju obilježavaju bojama kako bi se glikani mogli detektirati. Za potrebe kromatografskog profiliranja, najčešće se koriste 2-aminopiridin (PA) i 2-amoni-benzamid (2-AB), dok se 2-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonska kiselina (ANTS), 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonat (APTS) i 2-aminobenzoična kiselina (2-AA) koriste za analizu kapilarnom elektroforezom visoke rezolucije (Geyer i Geyer, 2006). Višak boje, soli i reducirajućih reagensa potrebno je ukloniti budući da često interferiraju s metodama analize/detekcije koje slijede. Za pročišćavanje uzorka korištene su razne metode poput gel filtracije, precipitacije i ekstrakcije na čvrstu fazu. Metoda kromatografije hidrofilnih interakcija-ekstrakcije na čvrstu fazu (engl. *hydrophilic interaction chromatography-solid-phase extraction*, HILIC-SPE) pogodna je za pročišćavanje derivatiziranih glikana, a temelji se na zadržavanju glikana na stacionarnoj fazi hidrofilnim interakcijama, dok se višak obilježivača odstranjuje u organskoj/hidrofobnoj mobilnoj fazi uslijed niže hidrofilnosti (Zhang i sur., 2014).

U tekućinskoj kromatografiji odvajanje oslobođenih N-glikana ovisi o vrsti kromatografije pa se u anionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji glikani razdvajaju na temelju količine naboja, dok separacija u normalno-faznoj kromatografiji ili kromatografiji koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (*HILIC*) ovisi o hidrofilnosti i veličini glikana. Tekućinska kromatografija visoke/ultra visoke djelotvornosti može se koristiti samostalno uz detekciju fluorescencije derivatiziranih glikana ili kao tehnika separacije koja prethodi masenoj spektrofotometriji čime se značajno povećava osjetljivost metode (Geyer i Geyer, 2006). Zbog mnogih prednosti poput

visoke razlučivosti, robusnosti i mogućnosti kvantifikacije tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detekcijom fluorescencije u širokoj je uporabi (Huffman i sur., 2014).

Masena spektrometrija temelji se na ionizaciji, fragmentaciji i utvrđivanju mase fragmenata glikana i omogućava osvjetljavanje strukture i sastava glikana te identifikaciju mjesta glikozilacije glikoproteina (Roth i sur., 2012). Osjetljivija je od tekućinske kromatografije, ali nema mogućnost odvajanja izomernih struktura, a kvantifikacija glikana je ponekad manje pouzdana (Huffman i sur., 2014).

Kapilarna gel elektroforeza s detekcijom fluorescencije inducirane laserom (engl. *capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence*, CGE-LIF) se može koristiti za brzu analizu glikana oslobođenih sa glikoproteina. Obilježavanje glikana APTS-om omogućava razdvajajanje glikana u električnom polju i osjetljivu detekciju. Razdvajanje glikana kapilarnom elektroforezom vrlo je efikasno, ali i često kraće u odnosu na tekućinsku kromatografiju (Mariño i sur., 2010). CGE-LIF analiza rezultira elektroferogramom, a izgled profila glikozilacije IgG-a izoliranog iz plazme prikazan je na slici 3. Callewarth i suradnici su opisali metodu CGE-LIF analize glikana na multikapilarnim DNA-analizatorima koja omogućava analizu N-glikana porijeklom od svega nekoliko pikomola glikoproteina (Callewaert i sur., 2001). DNA analizatori, zastupljeni diljem laboratorija, koriste poliakrilamidne gelove za razdvajanje glikana i laser za ekscitaciju fluorescentnog obilježivača za detekciju (Reusch i sur., 2014). Budući su dostupni u verzijama s više desetaka kapilara, navedena metoda omogućuje visoko-protočnu analizu glikana tehnički, analitički, vremenski i financijski manje zahtjevnu od ostalih opisanih metoda. Povezivanje kapilarne elektroforeze i masene spektrometrije značajno povećava osjetljivost metode i predstavlja moćan alat u analizi strukture glikana kao što su pokazali Lageveen-Kammeijer i suradnici, 2019. Visoka osjetljivost, mogućnost pouzdane i relativne kvantifikacije te uspješno razdvajanje izomernih struktura prednosti su CGE-LIF metode glikoprofiliranja.




**Slika 3. Profil N-glikana ukupnog IgG-a izoliranog iz plazme dobiven CGE-LIF metodom** (preuzeto i prilagođeno iz Huffman i sur., 2014). Crvenim strelicama označeni su pikovi koji će biti integrirani tijekom eksperimenta.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Od svih serumskih proteina, glikozilacija visoko zastupljenog proteina IgG vjerojatno je najproučavanija, osobito u kontekstu karakterizacije struktura glikana koji mogu biti vezani na IgG, funkcionalne uloge istih te promjena u glikozilaciji u različitim stanjima i bolestima, zbog čega IgG predstavlja odličan model glikoproteina. Ipak, za detaljnije razumijevanje glikozilacije općenito, pa tako i glikozilacije IgG-a, javlja se potreba za istraživanjima koja uključuju stanične modele. Nerijetko stanični modeli proizvode i izlučuju male količine IgG-a, a osobito uslijed različitih tretmana, stoga je potrebno uspostaviti stanične kulture velikog volumena (uzgoj velikog broja stanica u plastičnim bocama (*flask-ovima*) i odgovarajućim (mililitarskim) volumen medija) kako bi se dobile mjerljive količine IgG-a u supernatantima stanične kulture.

Stoga je cilj ovog rada uspostaviti protokol za analizu N-glikozilacije IgG-a iz početnih uzoraka male količine IgG-a u velikom volumenu. Konkretnije, s obzirom da su postojeće metode za analizu glikozilacije IgG-a uglavnom optimirane na uzorcima IgG-a izoliranom iz seruma/plazme, cilj ovog rada je ustanoviti mogu li se postojeće metode uz manje modifikacije i optimizacije koristiti za analizu glikozilacije IgG-a u slučaju kada početni uzorak sadrži mikrogramske količine (1-10 μg) IgG-a prisutne u volumenu od nekoliko desetaka mililitara staničnog medija. S obzirom da se u ovom radu želi ispitati mogućnost dobivanja profila IgG glikana u slučajevima kada početni uzorak sadrži ukupne količine IgG-a od svega 1-10 μg (te prisutnih unutar velikog volumena), metoda analize N-glikana kapilarnom gel elektroforezom s laserski potpomognutom fluorescencijom odabrana je jer je manje analitički zahtjevna i osjetljivija. S obzirom da se metoda analize glikana kapilarnom gel elektroforezom odlikuje visokom osjetljivošću, uspostavljanje protokola za analizu malih količina IgG-a iz početnog uzorka velikog volumena bazirat će se na toj metodi. Nadalje, cilj ovog rada je odrediti granice detekcije uspostavljenog protokola.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Kemikalije

| NAZIV | PROIZVOĐAČ |
|---|---|
| Acetonitril (ACN), HPLC čistoće | Panreac |
| Amonijev hidrogenkarbonat ($NH_4HCO_3$) | Sigma-Aldrich |
| APTS (8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina trinatrijeva sol) | Sigma-Aldrich |
| Bio-Gel P-10 gel | Bio-Rad |
| Bromfenol plavo | Thermo Fisher Scientific |
| Citratna kiselina | Sigma-Aldrich |
| Dimetil sulfoksid (DMSO) | Sigma-Aldrich |
| Etanol (EtOH) | Honeywell Riedel-de Haën |
| Formijatna kiselina (FA) | Merck Millipore |
| GeneScan 500 LIZ Size Standard | Invitrogen |
| Glicerol | Gram-mol |
| Gliko N-glikanaza (PNGase F) | Promega |
| Hi-Di Formamid | Invitrogen |
| Igepal CA-630 | Sigma-Aldrich |
| Kalijev dihidrogen fosfat ($KH_2PO_4$) | Acros organics |
| Kalijev klorid (KCl) | Gram-mol |
| Metanol | Honeywell Riedel-de Haën |
| 2-metilpiridin boran (PB) | Sigma-Aldrich |
| Natrijev dodecil sulfat (SDS) | Merck |
| Natrijev hidrogen fosfat ($Na_2HPO_4$) | Merck |
| Natrijev hidroksid (NaOH) | Sigma-Aldrich |
| Natrijev klorid (NaCl) | Honeywell Fluka |

| | |
|---|---|
| Octena kiselina (HA) | Honeywell Fluka |
| Opti-MEM I | Gibco, Thermo Fisher Scientific |
| Trietilamin (TEA) | Sigma-Aldrich |
| Tris(hidroksimetil)-aminometan (TRIS) | Thermo Fisher Scientific |

### 3.2. Priprema otopina

**Tablica 1. Priprema otopina potrebnih za analizu glikozilacije IgG-a.**

| **NAZIV OTOPINE** | **PRIPREMA** |
|---|---|
| 80% ACN | Za pripremu 500 mL ACN-a pomiješano je 400 mL ACN-a i 100 mL ultra čiste vode. |
| 80% ACN + 100 mM TEA, pH 8,5 | Pomiješano je 120 mL ACN-a i 10 mL ultra-čiste vode, dodano 2,1 mL TEA, a pH je namješten na 8,5 pomoću octene kiseline i nadopunjeno s ultra čistom vodom do volumena od 150 mL. |
| 1 M $NH_4HCO_3$ | Za pripremu 100 mL 1 M $NH_4HCO_3$ otopljeno je 7,906 g $NH_4HCO_3$ u 100 mL ultra čiste vode. |
| 30 mM APTS u 3,6 M citratnoj kiselini | Prvo je pripremljena citratna kiselina koncentracije 3,6 M otapanjem 1,38g citratne kiseline u 2 mL ultra čiste kiseline. Količina od 25 mg APTS-a je otopljena u 1,6 mL 3,6 M citratne kiseline. Pripremljena boja je podijeljena na alikvote od 220 µL i pohranjena na -20°C. |
| 100 mg/ml Bio-Gel P-10 gel otopina u vodi/EtOH/ACN (70/20/10%, v/v) | Za pripremu 200 mL suspenzije Bio-Gela P-10 20 g Bio-Gela P-10 otopljeno je u 200 ml smjese ultra čiste vode/EtOH/ACN u omjeru 70/20/10 (v/v/v). |

| | |
|---|---|
| 20% etanol u 20 mM TRIS + 0,1 M NaCl, pH 7,4 | 200 mL etanola, 2,42 g TRIS-a i 5,844g NaCl je otopljeno u 700 mL ultra čiste vode, a pH je namješten na 7,4 titracijom s HCl. Smjesa je nadopunjena ultra čistom vodom do volumena od 1 L i filtrirana. Otopina je filtrirana kroz 0,2 μm PES filtar (Nalgene, Thermo Scientific). |
| 0,1 M formijatna kiselina, pH 2,5 | Za pripremu 1 L 1 M formijatne kiseline pomiješano je 3,77 mL formijatne kiseline i 1 L ultra čiste vode. Otopina je filtrirana kroz 0,2 μm PES filtar (Nalgene, Thermo Scientific). |
| 4% Igepal | Za pripremu 100 mL 4% Igepal-a otopljeno je 4 mL Igepal-a u 80 mL ultra čiste vode uz zagrijavanje na 65 °C. Otopina je nadopunjena ultra čistom vodom do volumena od 100 mL Pripremljena otopina čuva se na 4 ºC. |
| 0,1 M NaOH | U 0,5 L ultra čiste vode otopljeno je 2 g NaOH. |
| 1X PBS, pH 7,4 | Za pripremu 1 L 1X PBS pomiješano je 100 mL 10X PBS i 900 mL ultra-čiste vode, a pH je namješten na 7,4 titracijom s NaOH. |
| 1,66X PBS | Za pripremu 3 mL 1,66X PBS pomiješano je 2 mL ultra čiste vode i 1 mL 5X PBS-a. |
| 5X PBS | Za pripremu 200 mL 5X PBS pomiješano je 100 mL 10X PBS i 100 mL ultra čiste vode. |
| 10X PBS, pH 6,6 – 6,8 | Za pripremu 1 L 10X PBS otopljeno je 0,028 g NaCl, 13,832 g $Na_2HPO_4$, 2,964 g $KH_2PO_4$ i 1, 976 KCl u 1 L ultra čiste vode. Otopina je filtrirana kroz 0,2 μm PES filtar (Nalgene, Thermo Scientific). |

| | |
|---|---|
| 2% SDS | Za pripremu 100 mL 2% SDS-a 2 g SDS-a otopljeno je u 100 ml ultra čiste vode. Pripremljena otopina čuva se na 37 ºC. |
| 0,5 % SDS | Za pripremu 4 mL 0,5 % otopine SDS-a pomiješano je 3 mL ultra čiste vode i 1 mL 2% SDS-a. |

### 3.3. Uzorci

Uzorci velikog početnog volumena koji sadrže malu količinu IgG-a pripremljeni su na način da je u 50 mL Opti-MEM I medija za uzgoj stanica dodana količina IgG-a od 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 50 μg. Uzorci su zatim filtrirani kroz sterilne filtere za šprice veličine pora 0,22 μm (Ultra Cruz Syringe Filter PVDF 0,22 μm 30 mm diameter, Santa Cruz Biotechnology) pomoću šprice zapremnine 50 mL.

Uzorci koji oponašaju (simuliraju) eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG iz velikog volumena medija pomoću ÄKTA avant 25 pripravljeni su na način da je u 700μL amonijeva formijata dodana količina IgG-a od 1, 2, 3, 5, 7 i 10 μg.

Za ispitivanje utjecaja volumena amonij formijat pufera u kojem se nalazi IgG nakon izolacije iz velikog početnog volumena, tj. utjecaja soli prisutnih nakon sušenja IgG eluata na analizu glikozilacije izoliranog IgG-a, korišteni su uzorci pripremljeni dodatkom IgG-a u količini od 1, 2, 3, 5, 7 i 10 μg u 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 i 700 μL amonijeva formijata.

### 3.4. Izolacija imunoglobulina G

Pročišćavanje imunoglobulina G od ostalih komponenti matriksa uzorka provedeno je afinitetnom kromatografijom na ÄKTA avant 25 (GE Healthcare) kromatografskom sustavu uz primjenu CIM r-Protein G Disk monolitne kolone (BIA separations).

Princip: ÄKTA avant 25 je kromatografski sustav koji omogućava brzo pročišćavanje proteina, peptida i nukleinskih kiselina u velikom rasponu količina/koncentracija. CIM® r-Protein G disk se sastoji od monolitne stacionarne faze na koju je vezan rekombinantni protein G (proizveden u E. coli), koji uklopljen u kućište čini CIM® disk monolitnu kolonu (Slika 4.). Budući protein

G veže Fc fragment IgG-a, koristi se za brzo i učinkovito pročišćavanje IgG-a metodom afinitetne kromatografije.



**Slika 4. CIM r-Protein G Disk monolitna kolona**

Za kontrolu ÄKTA avant 25 kromatografskog sustava korišten je program UNICORN (GE Helathcare). Metoda za izolaciju IgG-a (Tablica 2.) složena je u programu UNICORN koristeći upute proizvođača CIM Protein G disk monolitne kolone (BIA separations) te već prethodno opisani postupak za izolaciju IgG-a iz uzoraka krvne plazme na protein G monolitnoj pločici (Pučić i sur., 2011).

**Tablica 2. Opis metode za izolaciju IgG-a pomoću CIM Protein G disk monolitne kolone na kromatografskom uređaju ÄKTA avant 25.**

| **Proces** | **Otopina/pufer** | **protok (mL/min)** | **trajanje (min)** |
|---|---|---|---|
| **Ispiranje** | $H_2O$ | 3 | 3 |
| | 1XPBS | 3 | 3 |
| | formijatna kiselina | 3 | 3 |
| | 10XPBS | 3 | 3 |
| **Neutralizacija** | 1XPBS | 3 | 5 |
| **Nanošenje uzorka** | uzorak | 2 | 25 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Vezanje IgG-a na kolonu i ispiranje** | 1XPBS | 2 | 8 |
| **Eluiranje IgG-a** | formijatna kiselina | 1 | 4,2 |
| **Regeneracija diska/kolone** | formijatna kiselina | 1 | 6 |
| | 10XPBS | 3 | 5 |
| | 1XPBS | 3 | 5 |
| | pufer za pohranu diska (20 % ethanol/ 0.1 M NaCl/ 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) | 3 | 5 |

Tijekom optimizacije izolacije IgG na Protein G disk monolitnoj koloni IgG je prvo eluiran u frakcijama od 400 μL, a nakon optimizacije u frakcijama od 600 μL. Za neutralizaciju formijatne kiseline dodano je 102 μL amonijeva bikarbonata u tubice za prikupljanje frakcije eluata od 600 μL. Tijek kromatografije praćen je u UNICORN programu pomoću UV detektora mjerenjem apsorbancije na 280 nm.

Nakon izolacije, frakcije eluata u kojima se nalazi IgG osušene su u vakuum centrifugi (vakuum koncentrator *miVac Quattro* (GeneVac) s hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* (Thermo Scientific) i vakuum pumpom *OFP400* (Thermo Scientific)).

### 3.5. SDS-PAGE

U svrhu provjere izolata IgG-a provedena je SDS-elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,* SDS-PAGE). Iz određenih frakcija eluata IgG-a uzeti su alikvoti od 100 μl koji su zatim osušeni u vakuum-centrifugi. Uzorci su pripremljeni resuspendiranjem osušenih uzoraka u 10 μl ultra čiste vode i 5 μl 3× koncentriranog pufera za nanošenje uzorka (7,6 g/L Tris, 23 g/L SDS, 0,5 g/L bromfenol plavo, u 10% glicerolu, pH 6,8) nakon čega je slijedila inkubacija od 5 min pri 95°C uz miješanje (Thermomixer comfort, Eppendorf).

Elektroforeza je provedena na 200 V, 35 min. Korišten je uređaj NuPAGE SureLock Mini cell system (Thermo Fisher Scientific). Komercijalni gelovi (NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 4-12%, 1 mm, 12 jažica, Thermo Fisher Scientific) su nakon elektroforeze tri puta isprani Milli-Q vodom uz miješanje. Svako je ispiranje trajalo 5 min. Gel je bojan bojom Gel Code Blue Safe

Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) 1h uz miješanje. Nakon bojanja gel je ispran malom količinom Milli-Q vode te stavljen na odbojavanje u 150 ml Milli-Q vode na 3h uz miješanje.

## 3.6. Odsoljavanje

Odsoljavanje IgG-a nakon izolacije provedeno je trima metodama i) pomoću hladnog metanola, ii) pomoću sustava Amicon sustava za ultrafiltraciju, iii) pomoću MF-Millipore membranskog filtra, a koje su opisane u nastavku.

### 3.6.1. Odsoljavanje hladnim metanolom

Princip: Metanol precipitira proteine koji se centrifugiranjem odvajaju na dno, dok u nadsloju metanola ostaju otopljene soli.

Posušenim uzorcima dodano je po 1 mL metanola prethodno ohlađenog na -20 °C i dobro promiješano pipetom. Pločica se zaštitila prozirnom ljepljivom folijom (sprječava isparavanje metanola) i centrifugirala 15 minuta na 2200 g (Eppendorf centrifuga, model 5804). Nakon centrifugiranja, 970 µL supernatanta pažljivo je otklonjeno i odbačeno te se postupak ponovio još jednom. Uzorci su posušeni u vakuum centrifugi.

### 3.6.2. Odsoljavanje pomoću sustava Amicon sustava za ultrafiltraciju Ultra Centrifugal filtera

Princip: Amicon sustava za ultrafiltraciju (originalni naziv: Amicon® Ultra Centrifugal Filter) komercijalno je dostupan sustav za jednokratnu uporabu koji omogućava ultrafiltraciju, odsoljavanje, izmjenu pufera i ukoncentriravanje raznih bioloških uzoraka. Sustav se sastoji od tubice za sakupljanje filtrata, tubice za sakupljanje koncentrata te filtrirajuće naprave s okomito položenom membranom građene od regenerirane celuloze.



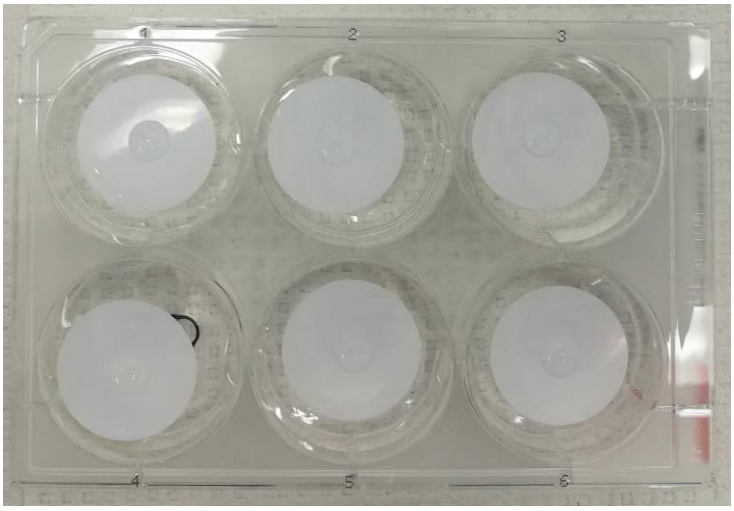
**Slika 5. Amicon 10K sustav za ultrafiltraciju** (preuzeto s www.merckmillipore.com)

Za potrebe ovog rada korišten je Amicon 10K sustav za ultrafiltraciju za volumene do 2 mL s granicom molekularne mase (engl. *Nominal Molecular Weight Limit*, NMWL) od 10 000 Da. Budući da membrana sadrži tragove glicerina, preporuča se sustav isprati puferom ili ultra čistom vodom. Amicon sustav, koji je prethodno sastavljen prema uputama proizvođača, najprije je dva puta ispran s po 2 mL ultra čiste vode koja se uklonila centrifugiranjem 30 min na 4000 g (Eppendorf centrifuga, model 5804). Pojedini uzorak je iz jažice pločice pipetom prenesen u tubicu zapremnine 2 mL te nadopunjen ultra čistom vodom do oznake volumena 2 mL. Cjelokupni volumen je zatim prenesen u Amicon sustav koji je čvrsto poklopljen tubicom za sakupljanje koncentrata te centrifugiran 30 min na 4000 g. Filtrat je odbačen, a uzorku je dodano još 1,8 mL ultra čiste vode i ponovno je centrifugiran pri navedenim uvjetima. Nakon što je filtrat odbačen, Amikon sustav je preokrenut tako da tubica za sakupljanje koncentrata bude na dnu te je centrifugiran 2 min na 1000 g. Koncentrat je prenesen u predviđenu jažicu pločice za skladištenje uzoraka koja je pospremljena na -20 °C do daljnje analize.

### 3.6.3. Odsoljavanje pomoću MF-Millipore membranskog filtra

Princip: Primijenjena je tehnika „dijalize u kapljici“ (engl. *drop dialysis*) koja omogućava izmjenu pufera te uklanjanje viška soli iz uzoraka otopina proteina i nukleinskih kiselina malih volumena (Marusyk i Sergeant, 1980). U ovom radu korištena je MF-Millipore™ Membrane Filter hidrofilna membrana građena od mješavine celuloznih estera s veličinom pora od 0,025 μm.

Posušeni uzorci su resuspendirani u 50 µL ultra čiste vode. U pojedinu jažicu pločice sa 6 jažica dodano je po 9 mL ultra čiste vode na čiju je površinu položen membranski filtar u obliku diska. Disk je ostavljen 5 min da se u potpunosti namoči vodom. Cjelokupni volumen uzorka pipetom je pažljivo nanesen na sredinu diska (Slika 6.), a pločica je poklopljena odgovarajućim poklopcem i ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 2 sata i 30 minuta. Nakon isteka vremena, uzorak je sa površine diska pipetom prenesen u pločicu za sakupljanje uzoraka, a mjesto nanošenja na disku isprano je s dodatnih 20 µL ultra čiste vode. Pločica sa uzorcima pospremljena je na -20 °C do daljnje analize.




**Slika 6. Prikaz uzoraka postavljenih na MF-Millipore membranske filtre**

### 3.7. Deglikozilacija

Princip: Sa glikoproteina se cjeloviti N-glikani mogu osloboditi enzimatskim djelovanjem amidaze, tj. peptid N-glikozidaze F (engl. *peptide N-glycosidase F*, PNGase F). PNGaza F kida vezu između sržnog N-acetilglukozamina i bočnog lanca asparaginskog ostatka proteina kod svih N-glikana, osim onih koji sadrže sržnu fukozu α(1,3) vezanu na sržni GlcNAc (Mariño i sur., 2010). Oslobađanje N-glikana sa izoliranog i pročišćenog imunoglobulina G iz uzorka provedeno je pomoću PNGaze F kako je opisano u nastavku.

Uzorci raspoređeni u pločicu s 96 jažica i osušeni u vakuum centrifugi ponovno su otopljeni dodatkom 3 µL 1,66X PBS resuspendirajući pipetom. Protein je denaturiran dodatkom 4 µL 0,5 % SDS-a i inkubacijom 10 min na 65°C. Potom je dodano 2 µL 4% Igepala.

Enzimska smjesa pripremljena je miješanjem 1 µL 5X PBS i 0,12 µL PNG-aze F po uzorku. U svaki uzorak dodan je 1 µL smjese, a pločica se zaštitila Porvair Thermal folijom i inkubirala 3 sata na 37°C. Nakon inkubacije, uzorci su osušeni u vakuum centrifugi.

### 3.8. Obilježavanje glikana

Princip: Za potrebe analize pomoću kapilarne gel elektroforeze s detekcijom fluorescencije inducirane laserom, izolirane N-glikane potrebno je učiniti elektroforetski pokretljivima i fluorescentnima derivatizacijom glikana s fluoroforom koja nosi negativni naboj, poput 9-aminopiren-1,3,6-trusilfonske kiseline (engl. *9-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid,* APTS). Reakcijom reduktivne aminacije APTS se vezuje na reducirajuće krajeve glikana (Reusch i sur., 2014).

Otopina PB u DMSO (1,2 M 2-pikolin boran u DMSO) pripremljena je otapanjem 38.5 g PB u 300 µL DMSO (u digestoru) uz miješanje na vortexu do potpunog otapanja PB. Za jednu pločicu sa 96 jažica pripremljeno je 210 µL APTS otopine za obilježavanje (30 mM APTS u 3,6 M citratnoj kiselini), 300 µL otopine PB te 200 µL ultra čiste vode.

U svaki je uzorak dodano 2 µL ultra čiste vode miješajući pipetom kako bi se otopio. Zatim je, bez miješanja, u pojedinu jažicu na uzorak dodano po 2 µL APTS otopine za obilježavanje te potom 2 µL otopine PB. Pločica se zaštitila Porvair Thermal folijom i ostavila miješati 10 min na 500 rpm na sobnoj miješalici. Pločica je kratko centrifugirana te inkubirana 16 sati na 37°C.

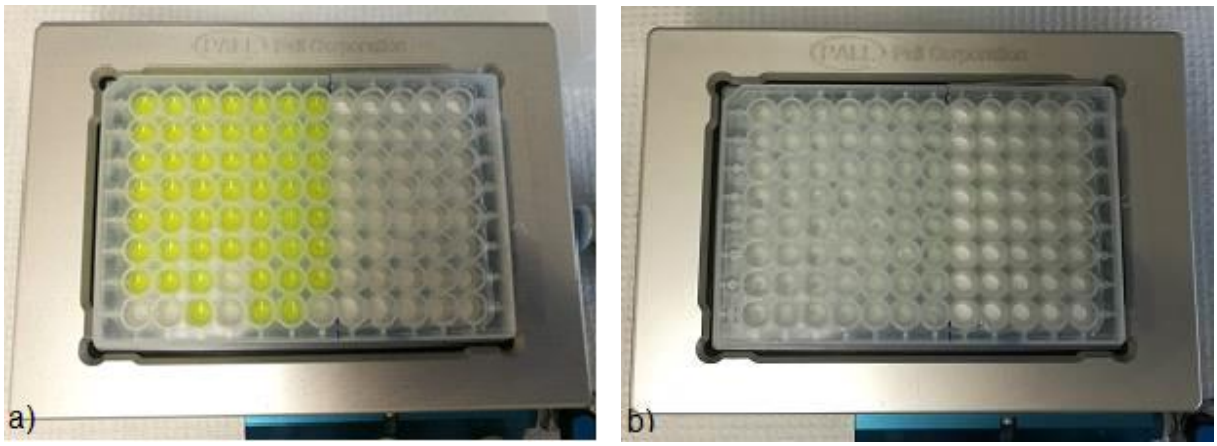
Reakcija obilježavanja prekinuta je dodatkom 100 µL svježe pripremljenog i ohlađenog (2 - 8 °C) 80 % ACN-a u svaki uzorak. Pločica je zaštićena folijom i pospremljena u hladnjak na + 4 °C.

### 3.9. Pročišćavanje

Princip: Višak APTS-a, reducirajućih agensa i ostale nečistoće uklonjene su metodom ekstrakcije na čvrstu fazu temeljene na kromatografiji hidrofilnih interakcija (engl. *Hydrophilic Interaction Chromatography based Solid Phase Extraction*, HILIC SPE).

Suspenzija Bio-Gel P-10 stavljena je na sobnu temperaturu i pripremljena čista 350 µL AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločica. U predviđene jažice 350 µL AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločice odpipetirano je 200 µL Bio-Gel P-10 suspenzije. Otapalo je uklonjeno primjenom

vakuuma. Pojedina je jažica isprana s 3 X 200 µL ultra čiste vode koja je nakon inkubicije od 1 min uklonjena primjenom vakuuma. Jažice su zatim ekvilibrirane s 3 X 200 µL 80 % ACN-a koji je također uklonjen vakuumom nakon jednominutne inkubacije. Ukupni volumen uzorka pipetom je prenesen u odgovarajuće jažice GHP filter pločice koja je ostavljena na miješalici 5 min na 450 rpm. Višak otapala uklonjen je primjenom vakuuma. Pločica je zatim pet puta isprana s po 200 µL svježe pripremljenog 80% ACN-a koji sadrži 100 mM trietilamina (TEA) te s 3 X 200 µL 80 % ACN-a. Nakon dodatka otapala, pojedini korak ispiranja slijedila je dvominutna inkubacija i uklanjanje otapala vakuumom. Pločica je stavljena iznad 1 mL pločice za sakupljanje te je u jažice dodano 100 µL i 2 X 200 µL ultra čiste vode pri čemu je svaki korak dodavanja vode slijedila inkubacija 5 min na miješalici pri 450 rpm. Eluat je primjenom vakuuma prikupljan u pločicu za skladištenje koja se zaštitila Porvair Thermal folijom i pospremila u zamrzivač.




**Slika 7. Prikaz uzoraka nanesenih na AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločicu**

a) prije i b) poslije HILIC SPE pročišćavanja

### 3.10. Priprema uzoraka za CGE-LIF analizu

Za pripremu uzoraka potrebno je pripremiti pločicu s uzorcima, formamid, kombinirani uzorak APTS-om obilježenih N-glikana IgG-a te GeneScan 500 LIZ standard veličine. LIZ standard je razrijeđen 1:50 s Hi-Di formamidom tako da je pomiješano 2 µL GeneScan 500 LIZ standarda veličine s 98 µL Hi-Di formamida.

U čistu MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate pločicu dodano je u svaku jažicu po 6 µL Hi-Di formamida, 1 µL LIZ standarda razrijeđenog 1:50 s Hi-Di formamidom te 3 µL uzorka (ukupni volumen 10 µL). Za pripremu standarda u predviđenu je jažicu dodano 8 µL Hi-Di

formamida, 1 µL kombiniranog uzorka N-glikana imunoglobulina G obilježenih APTS-om te 1 µL LIZ standarda razrijeđenog 1:50 s Hi-Di formamidom. Za pripremu slijepe probe u 8 µL Hi-Di formamida i 1 µL LIZ standarda razrijeđenog 1:50 s Hi-Di formamidom dodan je 1 µL ultra čiste vode. Pločica s pripremljenim uzorcima je zatim zaštićena sa septom za pločicu s 96 jažica te kratko centrifugirana na 164 g kako bi se uklonili potencijalni mjehurići zraka na dnu jažica.

## 3.11. CGE-LIF analiza uzoraka

Analiza je izvedena na Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) sa 4 kapilare duljine 50 cm ispunjene POP-7 polimerom. Metoda je složena u *3130 Series Data Collection* programu. Uzorak je injektiran elektrokinetički pri naponu od 15 kV tijekom 5 sekundi, a eletroforeza je provođena 2800 sekundi, tj. 47 minuta pri naponu od 15 kV i temperaturi od 30 °C.

### 3.11.1. Pregledavanje i obrada rezultata

Prikupljeni sirovi podaci preliminarno su pregledani u programu *GeneMapper*®, a zatim su pomoću *Data File Converter* programa pretvoreni iz formata .csv u format .xml kako bi mogli biti analizirani *glyXtool* alatom za analizu glikana. Automatizirana normalizacija migracijskih vremena i integracija odabranih pikova (Slika 3.) dobivenih elektroferograma izvedena je u programu *glyXtool.*

# 4. REZULTATI I RASPRAVA

## 4.1. Izolacija IgG-a iz uzorka velikog volumena pomoću CIM protein G disk monolitne kolone na instrumentu ÄKTA avant 25

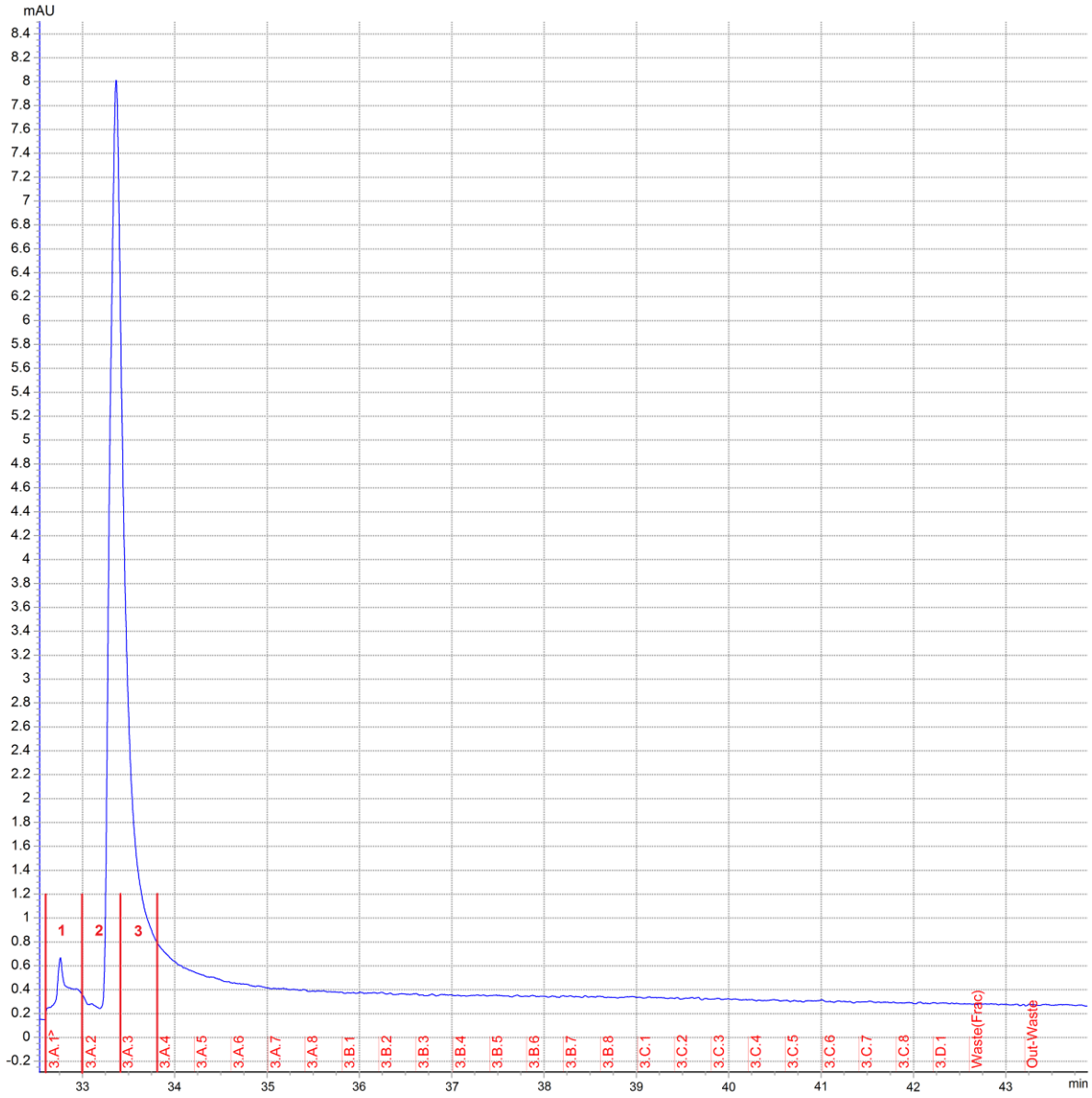
Izolacija/pročišćavanje IgG-a iz pripremljenih uzoraka male količine IgG-a u velikom volumenu provedena je afinitetnom kromatografijom uz CIM® r-Protein G disk monolitne kolone na kromatografskom sustavu ÄKTA avant 25 kako je opisano u poglavlju 3.4 „Izolacija imunoglobulina G“. U ovom radu male količine IgG-a odnose se na mikrogramske količine IgG-a (1-10 μg), a kao otapalo/medij velikog volumena u kojem su se nalazile mikrogramske količine IgG-a odabran je stanični medij (Opti-mem, Gibco) volumena 50 mL.

Metode za analizu glikozilacije proteina IgG uglavnom su optimirane na IgG-u izoliranom iz uzorka plazme ili seruma. Ipak, metode koje se koriste za izolaciju IgG-a iz uzoraka plazme ili seruma, poput izolacije IgG pomoću protein G zrna, proteina G monolitne pločice ili drugih sustava, bilo u obliku pojedinačnih tubica/kolonica ili u formatu pločica, nisu pogodne za izolaciju IgG-a iz uzoraka velikih volumena iz nekoliko razloga. Prvo, ti su sustavi namijenjeni za izolaciju uzoraka manjih volumena. Volumen koji mogu primiti jednim nanošenjem obično iznosi do 2 mL pa bi uzorci velikih volumena, poput uzoraka od 50 mL korištenih u ovom radu, morali biti naneseni u 25 frakcija po 2 mL, što onda zahtjeva puno ručnog rada, koncentracije, a povećava mogućnost greške. Nadalje, zbog višekratnog pipetiranja može doći do većeg gubitka ionako male količine IgG-a iz uzorka. Osim volumena, problem predstavlja i sastav uzorka. Tako na primjer, stanični medij je gušći, kompleksniji medij od uobičajenih otapala u kojima se uzorci nanose na pločicu (uzorci razrijeđeni u 1XPBS-u) pa prolazi sporije/teže, a prolaskom velikih volumena medija kroz kolonu pločice može doći i do začepljenja kolona što bi znatno usporilo ili čak onemogućilo daljnji rad. Kako bi se izbjegli problemi vezani uz preveliki broj manipulacija uzorcima koje mogu dovesti do greške i produljuju vrijeme procesa izolacije te kako bi se osigurali bolji i brži protoci uzoraka kroz sustav za izolaciju IgG-a, bilo je potrebno uspostaviti novi način za izolaciju IgG-a za slučajeve kada se radi o uzorcima velikog početnog volumena. Stavljanje CIM Protein G disk monolitne kolone na kromatografski sustav za pročišćavanje proteina ÄKTA avant 25 omogućilo je da se proces izolacije IgG-a iz početnih uzoraka velikih volumena gotovo u potpunosti automatizira te da se osiguraju dobri protoci uzorka kroz kolonu te prihvatljivo vrijeme izolacije IgG-a iz uzorka. Proces izolacije IgG-a pomoću ÄKTA avant 25 kromatografskog sustava iz uzorka

volumena 50 mL traje 1 sat i 15 min po uzorku. Uz odabrane brzine protoka, vrijeme trajanja procesa najviše je uvjetovano volumenom uzorka.

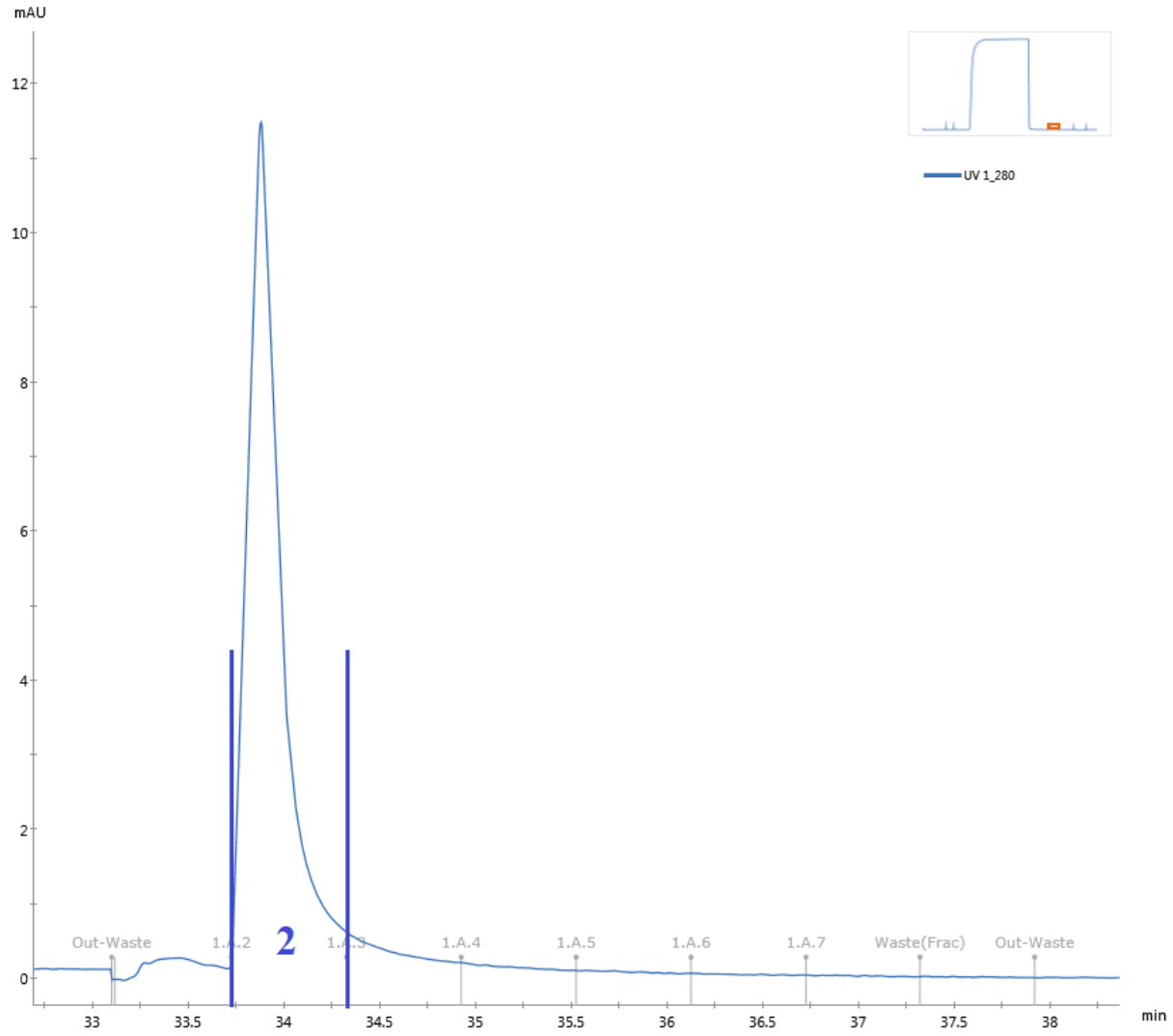
CIM Protein G disk monolitna kolona je izabrana za izolaciju IgG-a iz razloga što se isti princip izolacije IgG-a (protein G vezan za monolit), ali u obliku pločice već koristi za izolaciju IgG-a za potrebe analize glikozilacije IgG-a (Pučić i sur., 2011), što je između ostalog osiguralo da puferi koji se koriste pri eluiranju IgG-a i neutralizaciji eluata IgG-a budu prikladni za nizvodni dio procesa analize glikozilacije IgG-a.

Iako je metoda za izolaciju IgG-a pomoću CIM Protein G disk monolitne kolone na ÄKTA avant 25 instrumentu napravljena prema već postojećoj metodi za izolaciju IgG-a na protein G monolitnoj pločici (Pučić i sur., 2011) i uputama proizvođača CIM Protein G disk monolitne kolone (BIA Separations), pojedine dijelove metode bilo je potrebno dodatno optimizirati. To se posebno odnosilo na korak eluiranja IgG-a. Volumen frakcija eluata je optimiran na način da se sva količina IgG-a eluira u jednoj frakciji kako bi konačni volumen eluata bio što manji, a uzorak IgG-a što koncentriraniji. Prvo je IgG eluiran s kolone u frakcijama od 400 μL mravlje kiseline (Slika 8.) te je u tom slučaju bilo potrebno prikupiti barem dvije frakcije (frakcija broj 2 i 3) kako bi se prikupio sav IgG. Ukupni volumen eluata IgG-a nakon neutralizacije sa 136 μL amonijeva bikarbonata iznosio je 936 μL.



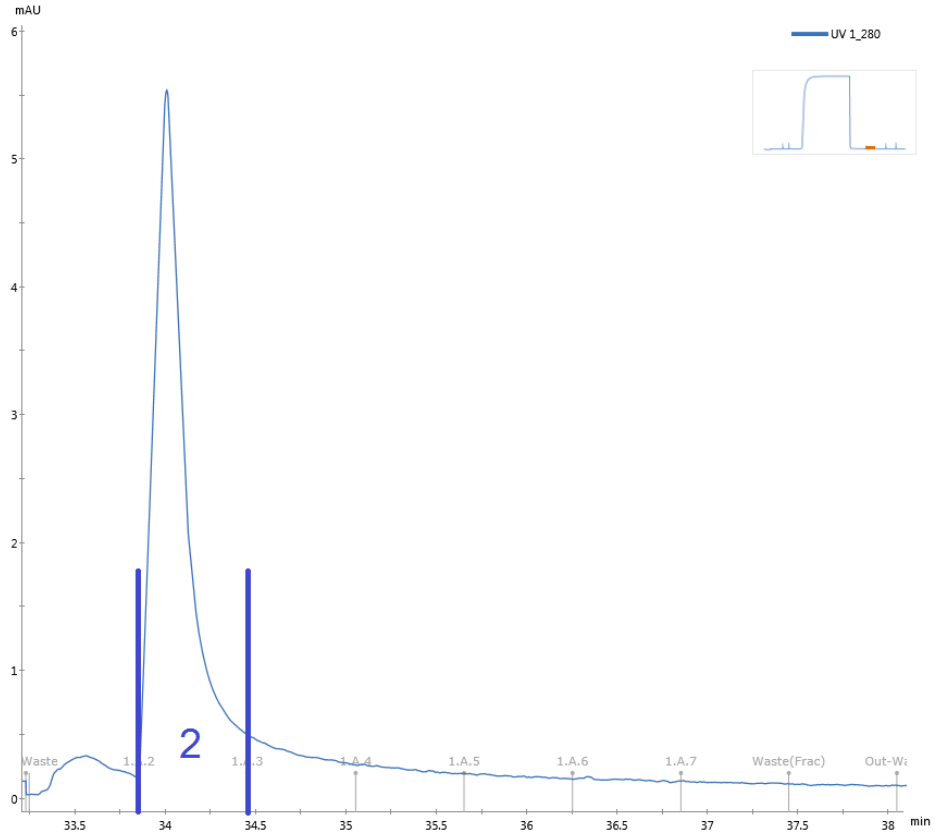

**Slika 8. Prikaz eluacije IgG-a iz početnog uzorka količine 1 µg IgG-a u 50 mL medija-grafički prikaz ovisnosti apsorpcije pri 280 nm o vremenu.** Volumen frakcija eluata iznosio je 400 µL, a prve tri frakcije označene su brojevima 1, 2 i 3.

Zatim je metoda podešena na način da je IgG eluiran u frakcijama od po 600 µL mravlje kiseline. U tom slučaju bilo je moguće u jednoj frakciji (frakcija broj 2) prikupiti gotovo svu količinu IgG-a vezanu na kolonu (Slika 9.). Ukupni volumen eluata IgG-a nakon neutralizacije sa 102 µL amonijeva bikarbonata iznosio je 702 µL.

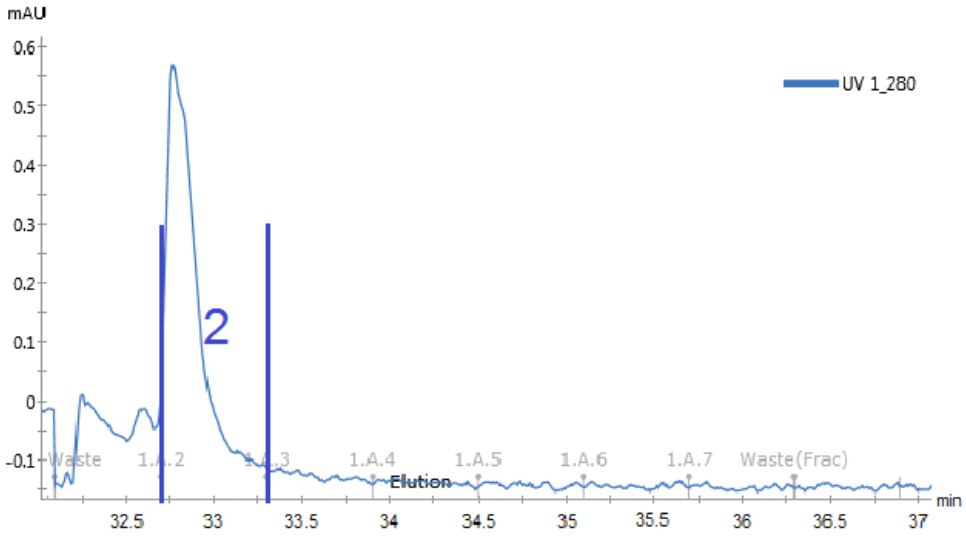



**Slika 9. Prikaz eluacije IgG-a nakon optimizacije volumena frakcija iz početnog uzorka količine 3 µg IgG-a u 50 mL medija - grafički prikaz ovisnosti apsorpcije pri 280 nm o vremenu**. Volumen frakcija iznosio je 600 µL, a frakcija u kojoj je sakupljen eluirani IgG označena je s „2“.

Bitno je napomenuti da se i u slijepoj probi uzorka (50 mL medija bez dodatka IgG-a) očitao signal koji po vremenu eluiranja odgovara signalu očitanom i u ostalim uzorcima (u istoj frakciji), ali je manjeg intenziteta (Slika 10). Uočeno može biti posljedica prisustva malih količina IgG-a u samom mediju ili nespecifičnog vezanja ostalih komponenti medija na kolonu koje se eluiraju kada i IgG. Osim toga, praćenjem eluacije nakon nanošenja uzorka od 50 mL 1XPBS-a također je uočena pojava signala u identičnoj frakciji, ali je intenzitet 10 puta manji nego kada je na kolonu naneseno 50 mL staničnog medija (Slika 11).

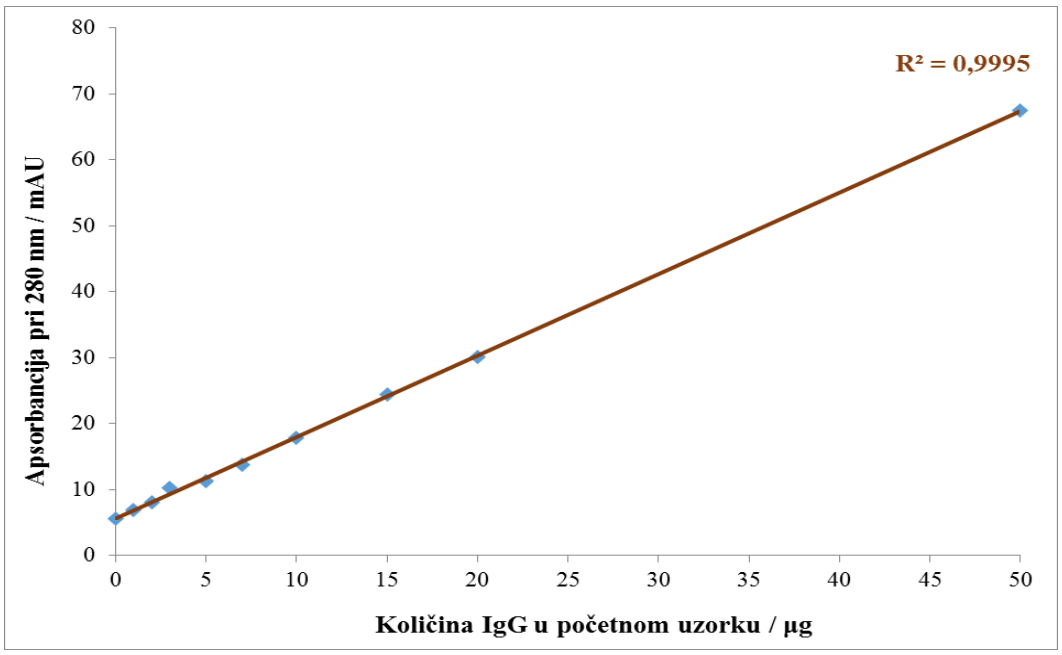



**Slika 10. Prikaz eluacije slijepe probe uzorka (50 mL medija bez IgG-a) - grafički prikaz ovisnosti apsorpcije pri 280 nm o vremenu.** Volumen frakcija iznosio je 600 µL, a frakcija u kojoj je očitan signal označena je s „2“. Označena frakcija odgovara frakciji u kojoj je sakupljen eluirani IgG u ostalim uzorcima.



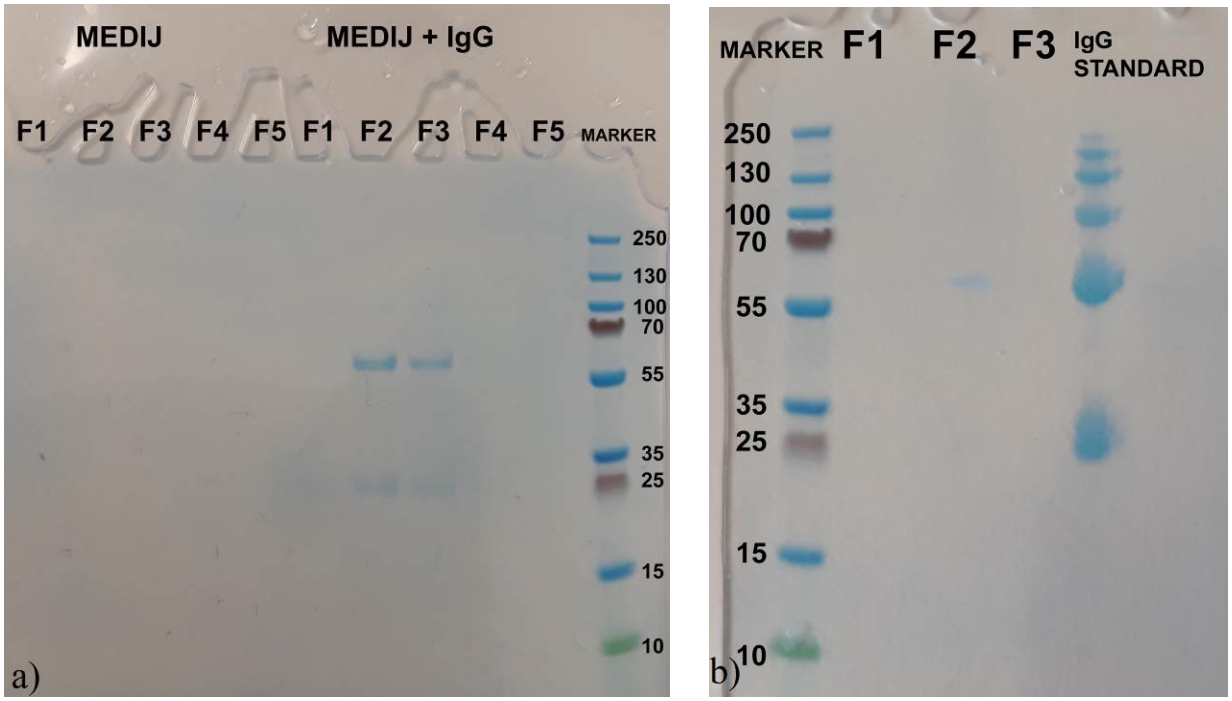

**Slika 11. Prikaz eluacije nanon nanošenja uzorka od 50 mL 1XPBS-a - grafički prikaz ovisnosti apsorpcije pri 280 nm o vremenu.** Volumen frakcija iznosio je 600 µL, a frakcija u kojoj je očitan signal označena je s „2“. Označena frakcija odgovara frakciji u kojoj je sakupljen eluirani IgG u ostalim uzorcima.

CIM protein G disk sadrži protein G vezan za monolit. Proizvođač CIM protein G diska tvrdi da isti ima kapacitet vezanja ≥ 10 mg IgG/ mL monolita, što bi značilo da disk volumena 0,34 mL može vezati čak 3,4 mg IgG-a. Prilikom izolacije malih količina IgG-a (1 – 50 µg) na CIM protein G disk monolitnoj koloni uočena je linearna ovisnost visine pika apsorbancije na 280 nm nakon eluiranja IgG-a s kolone o količini imunoglobulina G u početnom uzorku što pokazuje kako je CIM protein G disk dobar i za izolaciju malih količina IgG-a (Slika 12.).




**Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti izmjerene apsorbancije pri 280 nm nakon eluiranja IgG-a s kolone o količini IgG-a u početnom uzorku**

Uspješnost izolacije IgG-a, osim mjerenjem apsorbancije na 280 nm, pokazana je i SDS-PAGE-om (Slika 13.). U frakcijama 2 i 3 dobivenim sakupljanjem frakcija od 400 µL uočene su dvije vrpce, u visini markera veličine 55 i 25 kDa koje odgovaraju teškom i lakom lancu IgG-a (slika 13.a). U ostalim frakcijama, kao i u frakcijama dobivenim pročišćavanjem čistog medija (bez dodatka IgG-a), nije bilo vidljivo prisustvo IgG-a. U frakciji 2 dobivenoj sakupljanjem frakcija volumena 600 µL dokazana je prisutnost IgG (slika 13.b). Rezultati SDS-PAGE-a u skladu su i potvrđuju rezultate uspješnosti izolacije IgG-a praćene mjerenjem apsorbancije nakon eluiranja IgG-a. Objema metodama je, dakle, dokazano da se u odabranim frakcijama nalazi izolirani IgG.

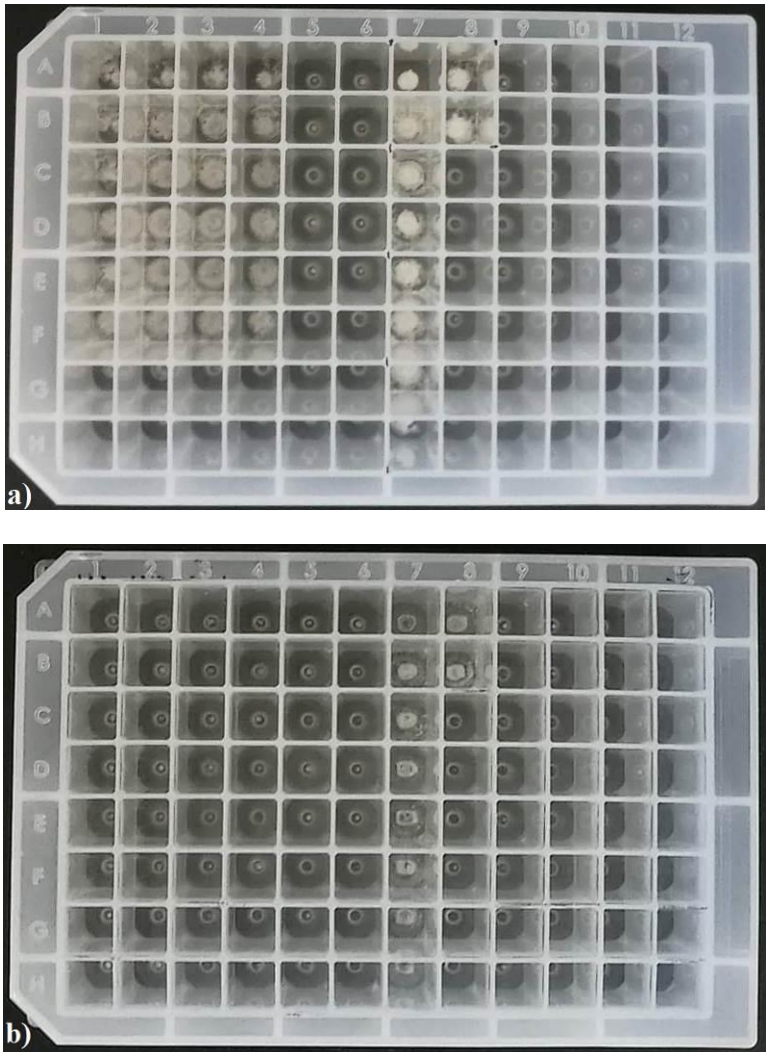



**Slika 13. SDS-PAGE frakcija prikupljenih prilikom pročišćavanja IgG-a afinitetnom kromatografijom pomoću CIM r-Protein G disk monolitne kolone na kromatografskom sustavu ÄKTA avant 25** a) alikvoti (100 µL) frakcija volumena 400 µL dobivenih pročišćavanjem početnog uzorka količine IgG-a 40 µg; b) alikvoti frakcija (100 µL) volumena 600 µL dobivenih pročišćavanjem početnog uzorka količine IgG-a 10 µg. F = frakcija, MARKER=standard veličine proteina (kDa)

### 4.2. Utjecaj soli na CGE-LIF analizu APTS-om obilježenih glikana izoliranog IgG-a

S obzirom da se u ovom radu želi ispitati mogućnost dobivanja profila IgG glikana u slučajevima kada početni uzorak sadrži ukupne količine IgG-a od svega 1-10 µg (prisutnih unutar velikog volumena), metoda analize N-glikana kapilarnom gel elektroforezom s laserski potpomognutom fluorescencijom odabrana je jer je manje analitički zahtjevna i osjetljivija. Odabrana metoda analize glikana izoliranog IgG-a, kao i preparativni koraci koji joj prethode, optimirani su na uzorcima IgG-a izoliranog iz seruma/plazme. Prosječna koncentracija IgG-a izoliranog iz plazme korištenog u ovom radu iznosila je 0,6 mg/mL što znači da je za postizanje optimalne početne količine IgG za CGE-LIF analizu od 10 µg (prema Huffman i sur., 2014) potrebno svega 16,7 µL IgG-a izoliranog iz plazme, što je više od 40 puta manji volumen od onog u kojem su se nalazili uzorci nakon izolacije na ÄKTI. Manji volumen, naravno, podrazumijeva i manju količinu soli u uzorku. S obzirom da se nakon izolacije na ÄKTI IgG nalazio u 702 µL amonijevog formijata, bilo je potrebno provjeriti učinak soli na nizvodne procese pripreme uzorka za analizu CGE-LIF-om i samu analizu uzoraka. Ispitivanje

utjecaja prisutnosti soli na CGE-LIF analizu APTS-om obilježenih glikana provedeno je na uzorcima koji simuliraju eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG-a na ÄKTI, a koji su pripremljeni na način da je u 700 µL amonijeva formijata dodana količina IgG-a od 1, 2, 3, 5, 7 i 10 µg. Talog soli uočen nakon sušenja uzoraka (Slika 14.a) za potrebe daljnjih postupaka (deglikozilacije, obilježavanja glikana) ometa daljnju analizu budući je toliku količinu taloga često gotovo nemoguće otopiti u svega 3 µL 1XPBS-a (i 4 µL SDS-a ) čime započinje priprema uzorka za deglikozilaciju (Slika 14.).




**Slika 14. Prikaz uzoraka osušenih u vakuum centrifugi a) prije i b) poslije odsoljavanja hladnim metanolom**

Ispitivanje utjecaja prisutnosti soli na CGE-LIF analizu APTS-om obilježenih glikana provedeno je na uzorcima koji simuliraju eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG-a na ÄKTI, a koji su pripravljeni na način da je u 700 μL amonijeva formijata dodana količina IgG-a od 1, 2, 3, 5, 7 i 10 μg.

Kako bi se vidjelo imaju li soli negativni utjecaj na nizvodne procese analize glikozilacije izoliranog IgG-a, proveden je eksperiment u kojem je uspoređena kvaliteta elektroferograma dobivenih analizom uzoraka koji nisu podvrgnuti odsoljavanju i onih koji su odsoljeni pomoću hladnog metanola, pomoću Amicon sustava za ultrafiltraciju i pomoću MF-Millipore membranskog filtra.

Dobiveni elektroferogrami uzoraka analiziranih u duplikatu međusobno su uspoređeni prema broju pikova koje je moguće vidjeti u profilu, pri čemu veći broj razlučenih pikova označava bolji rezultat, tj. bolji profil glikana. Broj pikova koji su vidljivi u profilu odabran je kao kriterij bolje osjetljivosti metode i za usporedbu kvalitete profila IgG glikana iz razloga što je u dva uzorka različitog intenziteta bilo moguće vidjeti jednak broj pikova, zbog čega se smatra da sami intenziteti ne daju dovoljno informacija o osjetljivosti metode i kvaliteti elektroferograma. Profil glikana IgG-a izoliranog iz plazme (Slika 3.) sadrži 28 pikova od kojih je za usporedbu uzoraka odabrano 20 najviših pikova koji odgovaraju 20 najzastupljnijih glikanskih struktura u profilu glikana IgG-a. Za pojedini je uzorak zabilježen broj pikova od navedenih 20 koji su prisutni u elektroferogramu, a ukoliko su bili prisutni i ostali pikovi, broj prisutnih pikova u uzorku je zabilježen kao „>20“ (Tablica 3).

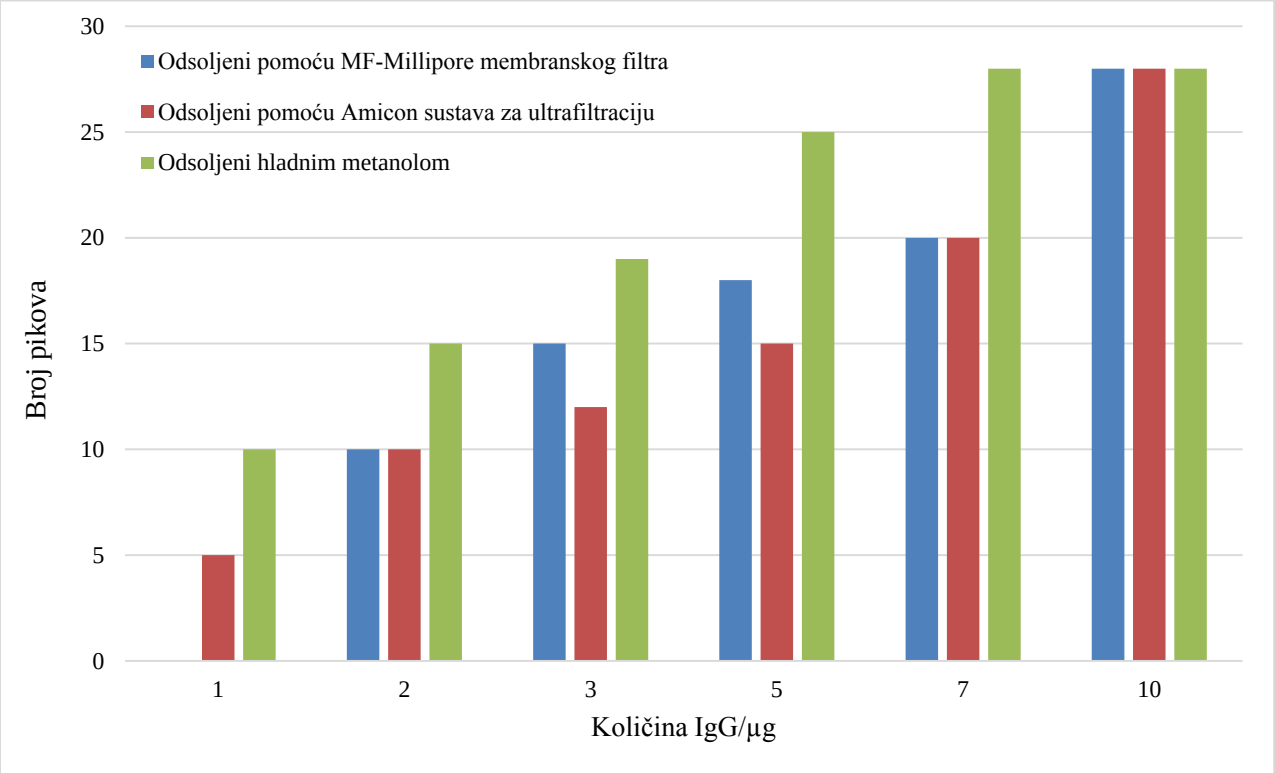
Utvrđeno je da kod malih koncentracija IgG-a (1, 2, 3, 5 μg), odsoljavanje donosi značajno poboljšanje u broju vidljivih pikova u elektroferogramu s razlikom od barem 5 dodatnih vidljivih pikova. Iako je u uzorku s 10 μg IgG-a moguće dobiti 20 pikova i bez odsoljavanja, uočeno je da se nasumično u nekim neodsoljenim uzorcima s manjom količinom IgG-a dogodio potpuni izostanak profila glikana (profili nalik na slijepu probu), što nije uočeno kod odsoljenih uzoraka. Mogućnost dobivanja i kvaliteta dobivenog elektroferograma vjerojatno ovisi o kombinaciji više faktora, poput kombinacije količine analita u uzorku te količine soli.

**Tablica 3. Prosječni broj vidljivih pikova u elektroferogramima dobivenim analizom uzoraka (koji simuliraju eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG-a na ÄKTI) koji nisu odsoljeni i uzoraka odsoljenih pomoću hladnog metanola, pomoću Amicon sustava za ultrafiltraciju te pomoću MF-Millipore membranskog filtra.** Uzorci su analizirani u duplikatu, a brojevi navedeni u tablici prikazuju prosječan (srednja vrijednost) broj pikova u ovisnosti o količini IgG-a i tretmanu (neodsoljavanje i odsoljavanje).

| | Broj vidljivih pikova | | | |
|---|---|---|---|---|
| Količina IgG u 700 μL amonijeva formijata/ μg | Neodsoljeni uzorci | Uzorci odsoljeni hladnim metanolom | Uzorci odsoljeni pomoću Amicon sustava za ultrafiltraciju | Uzorci odsoljeni pomoću MF-Millipore membranskog filtra |
| 1 | 5 | 14 | 5 | 0 |
| 2 | 12 | 15 | 10 | 10 |
| 3 | 12 | 19 | 12 | 15 |
| 5 | 15 | >20 | 15 | 18 |
| 7 | 20 | >20 | 20 | 20 |
| 10 | >20 | >20 | >20 | >20 |

Metode odsoljavanja (hladnim metanolom, Amicon sustavom za ultrafiltraciju i MF-Millipore membranskim filtrom) međusobno su uspoređene prema broju pikova vidljivih u elektroferogramu (Tablica 3.), tj. najmanjoj količini IgG-a u početnom uzorku potrebnoj za dobivanje elektroferograma koji sadrži 20 pikova (Slika 15.). Ponajprije, uočeno je kako CGE-LIF analiza koja je uslijedila nakon svake od metoda odsoljavanja, nije rezultirala zadovoljavajućim rezultatima za početnu količinu IgG-a od 1 μg pri čemu je najlošije rezultate dala metoda odsoljavanja pomoću MF-Millipore membranskog filtra (0 razlučivih pikova). Porastom količine IgG-a raste i broj razlučivih pikova za svaku od metoda odsoljavanja, ali različitim trendom promjene. Može se primijetiti kako pri koncentraciji od 10 μg IgG-a svaka od metoda daje zadovoljavajući elektroferogram sa više od 20 prisutnih pikova. Kod primjene metode odsoljavanja pomoću hladnog metanola moguće je dobiti zadovoljavajući elektroferogram već sa 3 μg (19 vidljivih pikova), a više od 20 pikova se sigurno može dobiti sa 5 μg. Nasuprot tome, zadovoljavajući elektroferogram (20 vidljivih pikova) dobije se kod 7 μg, odnosno više od 20 pikova tek kod 10 μg IgG-a za preostale dvije metode odsoljavanja (Amicon sustav za ultrafiltraciju i MF-Millipore membranski filter). Manja osjetljivost može biti posljedica gubitka proteina iz uzorka uslijed nespecifičnog vezanja na membranu pojedinog sustava. Uspoređujući metode prema broju prepoznatljivih pikova u elektroferogramima prema koncentraciji IgG u početnom uzorku vidljivo je kako odsoljavanje

metanolom daje najbolje rezultate budući se zadovoljavajući profil glikana (20 vidljivih pikova) dobije sa manjom količinom IgG-a nego sa ostalim metodama.




**Slika 15. Prosječni broj pikova vidljivih u elektroferogramu za pojedinu metodu odsoljavanja prema količini IgG-a u uzorku koji simulira eluat IgG-a dobiven nakon izolacije IgG-a na ÄKTI.**

Osim po broju pikova, metode odsoljavanja možemo usporediti i po kvaliteti/čistoći dobivenog elektroferograma, kako međusobno, tako i sa standardom i slijepom probom. Za metodu odsoljavanja pomoću hladnog metanola ponovno je uočeno da eventualne male interferencije, prisutne u prvom dijelu elektroferograma, prestaju biti uočljive/smetati već kod količine od 3 µg IgG-a. Elektroferogrami uzoraka početne količine IgG-a od 3, 5, 7 i 10 µg zadovoljavajuće su kvalitete, intenziteta i broja pikova. Slično, interferencije prisutne u prvim pikovima u elektroferogramu dobivenom analizom uzoraka odsoljenih pomoću MF-Millipore membranskog filtra nisu jako izražene i prestaju smetati kod količine IgG-a od 5 µg. Elektroferogrami uzoraka početne količine IgG-a od 7 i 10 µg zadovoljavajuće su kvalitete, intenziteta i broja pikova. Suprotno tome, u elektroferogramu dobivenom analizom uzoraka odsoljenih pomoću Amicon sustava za ultrafiltraciju uočene su intenzivne interferencije,

poglavito u prvom dijelu elektroferograma (2., 3., 4., 12. piku), ali i u drugom dijelu (u 26. piku) pri čemu je visina pika interferencije veća od visine inače najvećeg pika u elektroferogramima za količine IgG-a 1, 2, 3 i 5 μg. Spomenute interferencije vidljive su i u uzorku slijepe probe koji je prošao jednak tretman sustavom Amicon. Iako su po broju pikova zadovoljavajući, u elektroferogramima dobivenima kod količine od 7 i 10 μg IgG-a interferencije i dalje ometaju interpretaciju pikova mijenjajući udjele visine pikova. S obzirom da je membrana Amicon sustava za ultra centrifugiranje građena od regenerirane celuloze, postoji mogućnost da vidljive interferencije potječu od celuloze iz membrane. Osim toga, proizvođač upozorava na prisutnost ostataka glicina u sustavu te preporuča da se sustav ispere ultra-čistom vodom prije daljnje analize, što je i učinjeno, ali nije imalo značajan učinak u smislu smanjenja interferencija.

Budući da rezultira zadovoljavajućim profilom glikana pri manjoj količini IgG-a te je elektroferogram bolje kvalitete/čistoće nego kod ostalih metoda, izabrana je metoda odsoljavanja pomoću hladnog metanola koja je primjenjivana dalje kroz eksperiment. Osim toga što daje najbolje profile glikana s obzirom na broj vidljivih pikova, odsoljavanje hladnim metanolom metoda je izbora jer je jeftinija, pristupačnija, jednostavnija za izvođenje te manje vremenski zahtjevna od preostalih ispitanih metoda.

Ako se usporede intenziteti pikova pojedinih uzoraka odsoljenih hladnim metanolom i neodsoljenih uzoraka, uočeno je kako je intenzitet pikova u elektroferogramima uzoraka svih količina IgG koji su odsoljeni barem tri puta veći od intenziteta uzoraka koji nisu odsoljeni (rezulatati nisu prikazani). Pritom treba naglasiti da su uzorci bili prisutni u duplikatu te raspoređeni na pločicu na način da se uzorak određene količine IgG, odsoljen ili neodsoljen, uvijek vozi na istoj kapilari kako bi usporedivost intenziteta bila što veća. Nadalje, praćenjem izgleda elektroferograma pojedinog uzorka usporedbom sa slijepom probom i standardom IgG glikana, uočena je prisutnost interferencija (dodatnih pikova), poglavito u prvom dijelu elektroferograma, do 10. pika. Osim toga, uočeno je kako su interferencije izraženije kod manjih količina IgG-a (vidljivije kod manjih intenziteta, kod većih intenziteta puno manjim udjelom sudjeluju u piku pa su i manje vidljive ili nisu vidljive) te ih je više zastupljeno kod uzoraka koji nisu odsoljeni u odnosu na odsoljene. Kod neodsoljenih uzoraka, interferencije su vidljive sve do količine IgG-a od 7 μg, dok kod odsoljenih uzoraka prisutne interferencije prestaju smetati kod količine od 3 μg.

Uzorci male količine IgG-a u 700 μl amonij formijata (koji odgovaraju uzorcima izoliranim na ÄKTI) su nakon odsoljavanja hladnim metanolom prolazili kroz postupke (deglikozilacija,

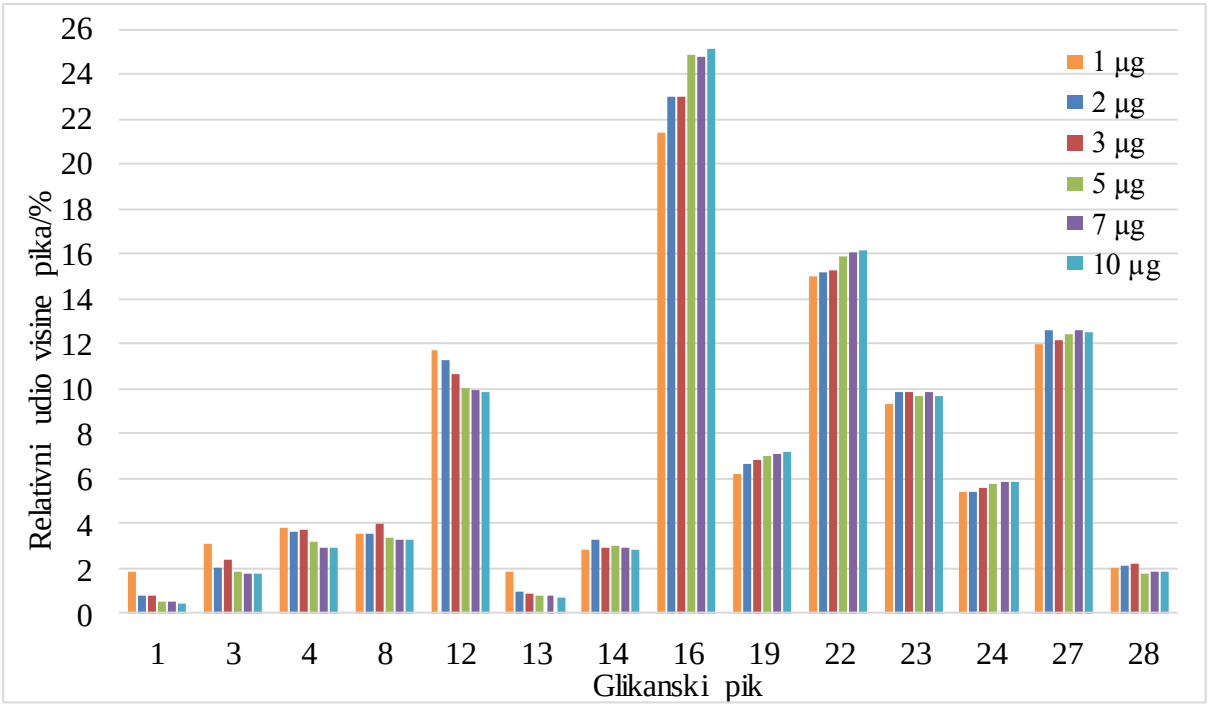
obilježavanje APTS-om, analiza CGE-LIF-om) koji su zapravo optimizirani na uzorcima dobivenim izolacijom IgG-a iz plazme. Stoga su elektroferogrami dobiveni analizom uzoraka u kojima se mala količina IgG-a (1-10 μg) nalazila u 700 μl amonij formijata te koji su odoljeni hladnim metanolom uspoređeni (prema broju vidljivih pikova) sa elektroferogramima dobivenima analizom uzoraka koji su sadržavali iste količine IgG-a (1-10 μg), ali koji su zapravo predstavljali alikvot od uzorka IgG-a izoliranog iz plazme i koncentracije od oko 0,6 μg/μL (Tablica 4.). Tako je na primjer profil glikana dobiven analizom 1 μg IgG-a u 700 μl amonij formijata i koji je odsoljen hladnim metanolom uspoređen sa 1 μg IgG-a koji se nalazio u volumenu od 1,7 μl amonij formijata i koji nije odsoljen. Vidljivo je kako je iz IgG-a izoliranog iz plazme moguće dobiti zadovoljavajući elektroferogram (20 vidljivih pikova) sa početnom količinom IgG-a od 1 μg, dok je u uzorcima nakon odsoljavanja metanola zadovoljavajući elektroferogram moguće dobiti sa 3-5 μg. Nadalje, kada se elektroferogrami usporede prema intenzitetu signala, uočeno je da je za istu početnu količinu IgG-a u elektroferogramima uzoraka IgG-a izoliranog iz plazme intenzitet otprilike 3 puta veći od intenziteta u elektroferogramima uzoraka odsoljenih metanolom.

**Tablica 4. Broj vidljivih pikova u elektroferogramima dobivenim analizom uzoraka (koji simuliraju eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG-a na ÄKTI) odsoljenih pomoću hladnog metanola (u duplikatu) i uzorka IgG-a izoliranog iz plazme.**

| | Broj vidljivih pikova | |
|---|---|---|
| Početna količina IgG/ μg | Uzorci odsoljeni hladnim metanolom | Uzorci IgG-a izolirani iz plazme |
| 1 | 14 | 20 |
| 2 | 15 | 20 |
| 3 | 19 | >20 |
| 5 | >20 | >20 |
| 7 | >20 | >20 |
| 10 | >20 | >20 |

U elektroferogramima dobivenim analizom duplikata uzoraka odsoljenih metanolom i kombiniranih uzoraka IgG-a izoliranog iz plazme provedena je integracija 14 zajedničkih pikova kako bi se okarakterizirala usporedivost dobivenih profila glikana ovisno o početnoj količini IgG-a. U uzorcima odsoljenim metanolom uočene su velike varijacije u relativnim udjelima visine pojedinih pikova u ovisnosti o početnoj količini IgG-a (Slika 16.). U pripadajućim elektroferogramima uzoraka malih količina IgG-a relativni udio malih pikova

veći je od onog u elektroferogramima koji odgovaraju uzorcima većih količina IgG-a. Također, kod analize malih količina IgG-a, tj. glikana, signal bazne linije može ometati interpretaciju malih pikova. Vidljivo je da se visina manjih pikova smanjuje, a visina većih pikova povećava s povećanjem početne količine IgG-a. Varijacija profila uzoraka različite količine IgG-a odsoljenih metanolom manja je u drugom dijelu elektroferograma, odnosno u pikovima 19. – 28. Također, može se primijetiti kako je varijacija u relativnim udjelima visine pojedinih pikova profila uzoraka s 5, 7 i 10 µg vrlo mala, tj. da je ponovljivost profila dobra pa izgled profila u tom slučaju ne ovisi o količini IgG-a.




**Slika 16. Grafički prikaz relativnih udjela visine pojedinog pika u elektroferogramima dobivenih CGE-LIF analizom uzoraka koji simuliraju eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG-a na ÄKTI nakon odsoljavanja metanolom.** Uzorci svake odgovarajuće količine IgG-a su analizirani u duplikatu te su prikazane srednje vrijednosti za svaki duplikat.

U elektroferogramima dobivenima uzoraka IgG-a izoliranih iz plazme različitih početnih količina može se, generalno, uočiti bolja međusobna usporedivost nego u uzorcima odsoljenim metanolom (Prilog 2.).

Nadalje, međusobnom usporedbom relativnih udjela visine pojedinih glikanskih pikova dobivenih CGE-LIF analizom duplikata uzoraka IgG-a početne količine 1, 2, 3, 5, 7 i 10 µg u

700 µL amonijeva formijata nakon odsoljavanja metanolom, uočeno je da većina pikova (njih 10) ima koeficijent varijacije (CV) relativnog udjela visine pika manji od 10 % (Prilog 1.). Pritom 5 pikova ima CV manji od 5 % što odgovara prethodno opisanom grafičkom prikazu. Koeficijent varijacije veću od 15% imaju svega tri pika, od kojih 1. i 13. pik imaju relativni udio visine pika manji od 1 %. U prilog bolje međusobne usporedivosti profila unutar uzoraka IgG-a izoliranih iz plazme nego unutar uzoraka odsoljenih metanolom govore i izračunati koeficijenti varijacija relativnih udjela visine pika 14 integriranih pikova (Prilog 3.). Vidljivo je da većina pikova profila dobivena iz uzoraka IgG-a izoliranog iz plazme ima CV manji od 5%, čak njih 9 u odnosu na 4 kod uzoraka odsoljenih metanolom. Samo jedan pik, 1. pik, ima CV veći od 15% što sveukupno ukazuje na vrlo dobro slaganje profila glikana ovisno o početnoj količini IgG-a u uzorcima IgG-a izoliranog iz plazme.

Kako bi se dodatno ispitao utjecaj volumena pufera amonijevog formijata u kojem se nalazi IgG nakon izolacije, tj. utjecaj soli prisutnih nakon sušenja eluata IgG-a, proveden je eksperiment u kojem su se količine IgG-a od 1-10 µg nalazile u različitom volumenu amonijevog formijata (50 – 700 µL). U ovom eksperimentu uzorci nakon sušenja nisu odsoljavani. Nakon analize kapilarnom gel elektroforezom, dobiveni elektroferogrami uspoređeni su po kriteriju broja vidljivih pikova (Tablica 5.). Uočeno je da volumen amonijeva formijata i soli preostale nakon odsoljavanja utječu na kvalitetu elektroferograma i to na način da se povećanjem udjela soli u uzorku smanjuje broj pikova vidljivih u elektroferogramu, ali i kvaliteta/čistoća elektroferograma. Vidljivo je da je pri većim količinama IgG-a negativni utjecaj prisutnih soli na kvalitetu elektroferograma manji, dok je pri nižim količinama IgG-a negativni utjecaj veoma izražen i može rezultirati upola manjim brojem vidljivih pikova u odnosu na istu količinu IgG-a u prisutnosti manje količine soli. Na primjer, elektroferogram sa >20 vidljivih pikova moguće je dobiti iz uzoraka koji sadrže 5 µg IgG-a u 50 i 100 µL amonij formijat pufera, dok to nije moguće u uzorcima jednake količine IgG-a, a većeg volumena amonijeva formijata. Osim smanjenja broja pikova, problem predstavlja i porast u količini/intenzitetu interferencija s porastom udjela soli u uzorku koje ometaju interpretaciju poglavito prvog dijela elektroferograma i značajno utječu na relativni udio visine pikova, naročito onih manjih.

**Tablica 5. Broj pikova vidljivih u elektroferogramima uzoraka koji sadrže 1, 2, 3, 5, 7 i 10 μg IgG-a u 50 – 700 μL amonij formijata odsoljenih hladnim metanolom u ovisnosti o volumenu amonijeva formijata.**

| | Količina IgG-a/μg | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Volumen amonij formijata/μL | 1 | 2 | 3 | 5 | 7 | 10 |
| 50 | 12 | 12 | 15 | >20 | >20 | >20 |
| 100 | 12 | 12 | 15 | >20 | >20 | >20 |
| 200 | 8 | 12 | 12 | 15 | >20 | 20 |
| 300 | 8 | 8 | 8 | 15 | 15 | 20 |
| 400 | 8 | 5 | 12 | 20 | 20 | >20 |
| 500 | 12 | 12 | 15 | 20 | 20 | 20 |
| 600 | 8 | 8 | 12 | 15 | 15 | 20 |
| 700 | 8 | 8 | 8 | 15 | 20 | 20 |

### 4.3. Učinak koncentriranja uzoraka na analizu

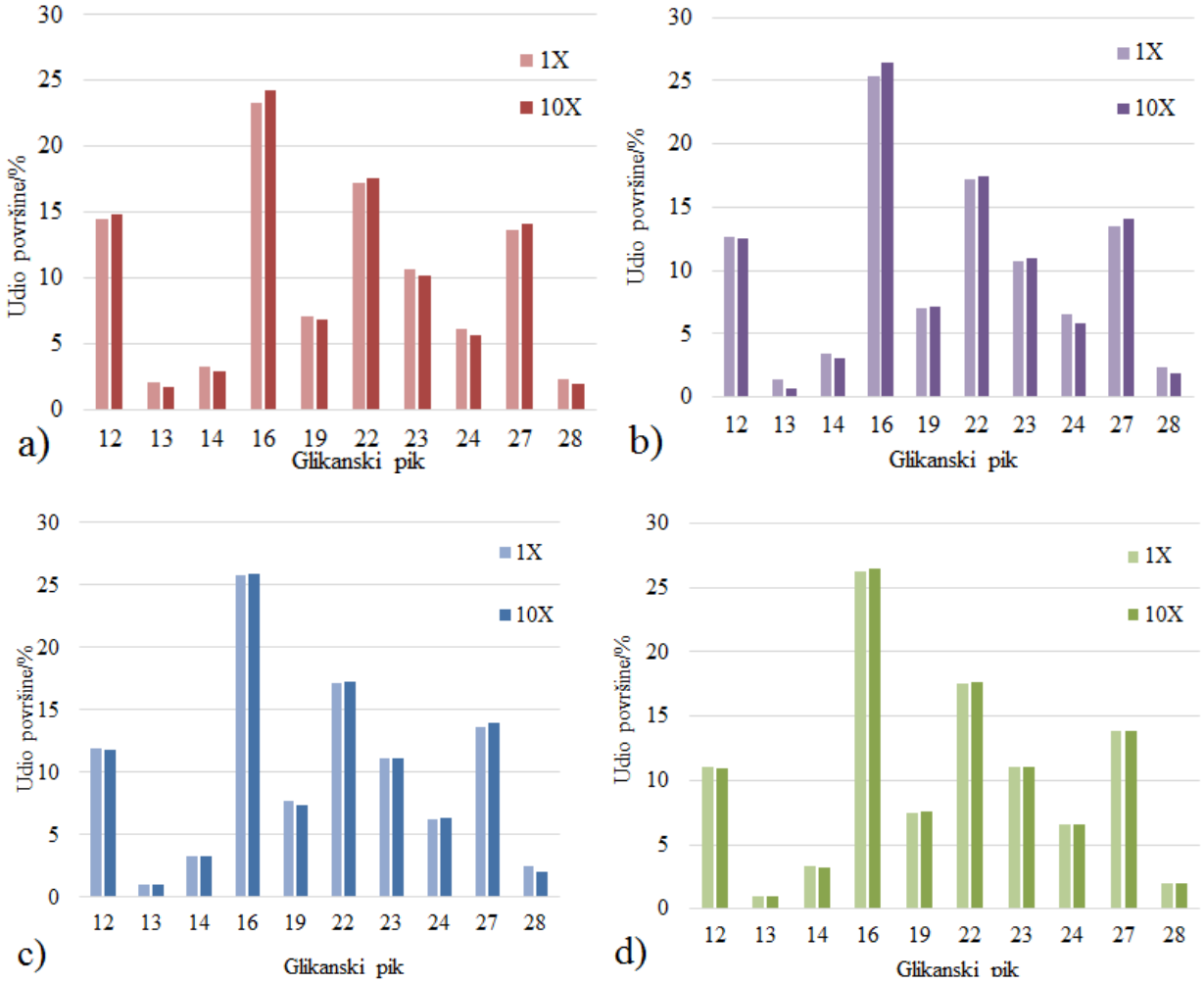
Nakon procesa HILIC SPE pročišćavanja, IgG glikani se nalaze u 400-500 μL ultra čiste vode od čega se alikvot od svega 3 μL uzima za analizu glikana kapilarnom gel elektroforezom. To znači da su u daljnju analizu uzeti glikani sa svega 7,5 ng, 15,0 ng, 22,5 ng i 37,5 ng IgG-a iz uzorka početne koncentracije 1, 2, 3 i 5 μg. Prema Huffman i sur., 2014 preporučena početna količina IgG-a iznosi 10 μg, što u alikvotu od 3 μL odgovara količini glikana sa 75 ng IgG-a. Budući da u većini slučajeva analiza alikvota od 3 μL kod uzoraka početne količine IgG od 1, 2 i 3 μg nije rezultirala zadovoljavajućim elektroferogramom, uzorci su ukoncentrirani 10 i 100 puta. S obzirom da su količine od 5 i 7 μg IgG-a rezultirale zadovoljavajućim elektroferogramom, koncentrirani su samo 10, ne i 100 puta, dok uzorke od 10 μg IgG-a nije bilo potrebe ukoncentriravati. Dobiveni elektroferogrami uspoređeni su unutar pojedine koncentracije prema intenzitetu i broju pikova (Tablica 6).

**Tablica 6. Maksimalni intenzitet i broj vidljivih pikova elektroferograma pojedinog izvornog uzorka koji simulira eluat IgG-a dobiven nakon izolacije IgG-a na ÄKTI te istog uzorka ukoncentriranog 10 i 100 puta.**

| | 1x | | 10x | | 100x | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Količina IgG/μg | Maksimalni intenzitet | Broj pikova | Maksimalni intenzitet | Broj pikova | Maksimalni intenzitet | Broj pikova |
| 1 | 50 | 14 | 250 | 18 | 350 | 18 |
| 2 | 100 | 15 | 500 | 19 | 660 | 20 |
| 3 | 200 | 19 | 850 | >20 | 1000 | >20 |
| 5 | 500 | >20 | 1500 | >20 | | |
| 7 | 800 | >20 | 2900 | >20 | | |

Uočeno je kako se ukoncentriravanjem prvotnih uzoraka 10 puta maksimalni intenzitet pikova u svakom od uzoraka poveća 4 do 5 puta. Ukoncentriravanje uzoraka čak 100 puta ne rezultira povećanjem intenziteta ni približno onom očekivanom od 100 puta, nego povećanje iznosi svega 5 do 7 puta. Nadalje, razlučivost pikova ukoncentriravanjem također raste pa se 20 pikova može dobiti s 3 μg IgG pri koncentriranju 10 puta, odnosno pri 2 μg prilikom koncentriranja 100 puta. Ukoliko se usporedi povećanje intenziteta koncentriranjem uzoraka 10 puta u odnosu na 100 puta primjećuje se kako unatoč desetorostrukoj razlici faktora ukoncentriravanja, razlika u povećanju intenziteta je svega 1 do 2 puta više prilikom ukoncentriravanja 100 puta u odnosu na 10 puta. Osim toga, vidljivo je kako ukoncentriravanje 100 puta ne rezultira znatno većim brojem razlučivih pikova u odnosu na koncentriranje 10 puta, već nasuprot, broj pikova ostaje isti ili se poveća za svega jedan. Nadalje, primijećeno je da ukoncentriravanjem od 100 puta nasumično dolazi do pogreške u putovanju standarda GeneScan 500 *LIZ* (razvučeni pikovi standarda LIZ ili potpuni izostanak standarda LIZ) koji je potreban za normalizaciju migracijskih vremena i integraciju pikova dobivenih profila vjerojatno zbog nagomilavanja soli i ostalih interferencija prilikom višestrukog ukoncentriravanja uzoraka koje ometaju analizu. Iz navedenih razloga ukoncentriravanje uzorka pripremljenih glikana IgG-a od 10 puta pokazalo se učinkovitije od ukoncentriravanja od 100 puta.

Usporedbom relativnih udjela visine pikova elektroferograma dobivenih analizom prvotnih i 10x koncentriranih uzoraka iste početne količine IgG-a (Slika 17.) uočena je zadovoljavajuća podudarnost među profilima ne- i koncentriranih uzoraka iste početne količine IgG-a.




**Slika 17. Grafički prikaz udjela površine glikanskih pikova dobivenih CGE-LIF analizom uzoraka (koji simuliraju eluat IgG-a dobiven nakon izolacije IgG-a na ÄKTI) nakon odsoljavanja hladnim metanolom te 10 puta ukoncentriranih istih uzoraka.** a) Uzorak količine 1 µg IgG, b) uzorak količine 2 µg IgG, c) uzorak količine 3 µg IgG, d) uzorak količine 7 µg IgG

### 4.4. Analiza uzoraka male količine IgG-a u velikom volumenu CGE-LIF metodom prema uspostavljenom protokolu

Nakon provedenih eksperimenata i optimiranja pojedinih segmenata protokola, uspostavljeni protokol u cijelosti je testiran na uzorcima IgG-a izoliranog iz uzoraka početne količine od 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 50 µg IgG-a u 50 mL Opti-MEM I medija i dobiveni rezulati su uspoređeni s rezulatima dobivenim analizom uzoraka od 1, 2, 3, 5, 7 i 10 µg IgG-a izoliranog iz plazme. Dobiveni elektroferogrami uzoraka međusobno su uspoređeni prema broju pikova koje je moguće vidjeti u profilu (Tablica 7.).

Uočeno je da najmanja početna količina IgG-a u uzorku medija koja je potrebna za očitanje signala različitog od signala slijepe probe iznosi 3 μg. U ovom slučaju, jednaka količina je dovoljna i za dobivanje elektroferograma sa 20 odabranih glikanskih pikova. Analizom istih količina IgG-a izoliranog iz plazme, signal različit od slijepe probe detektiran je i kod najmanje početne količine IgG-a od 1 μg. Elektroferogram u kojem je vidljivo više od 20 pikova moguće je dobiti analizom IgG-a izoliranog iz plazme početne količine od 3 μg te uzorka IgG-a izoliranog iz 50 mL medija početne količine 7 μg IgG-a. Obzirom da se alikvot od svega 3 μL obilježenih glikana uzima za CGE-LIF analizu, čini se kako je za dobivanje profila N-glikana, koji kvalitetom odgovara onom dobivenog iz uzorka plazme/seruma, dovoljna količina glikana koja potječe od 50 ng izoliranog IgG-a. Pritom treba naglasiti da se ne radi od početnoj količini IgG-a od 50 ng, nego o alikvotu IgG-a izoliranog iz uzorka veće početne količine (3 μg) IgG-a.

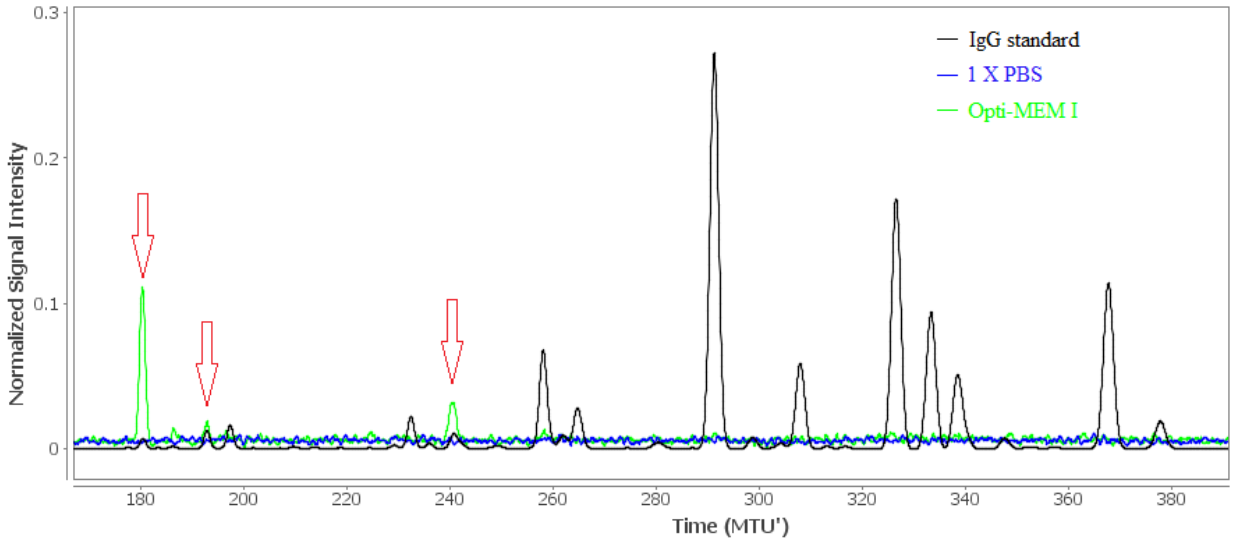
Kada su uzorci glikana obilježenih APTS-om IgG-a izoliranog iz 50 mL medija deseterostruko ukoncentrirani, signal različit od slijepe probe detektiran je u početnoj količini 1 μg IgG-a, ali intenziteti signala su bili niski i pikovi su se samo nazirali u profilu, dok je zadovoljavajući profil glikana (20 vidljivih pikova) dobiven iz uzorka početne količine 3 μg IgG-a.

**Tablica 7. Broj pikova vidljivih u elektroferogramima dobivenima CGE-LIF analizom uzoraka male količine IgG-a u velikom početnom volumenu medija izoliranih na ÄKTI (A) i deseterostruko ukoncentriranih istih (B), uzoraka koji simuliraju eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG-a na ÄKTI odsoljenih pomoću hladnog metanola (C) te uzoraka IgG-a izoliranog iz plazme (D).**

| | Broj vidljivih pikova | | | |
|---|---|---|---|---|
| Količina IgG/ μg | A | B | C | D |
| 1 | 0 | 4 | 14 | 20 |
| 2 | 0 | 11 | 15 | 20 |
| 3 | 20 | 20 | 19 | >20 |
| 5 | 19 | 20 | >20 | >20 |
| 7 | >20 | >20 | >20 | >20 |
| 10 | >20 | >20 | >20 | >20 |

Uvidom u elektroferograme dobivene CGE-LIF analizom uzoraka male količine IgG-a u velikom početnom volumenu medija izoliranih na ÄKTI utvrđena je prisutnost interferencije koja ometa interpretaciju prvog dijela elektroferograma. Budući je uočena smetnja najintenzivnija u 1., 2., 3., 4. i 10. piku, navedeni pikovi nisu uvršteni u integraciju (udjeli

visine ovih pikova nisu uspoređivani među uzorcima). Pri malim količinama IgG-a, 1 do 5 µg, intenzitet pika interferencije bio je veći od inače najvećeg glikanskog pika u elektroferogramu dobivenom CGE-LIF analizom. Da je interferencija porijeklom iz medija dokazano je propuštanjem 50 mL 1XPBS i 50 mL Opti-MEM I medija kromatografskim sustavom ÄKTA avant 25 i CGE-LIF analizom eluata. Usporedbom dobivenih elektroferograma s profilom IgG standarda (Slika 18.) uočena je pojava signala/pika u profilu eluata medija na mjestima koji odgovaraju 1, 3, 4, i 10 piku IgG standarda, dok u elektroferogramu eluata 1XPBS-a nije uočena pojava signala.



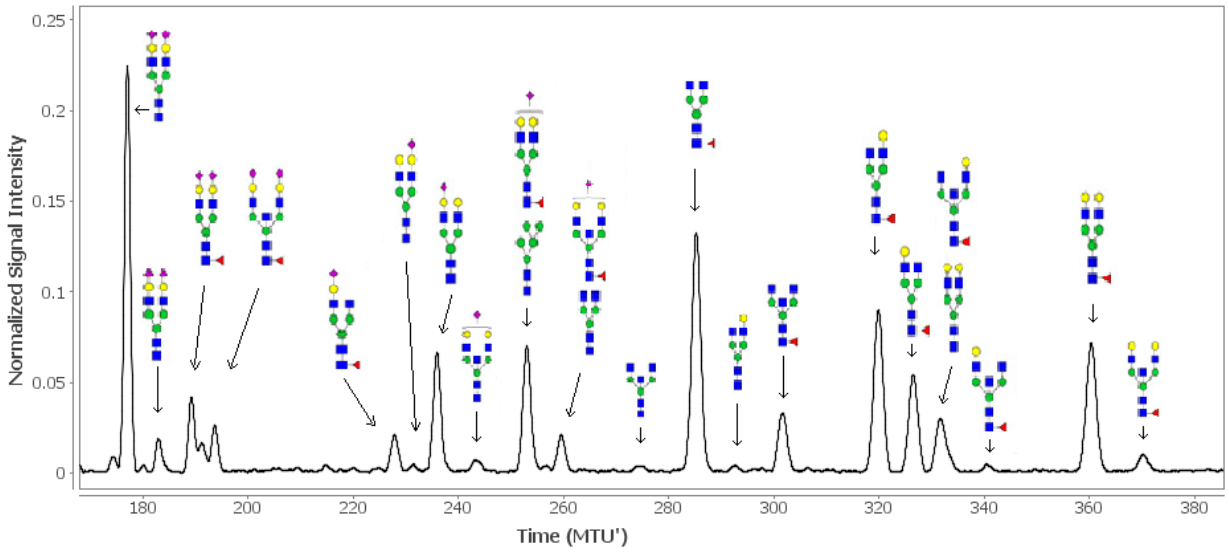

**Slika 18. Elektroferogrami APTS-om obilježenih N-glikana IgG-a dobivenih CGE-LIF analizom uzorka IgG-standarda (crno), eluata uzorka od 50 mL 1XPBS-a (plavo) i eluata uzorka od 50 mL Opti-MEM I medija (zeleno).** Crvenom strelicom označeni su pikovi u elektroferogramu Opti-MEM medija koji ometaju interpretaciju profila N-glikana izoliranog IgG-a.

U elektroferogramima dobivenim analizom uzoraka malih količina IgG-a u 50 mL Opti-MEM medija i uzoraka IgG-a izoliranog iz plazme provedena je integracija 14 zajedničkih pikova u svrhu provjere usporedivosti dobivenih profila glikana ovisno o početnoj količini IgG-a u uzorku te vrsti uzorka. U uzorcima količina IgG-a u 50 mL Opti-MEM medija uočena je dobra ponovljivost u većini pikova (Prilog 4.), pri čemu je izračunati koeficijent varijacije manji od 10 % za 11 pikova od kojih 5 ima CV manji od 5 % (Prilog 5.). Koeficijent varijacije relativnog udjela visine pika je za samo jedan pik veći od 15 %, a pritom valja naglasiti da se radio o piku sa relativnim udjelom visine pika manjim od 1 %. Ponovljivost profila u uzorcima

IgG-a izoliranog iz plazme (Prilog 6.) vrlo je dobra među uzorcima različite količine (1, 2, 3, 5, 7 i 10 µg) i bolja nego među uzorcima IgG-a izoliranog iz 50 mL medija. Uočeno potvrđuje i činjenica da čak 10 od integriranih 14 pikova ima CV relativnog udjela visine pika manji od 5 %, odnosno 2,5 % (Prilog 7.).

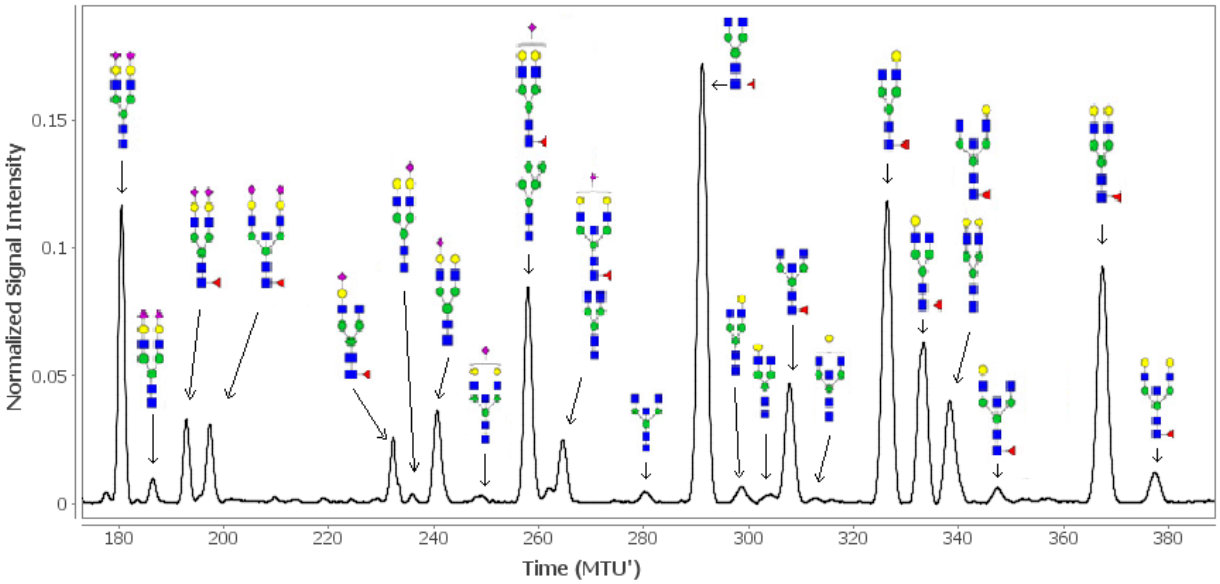
U prvom dijelu profila vidljive su glikanske strukture koje sadrže jednu ili dvije sijalinske kiseline u svojim granama, pri čemu se izomerne strukture uspješno odvajaju. Uočena veća varijacija u prvom dijelu elektroferograma može biti posljedica i nestabilnosti/osjetljivosti takvih struktura. Osim toga, budući se pretežno radi o manjim pikovima, potencijalne interferencije imaju veći utjecaj na njihov izgled te otežavaju interpretaciju. U drugom dijelu elektroferograma razdvajaju se inače neutralne glikanske strukture, od jednostavnijih prema složenijima.

U profilu dobivenom analizom uzorka početne količine 3 µg IgG-a u 50 mL medija uočeno je 20 pikova koji odgovaraju određenim glikanskim strukturama (Slika 19.). Prisutnost interferencija u 1., 2., 3., 4. i 10. piku onemogućava interpretaciju navedenih pikova. S obzirom da se radi o manjoj količini IgG-a, bazna linija je intenzivnija zbog čega često nije moguće razlikovati pikove male visine od razine šuma.




**Slika 19. Profil glikana dobiven CGE-LIF analizom APTS-om obilježenih N-glikana IgG-a izoliranog iz uzorka početne količine 3 µg IgG-a u 50 mL Opti-MEM medija**

Suprotno, u uzorcima početne količine IgG-a veće od 7 µg, bazna linija nije izražena te se manji pikovi uspješno raspoznaju od šuma. U profilu većih početnih količina IgG-a, a najmanje 7 µg IgG-a, vidljivo je više od 20 pikova (Slika 20.). U elektroferogramima većih količina IgG-a, posebno količinama većim od 10 µg, bazna linija je oštrija, pikovi oštri i pravilni, a signal intenzivniji i utjecaj potencijalnih interferencija manji te je stoga moguće detektirati i manje pikove tj. manje zastupljene glikane IgG-a.




**Slika 20. Profil glikana dobiven CGE-LIF analizom APTS-om obilježenih N-glikana IgG-a izoliranog iz uzorka početne količine 7 µg IgG-a u 50 mL Opti-MEM medija**

S obzirom da se količine IgG-a od 1 µg u nalaze ispod ili na samoj granici detekcije ovdje opisanog protokola te uzimajući u obzir činjenicu da se u ovdje opisanom protokolu od početnog uzorka količine nekoliko mikrograma IgG-a za analizu glikozilacije na kraju iskoristi samo manje od 1% početnog uzorka (injektiranje uzorka na instumentu za CGE-LIF) postoji i potreba i mogućnost kako bi se osjetljivost ove metode mogla povećati. Na primjer, odabirom druge, efikasnije metode odsoljavanja ili ponavljanjem koraka odsoljavanja, uporabom drugih obilježivača i metode detekcije derivatiziranih glikana, dodatnog (ili efikasnijeg) pročišćavanja glikana te mogućnosti iskorištenja cijele početne količine uzorka za analizu. Tako su kombinacijom derivatizacije glikana s hidrazidom GirP (engl. *Girard`s reagent P, 1-carboxymethyl-pyridium chloride hydrazide*), separacije kapilarnom elektroforezom i detekcije masenom spektrometrijom Lageveen-Kammeijer i suradnici razvijenom CE-ESI-MS metodom omogućili analizu atomolarnih količina IgG-a (Lageveen-Kammeijer i sur., 2019).

# 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa i prikazanih rezultata zaključuje se:

- Uspostavljen je protokol koji omogućuje analizu glikozilacije IgG-a iz početnog uzorka koji sadrži količine IgG-a od nekoliko mikrograma u volumenu od nekoliko desetaka mililitara.
- Uspostavljeni protokol uključuje izolaciju malih količine IgG-a iz početnog uzorka velikog volumena afinitetnom kromatografijom na ÄKTA avant 25 kromatografskom sustavu uz primjenu CIM r-Protein G Disk monolitne kolone, međukorak odsoljavanja eluiranog IgG-a hladnim metanolom, cijepanje glikana IgG-a PNGazom F te analizu glikana obilježenih APTS bojom metodom kapilarne gel elektroforeze.
- Granica detekcije uspostavljenog protokola ustanovljena je na razini početnog uzorka i iznosi 3 μg IgG-a u slučaju kada se IgG nalazi u 50 mL medija za staničnu kulturu (Opti-mem).
- Dobivena informacija o granici detekcije uspostavljene metode kojom je moguće analizirati male količine IgG-a iz velikog početnog volumena staničnog medija biti će korisna laboratoriju u kojem je izrađen ovaj diplomski rad prilikom dizajna pokusa s ciljem razumijevanja glikozilacije IgG-a, a koji uključuju stanične modele.
- Dodatna optimizacija ovdje uspostavljenog protokola je moguća i potrebna kako bi se poboljšala granica detekcije.

# 6. LITERATURA


1. Amicon® Ultra-2 mL Centrifugal Filters for DNA and Protein Purification and Concentration, 2019., http://www.merckmillipore.com, pristupljeno 22.05.2019.
2. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473, 4–8.
3. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 2007, 1, 21–50.
4. Callewarth N, Geysens S, Molemans F, Contreras R. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology*, 2001, 11, 257–281.
5. Cummings RD. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular BioSystems*, 2009, 10, 1087–1104.
6. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt I M. Roitt's essential immunology, 12th edition. Oxford, Blackwell Publishing, 2011, str. 54–68 .
7. Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764, 1853–1869.
8. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 9, 1318–1326.
9. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology*, 2018, 333, 65–79.
10. Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MHJ, Vučković F, Novokmet M, Krištić J, Borowiak M, Muth T, Polašek O, Razdorov G, Gornik O, Plomp R, Theodoratou E, Wright AF, Rudan I, Hayward C, Campbell H, Deelder AM, Reichl U, Aulchenko YS, Rapp E, Wuhrer M, Lauc G. Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13, 1598–1610.
11. Huhn C, Selman MHJ, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 2009, 9, 882–913.

12. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The structure of a typical antibody molecule. U: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 5th edition. New York, Garland Publishing, 2001, str. 15-24.

13. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IgG resulting from Fc sialylation. *Science*, 2001, 5503, 484–486.

14. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N, Šarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Spector T, Lauc G. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *The Journals of Gerontology*, 2014, 7, 779–789.

15. Lageveen-Kammeijer GSM, de Haan N, Mohaupt P, Wadt S, Filius M, Nouta J, Flack David, Wuhrer M. Highly sensitive CE-ESI-MS analysis of N-glycans from complex biological samples. *Nature Communications*, 2019, 10, 1-8.

16. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 8, 1574–1582.

17. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. Immunology, 8th Edition. New York, Elsevier Saunders, 2012, str. 51-55.

18. Marek KW, Vijay IK, Marth JD. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*, 1999, 11, 1263–1271.

19. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: A path through the maze. *Nature Chemical Biology*, 2010, 10, 713–723.

20. Marusyk R, Sergeant A. A simple method for dialysis of small-volume samples. *Analytical Biochemistry*, 1980, 2, 403-404.

21. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, Kubota A, Shitara K, Nakamura K. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 2007, 12, 3122–3131.

22. Morelle W, Michalski JC. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. Nature Protocols, 2016, 2, 89-159.

23. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn, AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13, 448-462.

24. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 2006, 5, 855–867.

25. Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Šupraha-Goreta S, Wormald MR, Redžić I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, Wilson JF, Rudan I, Wuhrer M, Rudd PM, Josić Đ, Lauc G. High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG–Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations. *Molecular & Cellular Proteomics,* 2011, 10, 1-15.

26. Reusch D, Haberger M, Kailich T, Heindenreich AK, Kampe M, Bulau P, Wuhrer M. High-throughput glycosylation analysis of therapeutic immunoglobulin G by capillary gel electrophoresis using a DNA analyzer. *mAbs*, 2014, 1, 185–196.

27. Roth Z, Yehezkel G, Khalaila I. Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, 2012, 1-10.

28. Scanlan CN, Burton DR, Dwek RA. Making autoantibodies safe. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 2008, 11, 4081–4082.

29. Schroeder HWJ, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125, 41–52.

30. Shields RL i sur. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 30, 26733–26740.

31. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1972, 2019., https://www.nobelprize.org/, pristupljeno 21.05.2019.

32. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 2014, 5, 1-17.

33. V-series Membranes: Simple dialysis of small volumes, 2019., http://www.merckmillipore.com, pristupljeno 22.05.2019.

34. Walt D, Aoki-Kinoshita KF, Bendiak B, Bertozzi CR, Boons GJ, Darvill A, Hart G, Kiessling LL, Lowe J, Moon R, Paulson J, Sasisekharan R, Varki A, Wong CH.

Transforming Gly- coscience: A Roadmap for the Future, *Nacional Academies Press*, 2012, 1, 55.

35. Zhang Q, Li H, Feng X, Liu BF, Liu X. Purification of Derivatized Oligosaccharides by Solid Phase Extraction for Glycomic Analysis. *PLoS ONE*, 2014, 9, 1-10.

# 7. SAŽETAK

Glikozilacija je ključna posttranslacijska modifikacija čiji je utjecaj na funkciju proteina vjerojatno najbolje pokazan na primjeru imunoglobulina G (IgG). Budući je najzastupnije antitijelo u serumu i time lako dostupan, glikozilacija IgG-a vrlo je dobro opisana, kao i promjene u zastupljenosti pojedinih N-glikana IgG-a u raznim stanjima i bolestima, zbog čega IgG predstavlja odličan model glikoproteina. U svrhu daljnjeg rasvjetljavanja glikozilacije, razvijene su brojne metode koje omogućuju analizu slobodnih glikana te glikopeptida. Veliki izazov predstavlja prilagođavanje postojećih metoda uzorcima male količine glikoproteina za čiju je analizu potrebno razviti osjetljivije metode. Uzorci supernatanta staničnih kultura koje se ponekad koriste u istraživanju glikozilacije često sadrže vrlo male količine IgG-a u velikim volumenima medija jer su stanični modeli nerijetko loši proizvođači IgG-a. Obzirom da su postojeće metode za analizu glikozilacije IgG-a uglavnom optimizirane za uzorak plazme/seruma, bilo je potrebno uspostaviti protokol za analizu N-glikozilacije IgG-a iz početnih uzoraka male količine IgG-a u velikom volumenu, točnije, provjeriti mogu li se postojeće metode, uz manje modifikacije i optimizacije, koristiti u navedene svrhe. Optimiranjem pojedinih koraka uspostavljen je protokol koji se sastoji od izolacije IgG-a afinitetnom kromatografijom na ÄKTA Avant 25 sustavu uz CIM r-Protein G disk monolitnu kolonu, odsoljavanja eluiranog IgG-a hladnim metanolom, deglikozilacije izoliranog IgG-a pomoću PNGaze F, obilježavanje oslobođenih glikana APTS-om, pročišćavanja glikana na Bio-gel P-10 te analize glikana kapilarnom gel elektroforezom. Analizom uzoraka male količine IgG-a (1 – 10 μg) u volumenu od nekoliko desetaka mililitara staničnog medija ustanovljeno je da je osjetljivost uspostavljene metode dovoljna za analizu profila glikana porijeklom IgG-a količine od 3 μg. Za postizanje osjetljivosti dovoljne za analizu i manjh količina IgG-a (nanogramskih), potrebne su veće modifikacije metode poput odabira druge tehnike odsoljavanja proteina te dodatnog pročišćavanja i mogućnosti ukoncentriravanja obilježenih glikana.

## SUMMARY

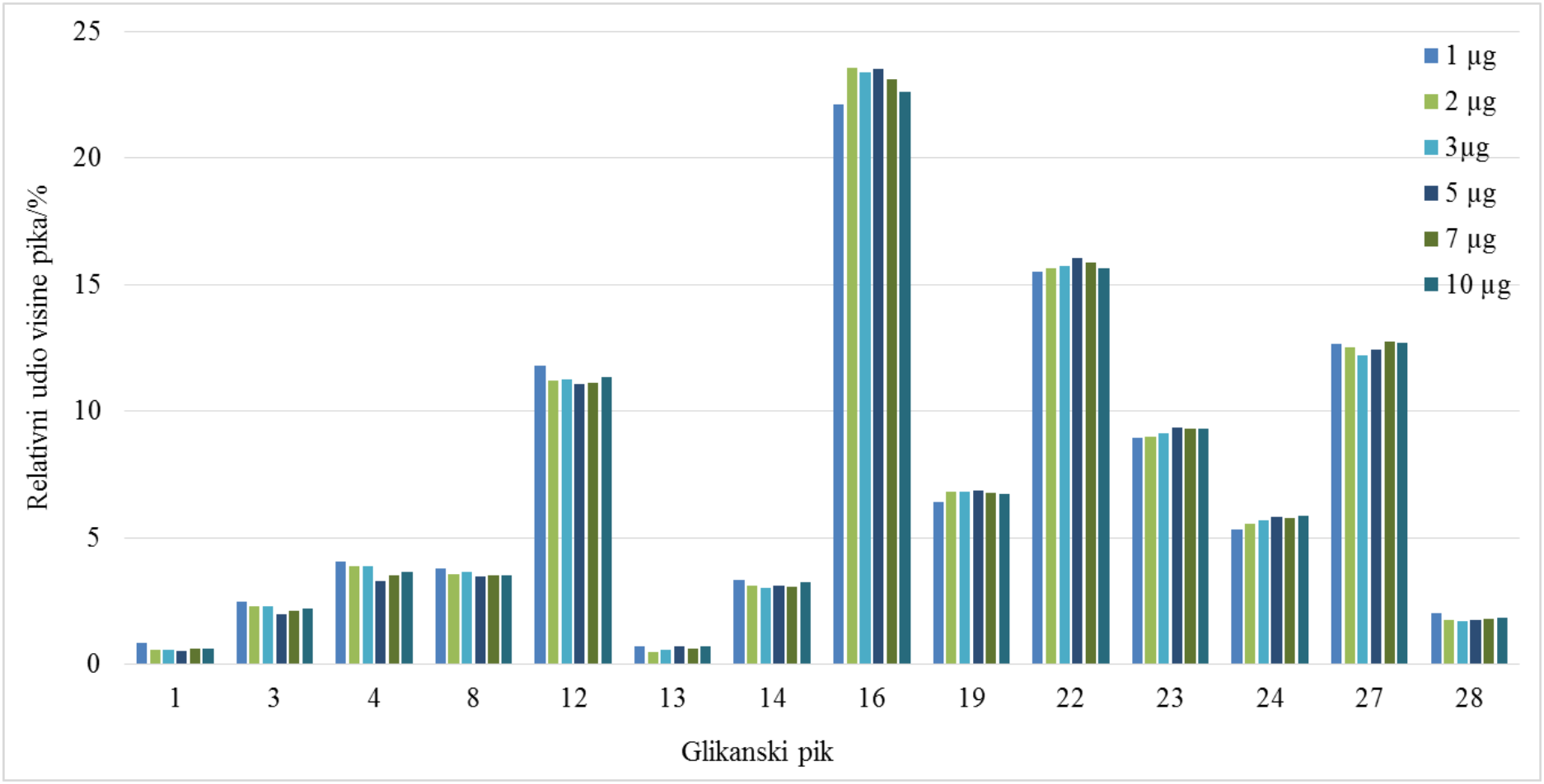
Glycosylation is the key posttranslational modification whose impact on the function of proteins is probably best described on the example of immunoglobulin G (IgG). Since it is the most abundant antibody in human serum, and therefore easily accessible, glycosylation of IgG is very well described, just as presence of different N-glycans in various states and diseases, all of which makes IgG an excellent model glycoprotein. Fast progress in glycoscience requires establishment of high-throughput technologies for analysis of N-glycans, few of which have been developed recently. One of the challenges is adaption of existing technologies to low-abundance glycoprotein samples, for whose analysis development of more sensitive methods is needed. Since cell models sometimes used for the purpose of glycosylation research are often poor producers of IgG, samples of cell culture supernatants contain scarce amounts of IgG in big volumes of media. Considering that existing methods are optimized for the analysis of plasma/serum samples, it was necessary to establish a protocol for the IgG N-glycosylation analysis from initial large-volume samples with small quantity of IgG. To be more precise, the aim was to verify whether the existing methods, with minor modifications and optimization, could be used for analysis of samples containing 1-10 μg of IgG in initial volumes of tens of millilitres. Following optimization of mainly the isolation and desalting steps, APTS labelled N-glycans released form IgG isolated by affinity chromatography were analysed by capillary gel electrophoresis. Established protocol is proved sensitive enough for analysis of glycans derived from 3 μg of IgG. Major modifications, such as selection of another desalting technique, adding additional purification steps and concentration of labelled glycans samples could result in greater sensitivity increase needed for analysis of smaller amounts (nanograms) of IgG.

# 8. PRILOZI

**Prilog 1. Tablica vrijednosti relativnih udjela visine pojedinog pika u elektroferogramima dobivenih CGE-LIF analizom uzoraka koji simuliraju eluate IgG-a dobivene nakon izolacije IgG-a na ÄKTI nakon odsoljavanja metanolom.** Uzorci svake odgovarajuće količine IgG-a su analizirani u duplikatu te su prikazane srednje vrijednosti za svaki duplikat. Žutom bojom označeni su pikovi čiji je relativni udio visine pika manji od 1 %, a zelenom bojom označeni su koeficijenti varijacije manji od 5 %.

| | Prosječni relativni udio visine pika | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Količina IgG-a/ µg | 1 | 3 | 4 | 8 | 12 | 13 | 14 | 16 | 19 | 22 | 23 | 24 | 27 | 28 |
| 1 | 1,88 | 3,12 | 3,79 | 3,55 | 11,68 | 1,83 | 2,83 | 21,40 | 6,23 | 15,04 | 9,29 | 5,40 | 11,94 | 2,03 |
| 2 | 0,75 | 1,99 | 3,59 | 3,54 | 11,23 | 0,97 | 3,24 | 23,01 | 6,61 | 15,14 | 9,83 | 5,40 | 12,61 | 2,08 |
| 3 | 0,81 | 2,37 | 3,74 | 3,93 | 10,61 | 0,88 | 2,91 | 22,96 | 6,82 | 15,22 | 9,87 | 5,56 | 12,16 | 2,16 |
| 5 | 0,48 | 1,87 | 3,14 | 3,33 | 10,06 | 0,78 | 2,97 | 24,82 | 7,03 | 15,85 | 9,69 | 5,77 | 12,42 | 1,79 |
| 7 | 0,50 | 1,73 | 2,93 | 3,30 | 9,93 | 0,74 | 2,89 | 24,78 | 7,08 | 16,09 | 9,81 | 5,86 | 12,56 | 1,80 |
| 10 | 0,38 | 1,73 | 2,94 | 3,30 | 9,88 | 0,68 | 2,83 | 25,09 | 7,14 | 16,16 | 9,69 | 5,85 | 12,55 | 1,80 |
| CV/ % | 69,32 | 25,18 | 11,86 | 6,99 | 7,10 | 43,78 | 5,22 | 6,17 | 5,11 | 3,25 | 2,19 | 3,81 | 2,16 | 8,54 |
| Broj pikova sa CV < 5 % : 4 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 5 – 10 % : 6 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 10 – 15 % : 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV > 15 % : 3 | | | | | | | | | | | | | | |

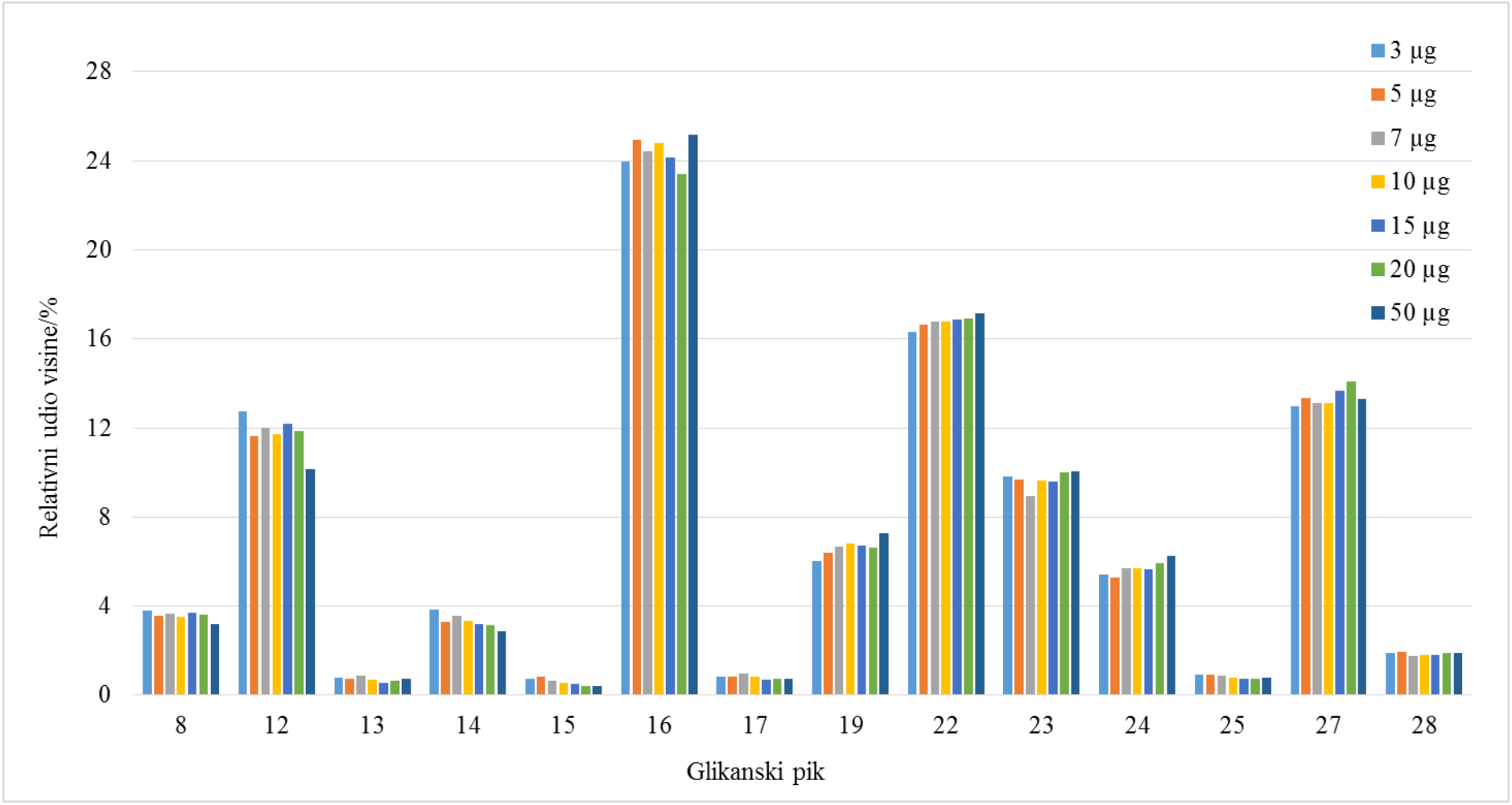
**Prilog 2. Grafički prikaz relativnih udjela visine pojedinog pika u elektroferogramima dobivenih CGE-LIF analizom uzorka IgG-a izoliranog iz plazme različite početne količine (1, 2, 3, 5, 7 i 10 µg).**



**Prilog 3. Tablica relativnih udjela visine 14 odabranih glikanskih pikova dobivenih CGE-LIF analizom uzoraka IgG-a izoliranog iz plazme početne količine 1, 2, 3, 5, 7 i 10 µg.** Žutom bojom označeni su pikovi čiji je relativni udio visine pika manji od 1 %, a zelenom bojom označeni su koeficijenti varijacije manji od 5 %.

| | Relativni udio visine pika | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Količina IgG-a/ µg | 1 | 3 | 4 | 8 | 12 | 13 | 14 | 16 | 19 | 22 | 23 | 24 | 27 | 28 |
| 1 | 0,84 | 2,49 | 4,08 | 3,79 | 11,80 | 0,70 | 3,35 | 22,11 | 6,41 | 15,49 | 8,94 | 5,33 | 12,67 | 2,00 |
| 2 | 0,59 | 2,28 | 3,88 | 3,55 | 11,23 | 0,50 | 3,11 | 23,57 | 6,83 | 15,63 | 9,00 | 5,55 | 12,52 | 1,75 |
| 3 | 0,60 | 2,32 | 3,90 | 3,65 | 11,27 | 0,58 | 3,04 | 23,38 | 6,82 | 15,76 | 9,12 | 5,68 | 12,21 | 1,69 |
| 5 | 0,55 | 2,00 | 3,30 | 3,46 | 11,10 | 0,69 | 3,11 | 23,50 | 6,89 | 16,07 | 9,35 | 5,80 | 12,41 | 1,77 |
| 7 | 0,60 | 2,11 | 3,53 | 3,53 | 11,14 | 0,63 | 3,07 | 23,10 | 6,78 | 15,88 | 9,31 | 5,77 | 12,76 | 1,79 |
| 10 | 0,61 | 2,22 | 3,64 | 3,53 | 11,35 | 0,70 | 3,27 | 22,61 | 6,74 | 15,66 | 9,29 | 5,85 | 12,72 | 1,82 |
| CV/ % | 16,17 | 7,58 | 7,68 | 3,29 | 2,24 | 12,65 | 3,83 | 2,51 | 2,56 | 1,29 | 1,90 | 3,42 | 1,69 | 6,00 |
| Broj pikova sa CV < 5 % : 9 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 5 – 10 % : 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 10 – 15 % : 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV > 15 % : 1 | | | | | | | | | | | | | | |

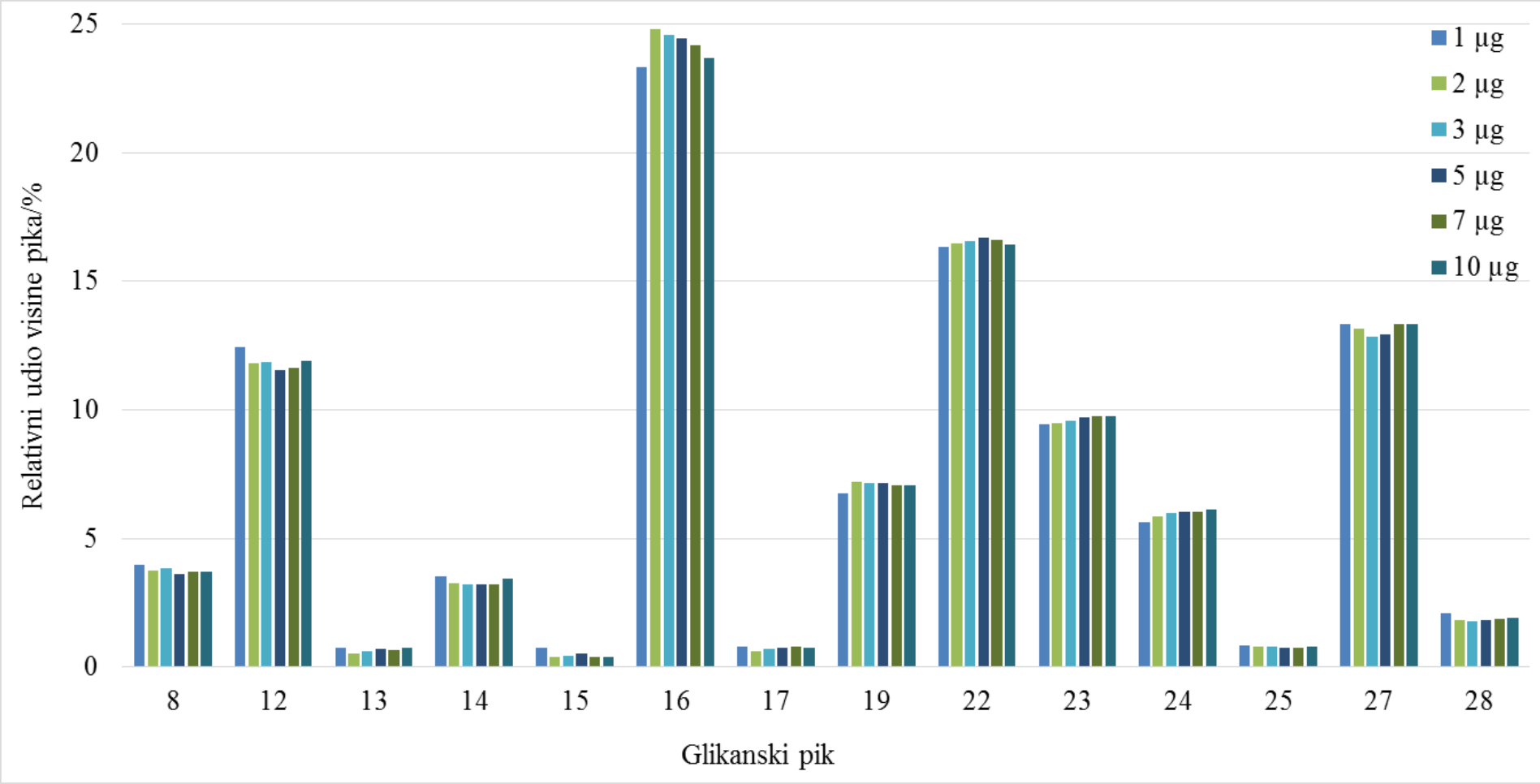
**Prilog 4. Grafički prikaz relativnih udjela visine pojedinog profila dobivenih CGE-LIF analizom uzoraka početne količine IgG-a od 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 50 µg**



**Prilog 5. Tablica relativnih udjela visine i pripadajući koeficijenti varijacije relativnog udjela visine pikova profila uzoraka početne količine IgG-a od 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 50 µg dobivenih CGE-LIF analizom prema uspostavljenom protokolu.** Žutom bojom označeni su pikovi čiji je relativni udio visine pika manji od 1 %, a zelenom bojom označeni su koeficijenti varijacije manji od 5 %.

| | Relativni udio visine pojedinog glikanskog pika | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Količina IgG-a/µg | 8 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 19 | 22 | 23 | 24 | 25 | 27 | 28 |
| 3 | 3,82 | 12,74 | 0,76 | 3,85 | 0,73 | 23,95 | 0,81 | 6,00 | 16,30 | 9,84 | 5,40 | 0,91 | 12,99 | 1,90 |
| 5 | 3,56 | 11,62 | 0,76 | 3,27 | 0,83 | 24,94 | 0,84 | 6,41 | 16,62 | 9,68 | 5,28 | 0,90 | 13,36 | 1,94 |
| 7 | 3,66 | 12,02 | 0,86 | 3,54 | 0,65 | 24,44 | 0,96 | 6,69 | 16,78 | 8,95 | 5,69 | 0,88 | 13,13 | 1,74 |
| 10 | 3,54 | 11,71 | 0,68 | 3,32 | 0,54 | 24,81 | 0,81 | 6,80 | 16,77 | 9,65 | 5,68 | 0,76 | 13,12 | 1,80 |
| 15 | 3,70 | 12,20 | 0,56 | 3,18 | 0,51 | 24,13 | 0,68 | 6,71 | 16,88 | 9,60 | 5,65 | 0,72 | 13,67 | 1,79 |
| 20 | 3,59 | 11,88 | 0,64 | 3,13 | 0,42 | 23,41 | 0,75 | 6,60 | 16,93 | 10,01 | 5,91 | 0,74 | 14,07 | 1,91 |
| 50 | 3,21 | 10,17 | 0,72 | 2,85 | 0,42 | 25,18 | 0,75 | 7,29 | 17,16 | 10,03 | 6,25 | 0,78 | 13,28 | 1,88 |
| X | 3,58 | 11,76 | 0,71 | 3,31 | 0,59 | 24,41 | 0,80 | 6,64 | 16,78 | 9,68 | 5,69 | 0,81 | 13,37 | 1,85 |
| SD | 0,19 | 0,80 | 0,09 | 0,32 | 0,15 | 0,62 | 0,09 | 0,39 | 0,27 | 0,36 | 0,32 | 0,08 | 0,37 | 0,07 |
| CV/% | 5,33 | 6,77 | 13,52 | 9,69 | 26,42 | 2,55 | 10,83 | 5,89 | 1,61 | 3,75 | 5,61 | 9,81 | 2,80 | 3,98 |
| Broj pikova sa CV < 5 % : 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 5 – 10 % : 6 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 10 – 15 % : 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV > 15 % : 1 | | | | | | | | | | | | | | |

**Prilog 6. Grafički prikaz relativnih udjela visine pojedinog od 14 pikova nakon integracije elektroferograma dobivenih CGE-LIF analizom kombiniranog uzorka IgG-a izoliranog iz plazme različite početne količine (1, 2, 3, 5, 7 i 10 µg).**



**Prilog 7. Tablica relativnih udjela visine i pripadajući koeficijenti varijacije relativnog udjela visine pikova profila uzoraka početne količine IgG-a od 1, 2, 3, 5, 7, 10 µg dobivenih CGE-LIF analizom prema uspostavljenom protokolu.** Žutom bojom označeni su pikovi čiji je relativni udio visine pika manji od 1 %, a zelenom bojom označeni su koeficijenti varijacije manji od 5 %.

| | Relativni udio visine pojedinog glikanskog pika | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Količina IgG-a/µg | 8 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 19 | 22 | 23 | 24 | 25 | 27 | 28 |
| 1 | 4,00 | 12,44 | 0,74 | 3,53 | 0,76 | 23,31 | 0,78 | 6,75 | 16,33 | 9,42 | 5,62 | 0,85 | 13,36 | 2,11 |
| 2 | 3,74 | 11,83 | 0,53 | 3,27 | 0,38 | 24,82 | 0,64 | 7,20 | 16,46 | 9,48 | 5,85 | 0,78 | 13,18 | 1,84 |
| 3 | 3,84 | 11,85 | 0,61 | 3,20 | 0,45 | 24,60 | 0,70 | 7,17 | 16,58 | 9,59 | 5,97 | 0,81 | 12,84 | 1,78 |
| 5 | 3,60 | 11,54 | 0,72 | 3,23 | 0,53 | 24,45 | 0,74 | 7,17 | 16,72 | 9,73 | 6,04 | 0,77 | 12,91 | 1,84 |
| 7 | 3,69 | 11,65 | 0,66 | 3,21 | 0,41 | 24,15 | 0,80 | 7,08 | 16,60 | 9,73 | 6,03 | 0,77 | 13,34 | 1,87 |
| 10 | 3,70 | 11,89 | 0,73 | 3,42 | 0,41 | 23,69 | 0,77 | 7,06 | 16,41 | 9,74 | 6,13 | 0,79 | 13,33 | 1,91 |
| X | 3,76 | 11,87 | 0,67 | 3,31 | 0,49 | 24,17 | 0,74 | 7,07 | 16,52 | 9,62 | 5,94 | 0,80 | 13,16 | 1,89 |
| SD | 0,14 | 0,31 | 0,08 | 0,13 | 0,14 | 0,58 | 0,06 | 0,17 | 0,14 | 0,14 | 0,18 | 0,03 | 0,23 | 0,12 |
| CV/% | 3,69 | 2,61 | 12,48 | 4,04 | 28,72 | 2,39 | 8,09 | 2,34 | 0,85 | 1,46 | 3,06 | 3,67 | 1,74 | 6,18 |
| Broj pikova sa CV < 5 % : 10 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 5 – 10 % : 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV 10 – 15 % : 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| Broj pikova sa CV > 15 % : 1 | | | | | | | | | | | | | | |

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

# USPOSTAVLJANJE PROTOKOLA ZA ANALIZU GLIKOZILACIJE MALE KOLIČINE IMUNOGLOBULINA G IZ POČETNOG UZORKA VELIKOG VOLUMENA

**Angela Milanović**

## SAŽETAK

Glikozilacija je ključna posttranslacijska modifikacija čiji je utjecaj na funkciju proteina vjerojatno najbolje pokazan na primjeru imunoglobulina G (IgG). Budući je najzastupnije antitijelo u serumu i time lako dostupan, glikozilacija IgG-a vrlo je dobro opisana, kao i promjene u zastupljenosti pojedinih N-glikana IgG-a u raznim stanjima i bolestima, zbog čega IgG predstavlja odličan model glikoproteina. U svrhu daljnjeg rasvjetljavanja glikozilacije, razvijene su brojne metode koje omogućuju analizu slobodnih glikana te glikopeptida. Veliki izazov predstavlja prilagođavanje postojećih metoda uzorcima male količine glikoproteina za čiju je analizu potrebno razviti osjetljivije metode. Uzorci supernatanta staničnih kultura koje se ponekad koriste u istraživanju glikozilacije često sadrže vrlo male količine IgG-a u velikim volumenima medija jer su stanični modeli nerijetko loši proizvođači IgG-a. Obzirom da su postojeće metode za analizu glikozilacije IgG-a uglavnom optimizirane za uzorak plazme/seruma, bilo je potrebno uspostaviti protokol za analizu N-glikozilacije IgG-a iz početnih uzoraka male količine IgG-a u velikom volumenu, točnije, provjeriti mogu li se postojeće metode, uz manje modifikacije i optimizacije, koristiti u navedene svrhe. Optimiranjem pojedinih koraka uspostavljen je protokol koji se sastoji od izolacije IgG-a afinitetnom kromatografijom na ÄKTA Avant 25 sustavu uz CIM r-Protein G disk monolitnu kolonu, odsoljavanja eluiranog IgG-a hladnim metanolom, deglikozilacije izoliranog IgG-a pomoću PNGaze F, obilježavanje oslobođenih glikana APTS-om, pročišćavanja glikana na Bio-gel P-10 te analize glikana kapilarnom gel elektroforezom. Analizom uzoraka male količine IgG-a (1 – 10 μg) u volumenu od nekoliko desetaka mililitara staničnog medija ustanovljeno je da je osjetljivost uspostavljene metode dovoljna za analizu profila glikana porijeklom IgG-a količine od 3 μg. Za postizanje osjetljivosti dovoljne za analizu i manjh količina IgG-a (nanogramskih), potrebne su veće modifikacije metode poput odabira druge tehnike odsoljavanja proteina te dodatnog pročišćavanja i mogućnosti ukoncentriravanja obilježenih glikana.

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

Rad sadrži: 58 stranica, 20 grafičkih prikaza, 7 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: imunoglobulin G, N-glikani, uzorak velikog volumena, CGE-LIF

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordan Lauc**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
**Dr. sc. Tin Weitner**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
**Dr. sc. Jasminka Krištić**, *poslijedoktorand u Laboratoriju za glikobiologiju, Genos d.o.o.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

# PROTOCOL DEVELOPMENT FOR GLYCOSYLATION ANALYSIS OF SMALL AMOUNT OF IgG FROM THE INITIAL LARGE-VOLUME SAMPLE

**Angela Milanovic**

## SUMMARY

Glycosylation is the key posttranslational modification whose impact on the function of proteins is probably best described on the example of immunoglobulin G (IgG). Since it is the most abundant antibody in human serum, and therefore easily accessible, glycosylation of IgG is very well described, just as presence of different N-glycans in various states and diseases, all of which makes IgG an excellent model glycoprotein. Fast progress in glycoscience requires establishment of high-throughput technologies for analysis of N-glycans, few of which have been developed recently. One of the challenges is adaption of existing technologies to low-abundance glycoprotein samples, for whose analysis development of more sensitive methods is needed. Since cell models sometimes used for the purpose of glycosylation research are often poor producers of IgG, samples of cell culture supernatants contain scarce amounts of IgG in big volumes of media. Considering that existing methods are optimized for the analysis of plasma/serum samples, it was necessary to establish a protocol for the IgG N-glycosylation analysis from initial large-volume samples with small quantity of IgG. To be more precise, the aim was to verify whether the existing methods, with minor modifications and optimization, could be used for analysis of samples containing 1-10 μg of IgG in initial volumes of tens of millilitres. Following optimization of mainly the isolation and desalting steps, APTS labelled N-glycans released form IgG isolated by affinity chromatography were analysed by capillary gel electrophoresis. Established protocol is proved sensitive enough for analysis of glycans derived from 3 μg of IgG. Major modifications, such as selection of another desalting technique, adding additional purification steps and concentration of labelled glycans samples could result in greater sensitivity increase needed for analysis of smaller amounts (nanograms) of IgG.

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

Thesis includes: 58 pages, 20 figures, 7 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: immunoglobulin G, N-glycans, large-volume sample, CGE-LIF

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

Reviewers: **Gordan Lauc**, **Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
**Tin Weitner**, **Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
**Jasminka Krištić**, **Ph.D.** *Postdoctoral researcher, Glycoscience Research Laboratory, Genos d.o.o.*

The thesis was accepted: July 2019.