

# Razvoj metode za ukoncentriravanje N-glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi

---

**Koprivec, Isabella**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:163:654660>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Isabella Koprivec**

**Razvoj metode za ukoncentriravanje N-glikana  
PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

*Od srca zahvaljujem dragom mentoru, dr. sc. Tomi Keseru na ukazanom povjerenju, razumijevanju, stručnosti, mudrim savjetima te entuzijastičnoj radnoj atmosferi.*

*Zahvaljujem ostalim djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju na pomoći i ugodnom društvu.*

*Hvala i svim ostalim mentorima i ljudima s kojima sam dijelila labos tijekom proteklih 5 godina, a koji su me naučili da su najveći ljudi oni koji nesebično dijele svoje znanje i veselje s drugima.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su najgore dane učinili dobrima, a najbolje još boljima.*

*Najveće hvala mojoj obitelji na neizmjerneoj ljubavi, sigurnosti, slobodi, razumijevanju i primjeru koji su mi cijeli život pružali.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Glikobiologija.....	1
1.1.1. Glikani.....	1
1.1.2. N-glikom ljudske krvne plazme.....	3
1.1.3. Imunoglobulin G.....	4
1.1.4. Promjene u glikozilaciji .....	5
1.2. Analiza glikana.....	6
1.2.1. Visokoprotodne metode za analizu glikana .....	6
1.2.2. Problem osjetljivosti prilikom analize glikana .....	8
1.2.3. PGC.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Uzorci .....	14
3.2. Materijali .....	14
3.3. Oprema.....	16
3.4. Metode.....	16
3.4.1. Priprema uzoraka .....	16
3.4.2. Denaturacija .....	17
3.4.3. Deglikozilacija .....	17
3.4.4. Priprema otopina 2-aminobenzamida i prokainamida .....	17
3.4.5. Obilježavanje uzoraka.....	17
3.4.6. Predpriprema GHP pločice .....	17
3.4.7. Nanošenje i pročišćavanje obilježenih N-glikana na GHP pločici .....	18
3.4.8. Eluiranje označenih N-glikana.....	18
3.4.9. Ukoncentriravanje N-glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi.....	18
3.4.10. Analiza izoliranih N-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
5. ZAKLJUČCI .....	38
6. LITERATURA .....	39
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	42
7.1. Sažetak .....	42
7.2. Summary .....	42

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

## **POPIS KORIŠTENIH KRATICA**

2-AB – 2-aminobenzamid

ACN – acetonitril

AF – amonijev formijat

DMSO – dimetilsulfoksid

EtOH – etanol

FA – formijatna kiselina

Fab – fragment za vezanje antigena

Fc – kristalizabilni fragment

GlcNAc – N-acetilglukozamin

GPI – glikozilfosfatidil inozitol

HAc – ledena octena kiselina

HILIC – tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama

IgG – imunoglobulin G

LC-ESI-MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa koji ionizira elektroraspršivanjem

MALDI-TOF-MS – spektrometrija masa temeljena na matricom potpomognutoj ionizaciji laserskom desorpcijom s analizatorom masa vremenom preleta

MeOH – metanol

MSPD – disperzija na čvrstom matriksu

PB – 2-pikolin boran

PBS – fosfatni slani pufer

PGC – porozni grafitni ugljik

SDS – natrijev dodecil sulfat

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi

SPME – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

TFA – trifluorooctena kiselina

UPLC-FLR – tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti s fluorescentnom detekcijom

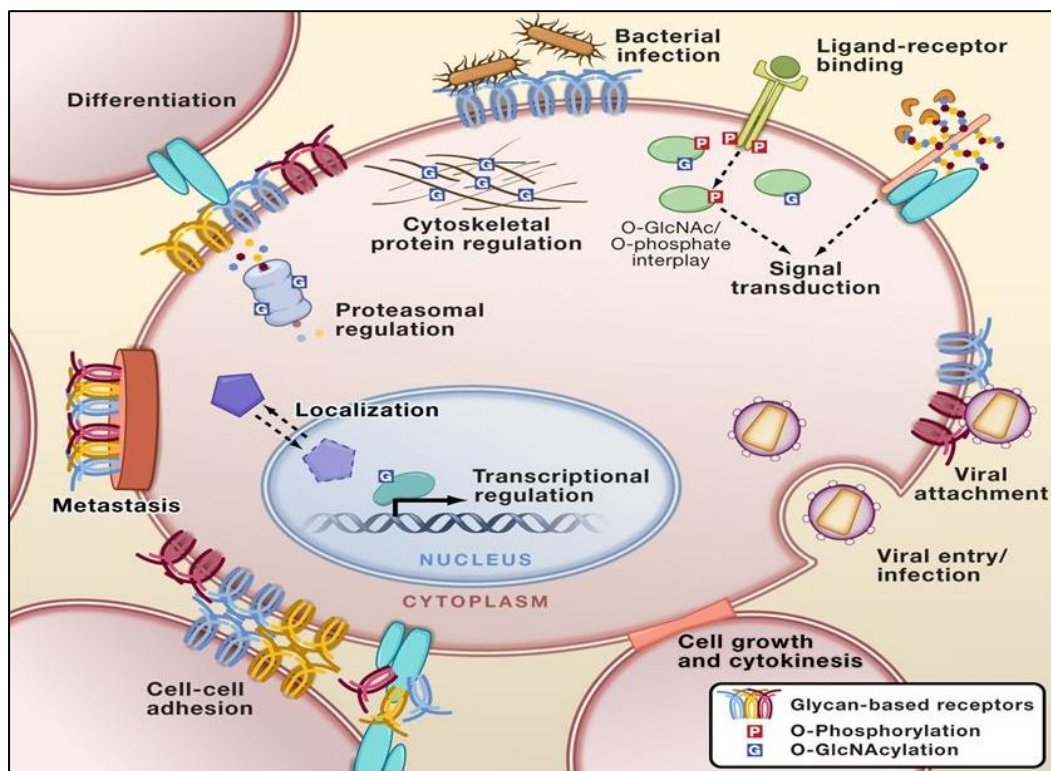
xCGE-LIF – multipleks kapilarna gel elektroforeza s laserom induciranom fluorescentnom detekcijom

# 1. UVOD

## 1.1. Glikobiologija

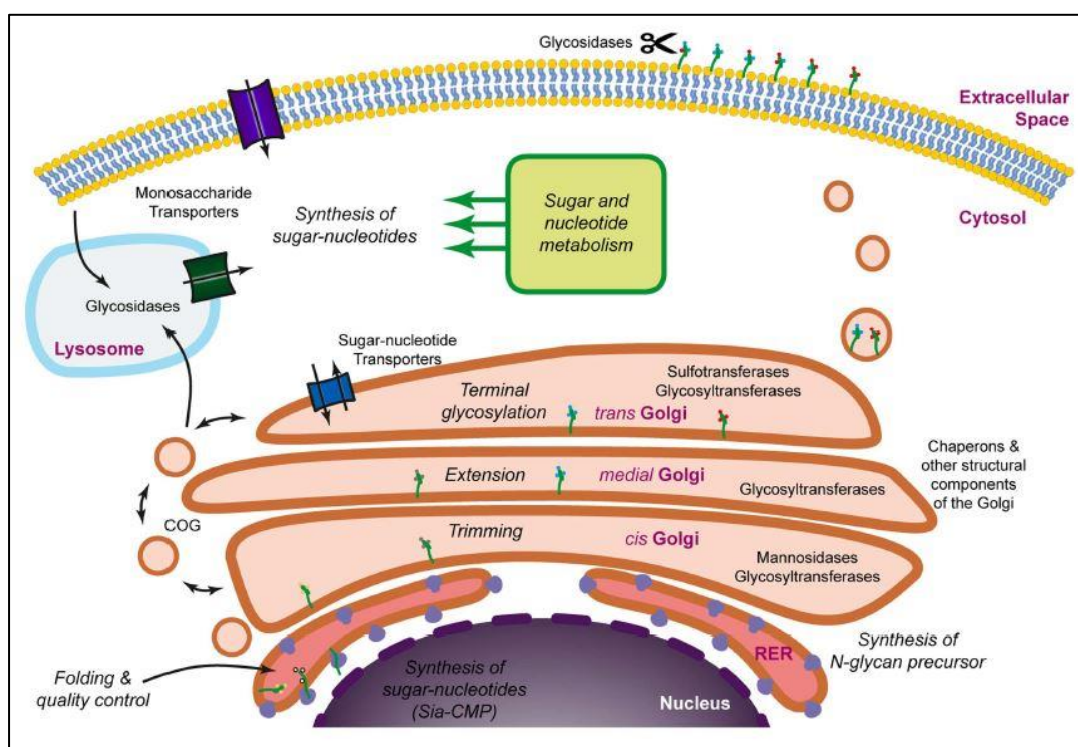
### 1.1.1. Glikani

Uz proteine, nukleinske kiseline i lipide, glikani su najzastupljenija od četiri glavne vrste bioloških molekula u živim organizmima (Stern i Jdrzejcas, 2008). Glikani se nalaze na površini svakog jednostaničnog organizma, na površini svake stanice višestaničnog organizma, na površini virusa koji preuzimaju obrazac glikozilacije stanica domaćina, na površini sekretornih molekula te u izvanstaničnom matriksu. Zbog njihove raznolikosti i fleksibilnosti, može se reći da glikani predstavljaju granicu koja povezuje stanice s izvanstaničnim matriksom.



Slika 1. Uloga glikana kao granice koja povezuje stanice s izvanstaničnim matriksom. Preuzeto i prilagođeno iz G. W. Hart, R. J. Copeland, Cell, 2010, 143, 672–676.

U eukariotskim stanicama većina sekretornih proteina i proteina na površini stanice kontrastacijski se translocira u endoplazmatski retikulum u kojem dolazi do njihova smatanja, kontrole kvalitete i raznih modifikacija, uključujući glikozilaciju. Ti proteini zatim prolaze Golgijev aparat i dolaze do svojeg ciljnog mjesta u stanici i organizmu (Varki i sur., 2009). Proteini nakon glikozilacije, kao najčešće posttranslacijske modifikacije (van Kooyk i Vallejo, 2013), mogu biti N-glikozilirani, O-glikozilirani, modificirani N-glikozilfosfatidil inozitol (GPI) sidrima ili modificirani glikozaminoglikanskim lancima, nazivajući se tada proteoglikanima. Proteoglikani se u stanici recikliraju ograničenom proteolizom i otpuštanjem s površine stanice, no recikliranje se ipak većinom odvija endocitozom i zatim degradacijom u lizosomima. Glikani se najprije kidaju endoglikozidazama, a zatim egzoglikozidazama u lizosomu, pri čemu se individualni monosaharidi mogu reciklirati vraćanjem iz lizosoma u citoplazmu (Varki i sur., 2009).



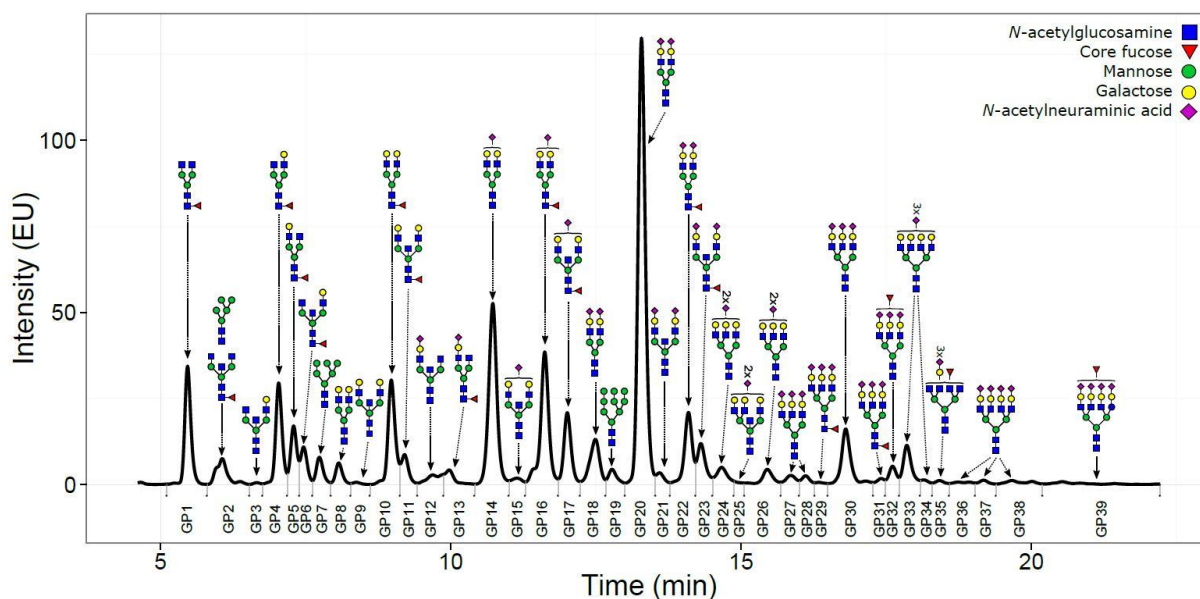
**Slika 2. Mehanizam glikozilacije.** Preuzeto i prilagođeno iz van Kooyk i Vallejo, 2013.

N-glikani u eukariotskim organizmima N-glikozidnom vezom kovalentno su vezani za protein na asparaginskom ostatku. Sinteza N-glikana započinje poliizoprenoidom dolihol-fosfatom i nakon sinteze oligosaharida koji sadrži do 14 šećera, cijeli oligosaharid, odnosno N-glikan, prenosi se na protein. Svi eukariotski N-glikani imaju jednaku strukturu srži,  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ , a ovisno o dodatnim glikanima koji se vežu na srž dijele se u različite skupine. Oligomanozni glikani imaju samo manozne ostatke dodane na osnovnu strukturu, kompleksni glikani imaju antene koje počinju N-acetilglukozaminom (GlcNAc), a kod hibridnih glikana na  $\text{Man}\alpha 1-6$  krak dodani su manozni ostaci, dok su na  $\text{Man}\alpha 1-3$  krak dodane jedna ili dvije antene koje počinju N-acetilglukozaminom. Manji broj N-glikana nalazi se također i na glikokonjugatima koji se nazivaju mucinima (Varki i sur., 2009).

#### 1.1.2. N-glikom ljudske krvne plazme

Ljudska krvna plazma sastoji se od više od 300 različitih proteina, uključujući proteine iz čvrstih tkiva, imunoglobuline, ligande receptora i proteine otpuštene iz abnormalnih i oboljelih tkiva kao što su tumori (Anderson i Anderson, 2002). Većina plazmatskih proteina prisutnih u velikim količinama posttranslacijski je modificirana N-glikanima koji utječu na njihovo smatanje, poluživot, interakcije i imunološke funkcije. Upravo proteini prisutni u plazmi u najvećoj količini imaju i najveći utjecaj na ukupni glikozilacijski profil. Visoko zastupljeni plazmatski proteini, kao što su  $\alpha 1$ -kiselni glikoprotein,  $\alpha 1$ -antitripsin, haptoglobin, albumin, C-reaktivni protein te imunoglobulini A, G i M, pokazuju različit glikozilacijski profil u raznim bolestima i stanjima, npr. u trudnoći (Ruhaak i sur., 2014). Najzastupljenije strukture N-glikoma plazme odgovaraju 39 pikova na kromatogramu uzorka N-glikana plazme, a prikazane su na Slici 3.





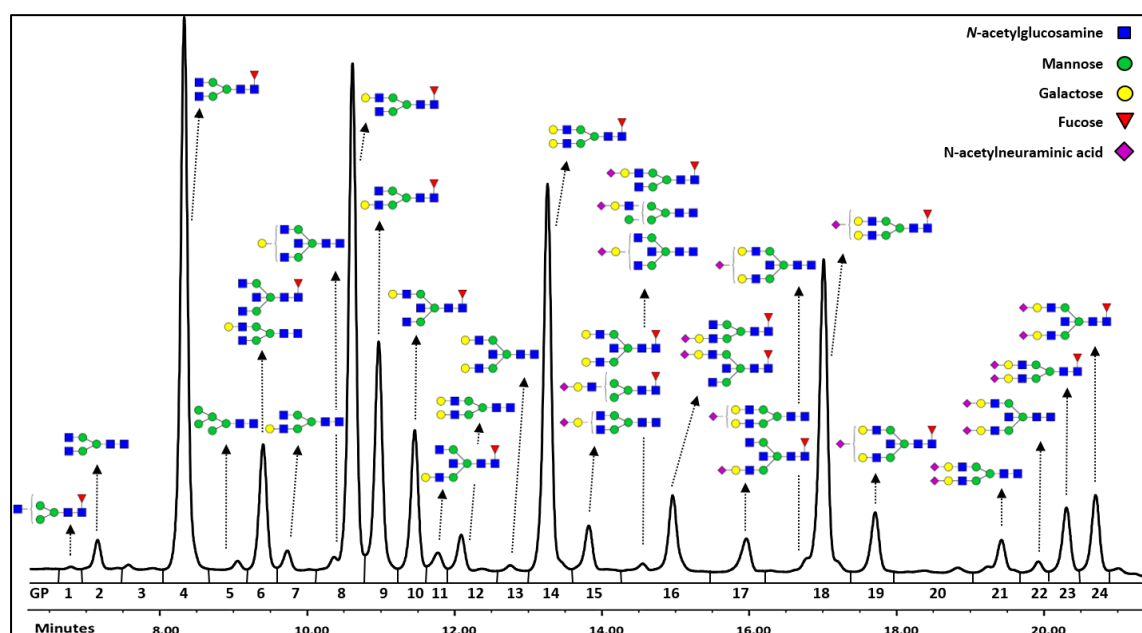
**Slika 3. Kromatogram uzorka N-glikana plazme sa strukturama najzastupljenijih N-glikana.**

### 1.1.3. Imunoglobulin G

Imunoglobulin G (IgG) efektorski je glikoprotein i antitijelo koje povezuje prirodenu i stečenu imunost. Ovisno o afinitetu za različite aktivirajuće ili inhibirajuće receptore kristalizabilnog fragmenta i faktore komplementa, nakon prepoznavanja antigena IgG pokazuje proupalni ili antiupalni odgovor. IgG se danas koristi kao intravenska terapija kod ljudi koji boluju od imunodeficijencije (Russell i sur., 2018), ali također pokazuje destruktivni efekt u bolestima kao što je reumatoidni artritis (Malhotra i sur., 1995).

Sam protein sastoji se od dvaju identičnih lakih polipeptidnih lanaca i dvaju identičnih teških polipeptidnih lanaca, odnosno od ukupno četiriju polipeptidnih lanaca povezanih disulfidnim vezama. Funkcijom se razlikuju dvije različite domene. Domena kristalizabilnog fragmenta (Fc) građena je od konstantnih regija lanaca i odgovorna za efektorske funkcije, dok se domena fragmenta za vezanje antigena (Fab) sastoji od varijabilnih i konstantnih regija lanaca i odgovorna je za stvaranje veznog mjesta antigena. Prepoznavanje specifičnih antigena omogućuju varijabilne regije lanaca (Russell i sur., 2018).

Na biološku aktivnost IgG-a velik utjecaj imaju N-glikani vezani za Fc domenu (Huhn i sur., 2009). Dodatkom sijalinske kiseline na krajnji dio N-glikana IgG poprima antiupalna svojstva, dok se stupanj sijalinizacije smanjuje kod antigen specifičnog imunskog odgovora i IgG poprima proupalna svojstva (Kaneko i sur., 2006). Sličan učinak na promjenu iz antiupalnog u proupalno djelovanje IgG-a ima i smanjen stupanj fukozilacije na glikanskoj srži (Huhn i sur., 2009) te smanjen stupanj galaktozilacije (Pasek i sur., 2006).



**Slika 4. Kromatogram uzorka N-glikana imunoglobulina G sa strukturama najzastupljenijih N-glikana.**

#### 1.1.4. Promjene u glikozilaciji

Promjena glikozilacijskog profila krvne plazme uočena je u ovisnosti o spolu, dobi, indeksu tjelesne mase, krvnom tlaku i pušenju (Knežević i sur., 2010). Kod raznih bolesti uočena je promjena glikozilacijskog profila IgG-a, koji je promijenjen kod karcinoma (Varki i sur., 2009), dijabetesa (Lemmers i sur., 2017), reumatoidnog artritisa (Troelsen i sur., 2012) i neuroloških oboljenja kao što je Alzheimerova bolest (Kizuka i sur., 2017). Promjena samo jednog monosaharida na N-glikanu može uzrokovati konformacijsku promjenu koja posljedično mijenja sposobnost aktivacije i inhibicije te vezanja za receptor. Budući da je N-

glikom jedinstvena poveznica između genske predispozicije za razvoj određenih bolesti i okolišnih faktora kojima je organizam izložen, danas se sve više prepoznaje njegov potencijal kao biomarkera u preventivnoj i personaliziranoj medicini (Russell i sur., 2018).

## 1.2. Analiza glikana

### 1.2.1. Visokoprotočne metode za analizu glikana

Zbog povećane svjesnosti o ulozi glikana u raznim stanjima i bolestima, zadnjih nekoliko godina javila se potreba za razvojem brzih, detaljnih i osjetljivih metoda analize glikana koji se pojavljuju na glikoproteinima i tkivima (Pabst i Altmann, 2008). Razvoj novih robusnih visokoprotočnih metoda također je potreban kako bi se izbjeglo pojavljivanje većeg broja malih studija s lažno pozitivnim rezultatima.

Neke od visokoprotočnih metoda koje se najčešće koriste su tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti s fluorescentnom detekcijom (UPLC-FLR), spektrometrija masa temeljena na matricom potpomognutoj ionizaciji laserskom desorpcijom s analizatorom masa vremenom preleta (MALDI-TOF-MS), tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa koji ionizira elektroraspršivanjem (LC-ESI-MS) te multipleks kapilarna gel elektroforeza s laserom induciranom fluorescentnom detekcijom (xCGE-LIF). Najvažnija razlika između UPLC-FLR i xCGE-LIF u odnosu na metode temeljene na spektrometriji masa je ta da UPLC-FLR i xCGE-LIF analiziraju glikozilaciju samo na razini otpuštenih glikana, a MALDI-TOF-MS i LC-ESI-MS obično se koriste za analizu glikopeptida, omogućujući mjerenje Fc glikozilacije specifične za subklasu. Iako UPLC-FLR i xCGE-LIF ne pružaju informaciju o originalnom mjestu vezanja glikana, omogućuju dobivanje detaljne slike o strukturi glikana i imaju prednost u odnosu na metode temeljene na spektrometriji masa jer pružaju informaciju o 3-kraku i 6-kraku kompleksnih glikana te odgovarajućim glikanskim izomerima. UPLC-FLR i xCGE-LIF također su bolje u pružanju kvantitativnih informacija jer se detektira isključivo fluorescentna boja vezana za reducirani kraj glikana. Budući da se strukturna raznolikost obično pojavljuje na nereducirajućim krajevima, svaka struktura fluorescira jednakim kvantitativnim prinosom. To nije slučaj kod metoda temeljenih na spektrometriji masa jer na signal, osim strukture glikana, utječe također i struktura peptida koji eluiraju zajedno s glikanima.

UPLC-FLR je pokazala dodatnu prednost u odnosu na ostale metode u studiji gdje je mjerena korelacija između IgG glikozilacije i dobi, pokazujući najveće koeficijente korelacije i najmanje p-vrijednosti od svih četiriju ispitanih metoda. Također, usporedbom sposobnosti ovih četiriju metoda da pokažu asocijaciju između relevantnog genskog lokusa i IgG glikozilacije, UPLC-FLR i LC-ESI-MS pokazale su se kao preciznije od MALDI-TOF-MS i xCGE-LIF, a osim toga imale su i višu protočnost (Huffman i sur., 2014).

**Tablica 1. Usporedba četiriju visokoprotočnih metoda korištenih za analizu u glikomici i glikoproteomici.** Zadebljanim fontom označene su glavne prednosti UPLC-FLR metode zbog kojih se ona najčešće koristi u kvantitativnoj analizi glikozilacije. Preuzeto i prevedeno na hrvatski jezik iz Huffman i sur., 2014.

#### USPOREDBA ČETIRIJU VISOKOPROTOČNIH METODA KORIŠTENIH ZA ANALIZU U GLIKOMICI I GLIKOPROTEOMICI

	UPLC-FLR	xCGE-LIF	MALDI-TOF-MS	LC-ESI-MS
FREKVENCIJA KORIŠTENJA	<b>često</b>	rijetko	često	umjereno
PROTOČNOST	srednja	visoka	visoka	srednja
POTREBNA RAZINA STRUČNOSTI	srednja	srednja	visoka	jako visoka
REZOLUCIJA RAZDVAJANJE IZOMERA	visoka	visoka	jako visoka	jako visoka
	dobro	jako dobro	-	slabo
KVANTIFIKACIJA	<b>jako dobra</b>	dobra	srednja	dobra
CIJENA OPREME	<b>40,000-70,000 €</b>	100,000 €	100,000-500,000 €	200,000-500,000 €
CIJENA UZORKA U VISOKOPROTOČNIM ANALIZAMA	visoka	niska	niska	jako visoka

<p>PREDNOSTI U GENETIČKIM I EPIDEMIOLOŠKIM STUDIJAMA</p>	<p><b>pouzdana kvantifikacija, robusnost</b></p>	<p>nezahtjevna priprema uzoraka, niska cijena, visoka robusnost i protočnost, pouzdana relativna kvantifikacija, visoka osjetljivost</p>	<p>niska cijena, visoka protočnost, analiza glikozilacije na specifičnom mjestu, visoka osjetljivost, omogućuje određivanje strukture</p>	<p>relativna kvantifikacija, analiza glikozilacije na specifičnom mjestu, visoka osjetljivost, omogućuje određivanje strukture</p>
<p>NEDOSTACI U GENETIČKIM I EPIDEMIOLOŠKIM STUDIJAMA</p>	<p>nemogućnost analize glikozilacije na specifičnom mjestu, niska protočnost, visoka cijena</p>	<p>nemogućnost analize glikozilacije na specifičnom mjestu, relativno mala baza podataka</p>	<p>nepouzdana kvantifikacija, gubitak sijalinske kiseline</p>	<p>visoka cijena</p>
<p>PREDNOSTI U ANALIZI IGG GLIKOZILACIJE</p>	<p>razlikovanje glikozilacije na 3- i 6- kraku, <b>pouzdana kvantifikacija IgG sijalinizacije</b></p>	<p>razlikovanje glikozilacije na 3- i 6- kraku, pouzdana kvantifikacija IgG sijalinizacije</p>	<p>razlikovanje glikana na različitim IgG subklasama, analiza isključivo Fc glikana</p>	<p>razlikovanje glikana na različitim IgG subklasama, analiza isključivo Fc glikana, pouzdana kvantifikacija IgG sijalinizacije</p>

### 1.2.2. Problem osjetljivosti prilikom analize glikana

Identifikacija N-glikana jedno je od područja biokemijskog istraživanja s najbržim razvojem, budući da se pokazalo da glikozilacija ima važnu ulogu u dijagnozi raznih bolesti, predviđanju imunološkog odgovora te određivanju potentnosti i sigurnosti lijekova koji se temelje na antitijelima. S obzirom na to da glikanske strukture pokazuju veliku heterogenost, individualne glikoforme često su prisutne u vrlo niskim koncentracijama. Međutim, glikani koji se pojavljuju u niskim koncentracijama ili tragovima, kao što su kiseli anionski N-glikani sa sijalinskim kiselinama, fosfatnim ili sulfatnim skupinama, imaju najveću biološku važnost

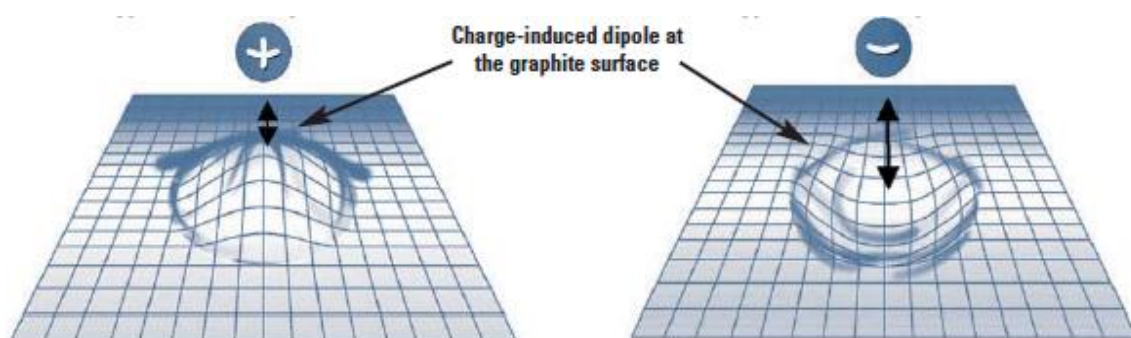
(Wang i sur., 2017). Tako IgG, ovisno o razini sijalinizacije N-glikana na Fc domeni, može imati proupalnu ili antiupalnu funkciju (Kaneko i sur., 2006). N-glikani IgG-a sa sržnom fukozom prisutni su u većim koncentracijama i imaju manju biološku važnost te većinom služe kao zaštita koja onemogućuje aktivaciju stanične toksičnosti ovisne o protutijelu (Gornik i sur., 2012).

U slučajevima kada se analit u uzorku nalazi u tragovima, osobito u kompleksnim uzorcima s više komponenata, različiti koraci ukoncentriravanja i separacije upotrebljavaju se prije same analize. Potreba za ukoncentriravanjem analita u tragovima ovisi o kombinaciji raznih faktora, kao što su volumen injektiranja pri analizi, priroda i koncentracija analita te minimalna koncentracija koja se može odrediti upotrebljenom metodom (Michel i Buzsewski, 2009). Kako bi se postigla povećana osjetljivost pri analizi N-glikana u tragovima, osobito kiselih N-glikana, potrebno je razviti tehnike ukoncentriravanja na mikro skali koje bi također omogućile pouzdanu kvantifikaciju (Wang i sur., 2017). U obzir je važno uzeti i činjenicu da analizom svih glikana plazme otpuštenih s različitih glikoproteina dolazi do zamućenja signala glikozilacije specifične za određeni protein (Huffman i sur., 2014).

### 1.2.3. PGC

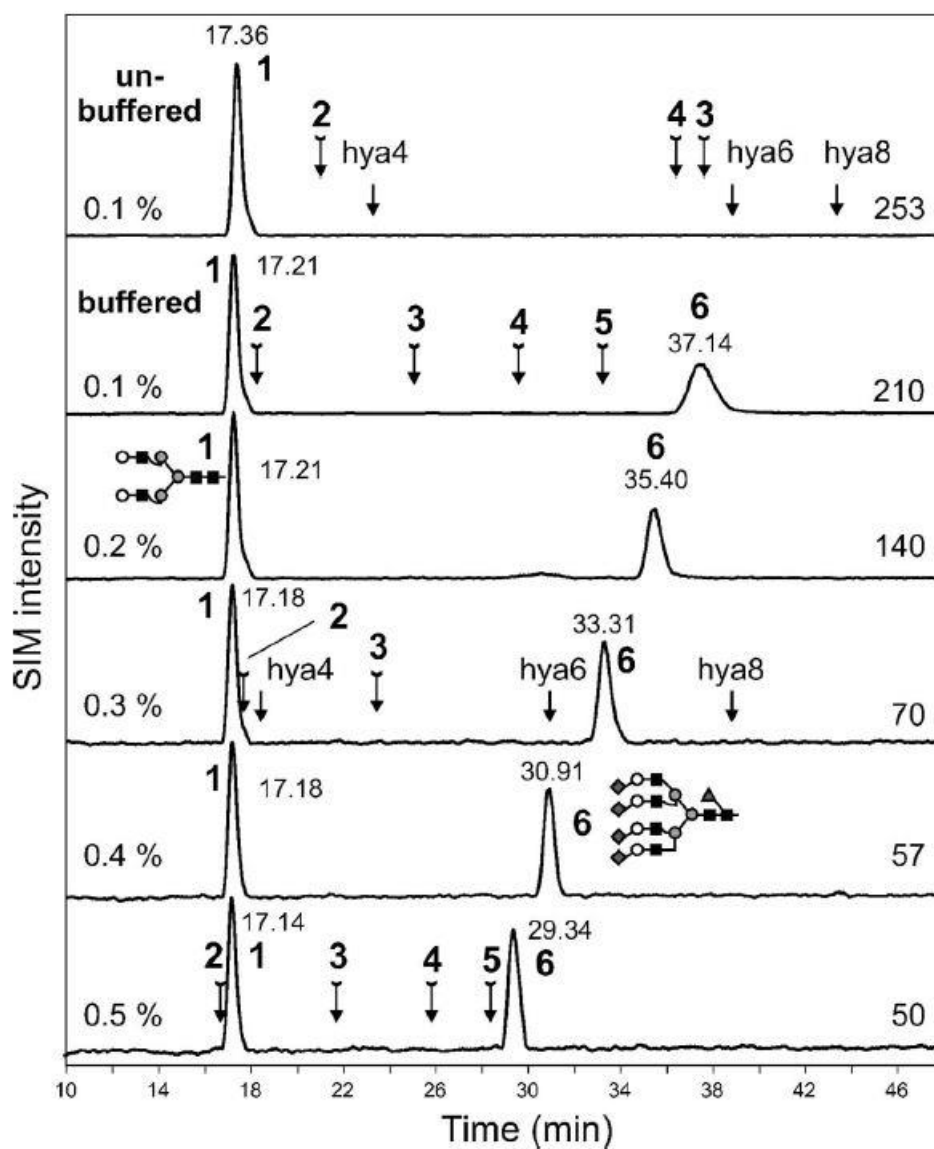
Porozni grafitni ugljik (eng. porous graphitic carbon, PGC) koristi se kao stacionarna faza u analizi kompleksnih glikana, omogućavajući razdvajanje izomera neutralnih te monosijaliniziranih i disijaliniziranih glikana koji se pojavljuju na antitijelima (Pabst i Altmann, 2008). PGC, za razliku od konvencionalnih normalno-faznih materijala, pruža povećanu retenciju hidrofilnih analita zbog polarnog retencijskog efekta na grafitu (PREG), a na njemu se zadržavaju i reducirani glikani. Najmanju retenciju pokazuju glikani s visokim sadržajem manoze, dok se oni s visokim sadržajem sijalinske kiseline snažno zadržavaju na PGC koloni, pri čemu se retencija povećava s brojem sijalinskih kiselina. Kod analize glikana, PGC je obrnuto-fazna stacionarna faza sa snažnim zadržavanjem pomoću disperzijskih sila i dodatnim Coulombovim interakcijama s kiselim glikanima (Melmer i sur., 2010). Stoga se može zaključiti da PGC ima jedinstvena svojstva retencije, ponašajući se istovremeno kao normalno-fazni materijal, obrnuto-fazni materijal i ionsko-izmjenjivački materijal (Michel i Buzsewski, 2009).

Nepolarni analiti reagiraju s PGC kolonom disperzijskim silama čija jačina ovisi o indukciji naboja mobilnom fazom određene pH vrijednosti, dok se polarni zadržavaju vlastitom indukcijom naboja na polarizabilnoj površini PGC kolone. Kao preparativna mobilna faza koristi se voda, koja dopušta vezanje analita za PGC kolonu. Kod elucije se koristi acetonitril kako bi se poremetili naboji inducirani vodom i došlo do kompeticije za disperzijske sile na PGC koloni (Bapiro i sur., 2016).



**Slika 5. Indukcija naboja na polarizabilnoj površini PGC kolone polarnim analitom.** Preuzeto i prilagođeno s Insung HypercarbColumns, [http://www.insungcolumns.com/catgdown\\_bland.php?cmd=view&rno=85](http://www.insungcolumns.com/catgdown_bland.php?cmd=view&rno=85), pristupljeno 8.4.2018.

Međutim, kod uporabe PGC kolone u više radova javlja se problem detekcije visoko sijaliniziranih glikana zbog njihova zaostajanja na koloni. Brojni faktori utječu na detekciju i eluciju glikana s PGC kolone, no ionska jakost pokazala se kao faktor s najvećim utjecajem na eluciju i oblik vršaka glikana koji u svojoj strukturi sadrže više sijalinskih kiselina. Pri tome ne dolazi do utjecaja na glikane koji u svojoj strukturi nemaju sijalinske kiseline. Osim povećanjem ionske jakosti, na smanjeno zadržavanje sijaliniziranih glikana na koloni može se također utjecati povećanjem pH vrijednosti otapala, ali na taj se način negativno utječe na intenzitet vršaka koji je jači pri nižoj pH vrijednosti. Utjecaj na retenciju ima i udio organskog otapala, koji prvenstveno utječe na intenzitet signala te temperatura, gdje je retencija povećana pri višim temperaturama (Pabst i Altmann, 2008). Također je pokazano da se visoko strukturirane i rigidne molekule manje zadržavaju od fleksibilnih molekula iste molekulske mase (Ross i Knox, 1997).



**Slika 6.** Utjecaj koncentracije soli na eluciju neutralnih (1) i tetrasijaliniziranih (6) glikana s PGC kolone. Puferi su se sastojali od 0,1-0,5 % formijatne kiseline podešene na pH 3,0 pomoću amonijaka. Pozicije ostalih, sulfatiranih i hijaluronanskih glikana prikazane su strelicama uz oznake s brojevima. Preuzeto iz Pabst i Altmann, 2008.



Osim primjene kao stacionarne faze u kromatografskim kolonama, PGC također ima mogućnost uporabe kao specifični adsorbens i materijal za selektivnu izolaciju i ukoncentriravanje analita iz kompleksnih matriksa pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE), mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) i disperzije na čvrstom matriksu (MSPD) kao primijenjenih metoda (Michel i Buzsewski, 2009). Iako nedavne publikacije pokazuju kako tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC) također može biti upotrebljena u jednake svrhe, PGC ima prednost zbog robusnosti, duljeg trajanja kolone i kompatibilnosti sa širokim područjem pH vrijednosti (Jensen i sur., 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Uz lipide, proteine i nukleinske kiseline, glikani su jedna od četiri glavne vrste bioloških molekula u živim organizmima (Stern i Jadrzejas, 2008). Većina plazmatskih proteina posttranslacijski je modificirana N-glikanima, koji utječu na njihovo smatanje, poluživot, interakcije i imunološke funkcije (Ruhaak i sur., 2014). Budući da N-glikom predstavlja jedinstvenu poveznicu između genskih predispozicija za nastanak određenih bolesti i okolišnih faktora kojima se organizam izlaže, danas se sve više naglašava mogućnost njegove uporabe kao biomarkera u preventivnoj i personaliziranoj medicini (Russell i sur., 2018). Zbog toga se zadnjih nekoliko godina javila potreba za razvojem brzih, detaljnih i osjetljivih metoda analize glikana koji se pojavljuju na glikoproteinima i tkivima (Pabst i Altmann, 2008). Kao metoda izbora za kvantitativnu analizu odabrana je UPLC-FLR zbog prednosti koje je pokazala u odnosu na ostale metode, osobito robusnosti, učestalosti korištenja, cijene te pouzdane kvantifikacije N-glikana, uključujući sijalinizirane N-glikane (Huffman i sur., 2014). No zbog činjenice da glikanske strukture pokazuju veliku heterogenost, individualne glikoforme obično su prisutne u vrlo niskim koncentracijama. Imajući na umu da upravo glikani prisutni u niskim koncentracijama, kao što su kiseli anionski N-glikani sa sijalinskim kiselinama, fosfatnim ili sulfatnim skupinama, imaju najveću biološku važnost (Wang i sur., 2017), za pouzdanu kvantifikaciju potrebno je upotrijebiti i metodu za ukoncentriravanje N-glikana. Kao materijal izbora uzet je PGC koji pruža povećanu retenciju hidrofilnih analita zbog polarnog retencijskog efekta na grafitu i posljedično omogućava snažno zadržavanje sijaliniziranih N-glikana. Razvoj takve metode omogućio bi pouzdanu kvantifikaciju N-glikana prisutnih u uzorcima, uključujući sijalinizirane N-glikane prisutne u niskim koncentracijama, a koji imaju veliku važnost u upalnim bolestima i stanjima (Kaneko i sur., 2006).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci

U procesu optimiziranja metode korišteno je više različitih uzoraka. Kombinirani uzorci plazme (eng. pool) zdravih dobrovoljaca korišteni su prilikom prilagodbe uvjeta metode kako bi se obuhvatila analiza kompleksnih glikana. Nakon prilagodbe uvjeta, korišten je IgG prethodno izoliran iz uzoraka plazme te standardni IgG (reagent grade,  $\geq 95\%$ , essentially salt-free, lyophilized powder, Sigma-Aldrich) za daljnju optimizaciju i provjeru sposobnosti metode da ukoncentrira uzorke glikana.

#### 3.2. Materijali

KEMIKALIJE	PROIZVOĐAČ
acetonitril hladni, 96 %	Fluka
acetonitril HPLC čistoće (ACN)	Avantor
2-aminobenzamid	Sigma-Aldrich
amonijak (NH <sub>4</sub> OH)	Emsure
dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich
etanol (EtOH), 70 %	Sigma-Aldrich
formijatna kiselina (FA), 98-100 %	Emsure
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
ledena octena kiselina (HAc), 100 %	Emsure
metanol (MeOH), > 99 %	Sigma-Aldrich
natrijev dodecil sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
2-pikolin boran (PB)	Sigma-Aldrich
prokainamid hidroklorid	Sigma-Aldrich
trifluorooctena kiselina (TFA), 99-100 %	Sigma-Aldrich

ENZIMI	PROIZVOĐAČ
PNGaza F	Prozyme

OTOPINE I PUFERI	PROIZVOĐAČ
amonijev formijat, 2M, pH 4,4	300 ml ultra čiste vode pročišćene Milli-Q sustavom za pročišćavanje ulije se u bocu od 500 ml i doda se 37,75 ml FA. Otopina se ohladi i uz miješanje se doda 75 ml NH <sub>4</sub> OH do pH 4,2. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu doda se ostatak NH <sub>4</sub> OH do pH 4,4. Ukupni volumen pufera iznosi 500 ml.
4 % Igepal	4 ml Igepala doda se u 80 ml ultra čiste vode pročišćene Milli-Q sustavom za pročišćavanje te se otopi pri 65 °C uz miješanje. Nakon otapanja nadopuni se ultra čistom vodom do 100 ml, koliko iznosi ukupni volumen otopine.
5xPBS	50 ml 10xPBS-a pomiješa se u menzuri s 50 ml ultra čiste vode pročišćene Milli-Q sustavom za pročišćavanje. Ukupni volumen otopine iznosi 100 ml.
30 % octena kiselina u DMSO-u	750 µl octene kiseline pomiješa se s 1750 µl DMSO. Ukupni volumen otopine iznosi 2500 µl.
otopina 2-aminobenzamida (2-AB)	25 µl 30 % octene kiseline u DMSO-u doda se u 0,48 mg 2-AB-a te se vorteksira do potpunog otapanja. Zatim se doda 1,12 mg 2-pikolin borana i ponovno vorteksira do potpunog otapanja. Volumen otopine odgovara količini potrebnoj za jedan uzorak.
otopina prokainamida (ProA)	25 µl 30 % octene kiseline u DMSO-u doda se u 0,96 mg ProA te vorteksira do potpunog otapanja. Zatim se doda 1,12 mg 2-pikolin borana i ponovno vorteksira do potpunog otapanja. Volumen otopine

	odgovara količini potrebnoj za jedan uzorak.
2 % SDS	2 g SDS-a otopi se u 100 ml vode, što odgovara konačnom volumenu otopine.
suspenzija grafita	500 mg grafita iz Extract-Clean™ SPE Carbograph kolone pomiješa se s 10 ml vode kako bi se dobila suspenzija koncentracije 50 mg/ml.

### 3.3. Oprema

OPREMA	PROIZVOĐAČ
1 ml AcroPrep 96 GHP 0,2 µm filter pločica	Pall
ABgene PCR pločica	Thermo Fisher
AB54-S analitička vaga	Mettler Toledo
C18 nastavak za pipete	Merck
Extract-Clean™ SPE Carbograph kolone	Grace
5415 D centrifuga	Eppendorf
Highland analitička vaga	ADAM
Milli-Q sistem za pročišćavanje vode	Merck
Obične te multikanalne mikropipete i nastavci	Ranin
1 ml polipropilenske pločice za 96 uzoraka	Waters
Tresilica	GFL
Vacuum Manifold vakuumska pumpa	Pall
Waters Acquity UPLC instrument	Waters

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Priprema uzoraka

Uzorci glikana plazme i izolirani IgG pripremljeni su na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju prije početka razvoja metode. Uzorci plazme pripremljeni su vorteksiranjem i centrifugiranjem uzoraka 3 minute na 13400 rpm. Izolirani IgG pripremljen je korištenjem Protein G Monolithic pločice.

### 3.4.2. Denaturacija

2 % SDS, 4 % Igepal i 5xPBS izvade se iz hladnjaka na sobnu temperaturu. U svaki uzorak plazme doda se 20  $\mu$ l 2 % SDS-a, a u svaki uzorak IgG-a 30  $\mu$ l 1,33 % SDS-a te se uzorci promiješaju pipetiranjem. Pločica s uzorcima prekrije se adhezivnom folijom i inkubira 10 minuta na 65 °C te zatim izvadi i ostavi hladiti 30 minuta na sobnoj temperaturi. U svaki uzorak nakon toga se doda 10  $\mu$ l 4 % Igepala i promiješa pipetiranjem. Pločica se ostavi na tresilici uz blago protresanje tijekom 15 minuta. U svim koracima koriste se nastavci za pipete od 250  $\mu$ l.

### 3.4.3. Deglikozilacija

Otopina enzima pripremi se miješanjem 10  $\mu$ l 5xPBS-a s 0,12  $\mu$ l PNGaze F po uzorku. Koristeći nastavke za pipete od 250  $\mu$ l, svakome se uzorku zatim doda 10  $\mu$ l otopine enzima i promiješa pipetiranjem. Pločica s uzorcima u potpunosti se prekrije adhezivnom folijom i uzorci se inkubiraju 18 sati na 37 °C.

### 3.4.4. Priprema otopina 2-aminobenzamida i prokainamida

Otopina 2-AB za obilježavanje jednog uzorka priprema se dodatkom 25  $\mu$ l 30 % octene kiseline u DMSO-u u 0,48 mg 2-AB-a te vorteksiranjem do potpunog otapanja. Zatim se doda 1,12 mg 2-pikolin borana i ponovno vorteksira do potpunog otapanja. Otopina ProA za obilježavanje jednog uzorka priprema se dodatkom 25  $\mu$ l 30 % octene kiseline u DMSO-u u 0,96 mg ProA te vorteksiranjem do potpunog otapanja. Zatim se doda 1,12 mg 2-pikolin borana i ponovno vorteksira do potpunog otapanja.

### 3.4.5. Obilježavanje uzoraka

U svaki uzorak doda se 25  $\mu$ l otopine 2-AB ili ProA i promiješa pipetiranjem. Pločica se prekrije adhezivnom folijom i trese 10 minuta na tresilici, a zatim inkubira 2 sata na 65 °C. Nakon što je inkubacija završena, pločica se izvadi i ostavi hladiti 30 minuta na sobnoj temperaturi sve dok uzorak nije spreman za nanošenje na 1 ml AcroPrep GHP 0,2  $\mu$ m filter pločicu.

### 3.4.6. Predpriprema GHP pločice

Koristeći nastavke za pipete od 300  $\mu$ l, u svaku jažicu GHP pločice pipetira se 200  $\mu$ l 70 % etanola te se eluat vakuumira u otpad. Koristeći iste nastavke, u svaku jažicu GHP pločice pipetira se 200  $\mu$ l ultra čiste vode te se eluat ponovno vakuumira u otpad. Postupak

pipetiranja 200  $\mu$ l u svaku jažicu GHP pločice te vakuumiranja eluata u otpad na kraju se ponovi s hladnim 96 % ACN-om.

#### 3.4.7. Nanošenje i pročišćavanje obilježenih N-glikana na GHP pločici

U svaki uzorak, koristeći zasebni nastavak za pipete od 1 ml, dodaje se 700  $\mu$ l hladnog 100 % ACN-a. Uzorak se promiješa pipetiranjem i zatim se cijeli volumen istim nastavkom pažljivo prebaci u jažicu GHP pločice. Pločica se inkubira 2 minute, a nakon toga se vakuumira u otpad. U svaku jažicu GHP pločice zatim se pipetira 200  $\mu$ l hladnog 96 % ACN-a i vakuumira u otpad te se postupak ponovi još 3 puta. GHP pločica postavi se na vrh stalka 1 ml ili 2 ml pločice i pipetira se 200  $\mu$ l hladnog 96 % ACN-a u svaku jažicu GHP pločice. U završnom koraku pločica se centrifugira 5 minuta na 1000 rpm.

#### 3.4.8. Eluiranje označenih N-glikana

GHP pločica stavi se na vrh čiste ABgene PCR pločice. Koristeći nastavke za pipete od 300  $\mu$ l, u svaki se uzorak doda 90  $\mu$ l ultra čiste vode te se pločica 15 minuta tresu na tresilici. GHP pločica zatim se centrifugira 5 minuta na 1000 rpm da bi se sakupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Cijeli postupak još se jednom ponovi kako bi se sakupila druga frakcija eluata u PCR pločicu. Nakon toga provjeri se je li ukupan volumen eluata jednak 180  $\mu$ l, odnosno je li elucija potpuna, te se PCR pločica zatvori PCR poklopcem i spremi u zamrzivač.

#### 3.4.9. Ukoncentriravanje N-glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Ukoncentriravanje N-glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi provedeno je prema postojećem protokolu, originalno korištenom za dodatno pročišćavanje i zaštitu kapilarne ili nano kolone od čestica zaostalih nakon ionske izmjene (Jensen i sur., 2012).

U prvom koraku protokola (Jensen i sur., 2012) grafit se ukloni iz spremnika i prebaci u epruvetu te se pripremi metanolna suspenzija koncentracije 50 mg/ml. 25  $\mu$ l dobivene suspenzije pipetira se u prazne C18 nastavke za pipete kako bi se dobila mala PGC kolona. Nastavci se zatim stave u Eppendorf epruvete te se stave centrifugirati kako bi se formirale kompaktne kolone i uklonile manje čestice. Sadržaj epruvete zatim se odbaci. Kolona se ispire i centrifugira 3 puta s 50  $\mu$ l acetonitrila koji sadrži 0,1 % (vol/vol) TFA te 3 puta s 50  $\mu$ l vode koja sadrži 0,1 % (vol/vol) TFA. Sadržaj epruvete se odbaci. Zatim se na kolonu nanese uzorak otopljen u 10  $\mu$ l 0,1 % (vol/vol) TFA i ispire centrifugiranjem 3 puta s 50  $\mu$ l vode koja sadrži 0,1 % (vol/vol) TFA. Sadržaj epruvete se nakon centrifugiranja odbaci.

Glikani, koji su sada vezani za PGC kolonu, eluiraju se 2 puta s 10  $\mu$ l 50 % acetonitrila koji sadrži 0,1 % (vol/vol) TFA. U zadnjem koraku eluirani se uzorak osuši u SpeedVac koncentratoru.

Prije početka eksperimenta pojedini su koraci navedenog protokola (Jensen i sur., 2012) modificirani. Umjesto 25  $\mu$ l suspenzije grafita u metanolu, u svaki se nastavak pipetira 50  $\mu$ l. Ispiranje kolone acetonitrirom i vodom provodi se 2 puta sa 60  $\mu$ l, a ispiranje uzorka 1 puta sa 60  $\mu$ l. Glikani se s kolone eluiraju volumenom od 40  $\mu$ l, a koristi se 75 % acetonitril.

#### 3.4.10. Analiza izoliranih N-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom

N-glikani proteina plazme te N-glikani IgG-a analizirani su metodom HILIC-UPLC-FLR na Waters Acquity UPLC instrumentu, uz korištenje HILIC kolone veličine 2,1x150 mm i veličine čestica 1,7  $\mu$ m za analizu N-glikana ukupnih plazmatskih proteina te HILIC kolone veličine 2,1x100 mm i veličine čestica 1,7  $\mu$ m za analizu N-glikana IgG-a. Korištena je gradijentna elucija, gdje je otapalo A 100 mM amonijev formijat pri pH 4,4, a otapalo B ACN. Za postavljanje uvjeta korišten je softver Empower. Uvjeti analize bili su sljedeći: linearni gradijent acetonitrila 70–53 % (v/v) s brzinom protoka 0,561 ml/min tijekom 25 minuta za N-glikane ukupnih plazmatskih proteina te linearni gradijent acetonitrila 75-62 % (v/v) s brzinom protoka 0,4 ml/min tijekom 27 minuta za N-glikane IgG-a.

Fluorescentni detektor postavljen je na valnu duljinu od 250 nm za ekscitaciju i valnu duljinu od 428 nm za emisiju za glikane obilježene 2-aminobenzamidom te na valnu duljinu od 310 nm za ekscitaciju i valnu duljinu od 370 nm za emisiju za glikane obilježene prokainamidom. Temperatura kolone postavljena je na 25 °C za analizu glikana ukupnih plazmatskih proteina i 60 °C za analizu glikana IgG-a, a temperatura uzoraka na 15 °C. Nakon završetka svake od analiza podaci su obrađeni u softveru Empower ručnom integracijom površine vršaka dobivenih kromatograma.



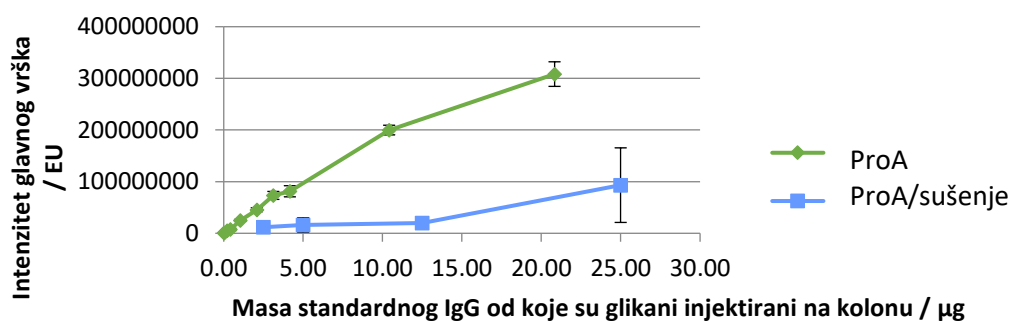
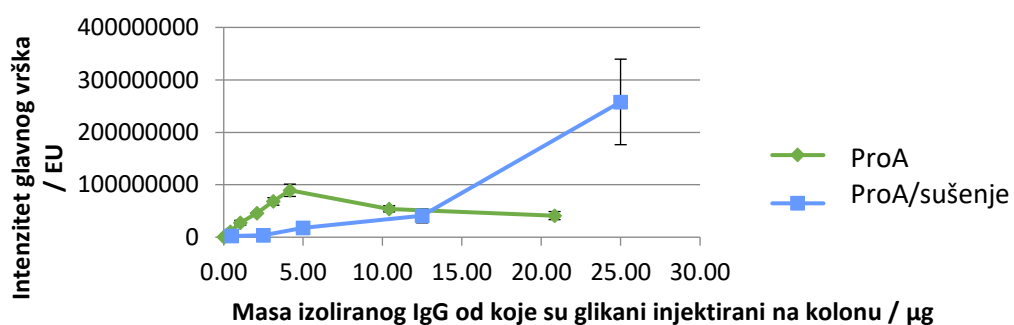
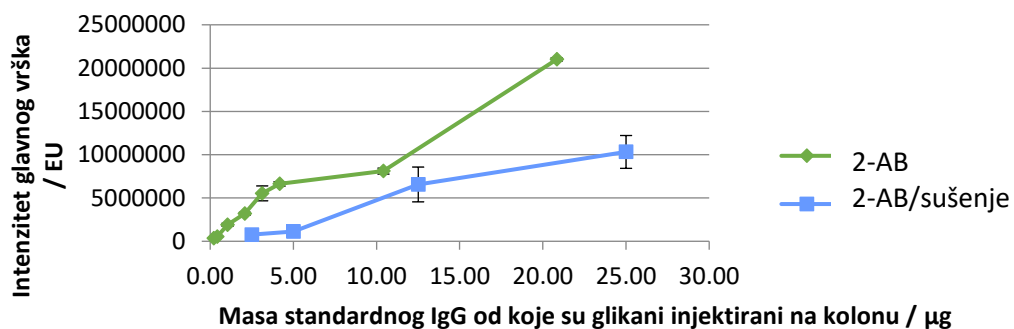
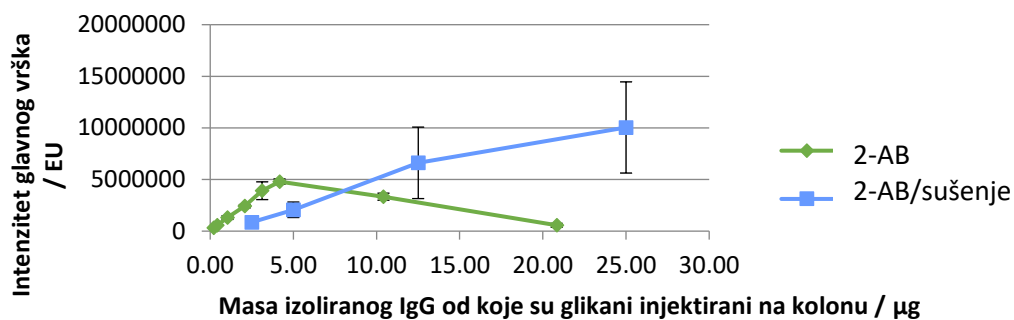
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Prethodna istraživanja provedena na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju, na izoliranom i standardnom IgG-u, ispivala su sušenje glikana kao metodu za njihovo ukoncentriravanje. Dobiveni rezultati tih eksperimenata prikazani su u Tablici 2 te na Slici 7.

**Tablica 2. Utjecaj sušenja glikana na ponovljivost.**

U tablici su prikazane vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) površina glikanskih vršaka normaliziranih na ukupnu površinu, dobivenih UPLC analizom izoliranog i standardnog IgG-a obilježenog 2-AB-om i ProA-om. Kod računa je korišteno 9 replikata za izolirani i standardni IgG obilježen 2-AB-om, 15 replikata za izolirani IgG obilježen ProA-om te 11 replikata za standardni IgG obilježen ProA-om. Sivom bojom označeni su koeficijenti varijacije veći od 5 %.

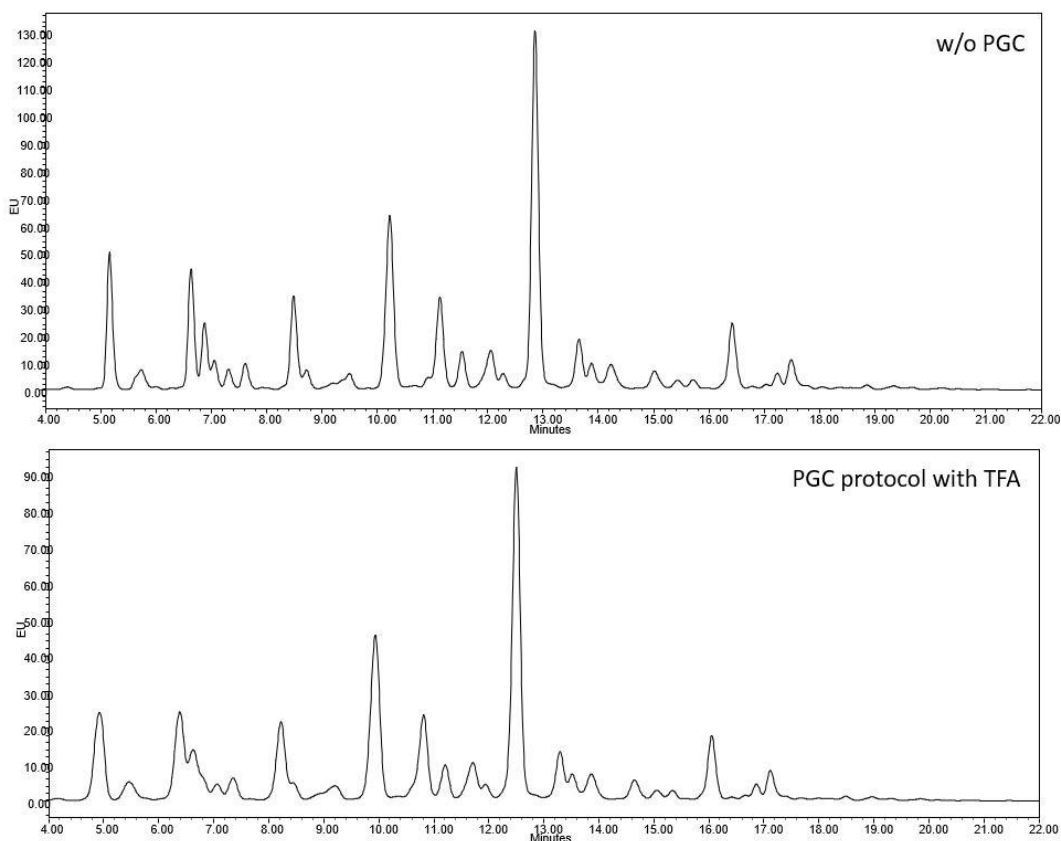
	<b>izolirani IgG/2-AB</b>	<b>standardni IgG/2-AB</b>	<b>izolirani IgG/ProA</b>	<b>standardni IgG/ProA</b>
VRŠAK	CV			
<b>GP1</b>	20.0 %	32.0 %	41.0 %	19.0 %
<b>GP2</b>	10.5 %	18.4 %	23.7 %	15.5 %
<b>GP3</b>	11.7 %	26.6 %	56.2 %	56.3 %
<b>GP4</b>	8.7 %	9.2 %	16.4 %	10.5 %
<b>GP5</b>	20.5 %	20.5 %	53.7 %	12.1 %
<b>GP6</b>	6.1 %	5.8 %	9.1 %	5.9 %
<b>GP7</b>	10.5 %	7.4 %	14.3 %	6.9 %
<b>GP8</b>	4.4 %	2.9 %	5.2 %	3.0 %
<b>GP9</b>	4.2 %	3.6 %	4.9 %	2.8 %
<b>GP10</b>	4.0 %	2.4 %	4.2 %	3.0 %
<b>GP11</b>	8.5 %	2.9 %	21.5 %	15.3 %
<b>GP12</b>	5.9 %	4.6 %	9.5 %	11.7 %
<b>GP13</b>	12.4 %	14.7 %	22.3 %	16.1 %
<b>GP14</b>	8.2 %	10.3 %	12.3 %	9.6 %
<b>GP15</b>	10.7 %	8.9 %	15.2 %	12.6 %
<b>GP16</b>	11.3 %	12.6 %	22.1 %	12.7 %
<b>GP17</b>	20.3 %	15.8 %	27.2 %	17.1 %
<b>GP18</b>	22.7 %	21.9 %	31.1 %	20.8 %
<b>GP19</b>	30.3 %	21.7 %	37.4 %	25.2 %
<b>GP20</b>	52.0 %	65.1 %	69.3 %	31.5 %
<b>GP21</b>	33.3 %	26.3 %	50.1 %	27.2 %
<b>GP22</b>	36.2 %	55.4 %	62.4 %	30.8 %
<b>GP23</b>	42.6 %	32.0 %	45.6 %	33.3 %
<b>GP24</b>	47.3 %	32.4 %	48.8 %	35.7 %
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>18.4 %</b>	<b>18.9 %</b>	<b>29.3 %</b>	<b>18.1 %</b>



Slika 7. Usporedba intenziteta glavnog vrška za neukoncentrirane glikane obilježene 2-AB-om i ProA-om (2-AB, ProA; zelena linija) i za glikane obilježene 2-AB-om i ProA-om koji su ukoncentrirani sušenjem (2-AB/sušenje, ProA/sušenje; plava linija) pri različitim masama IgG od kojih su glikani injektirani na kolonu.

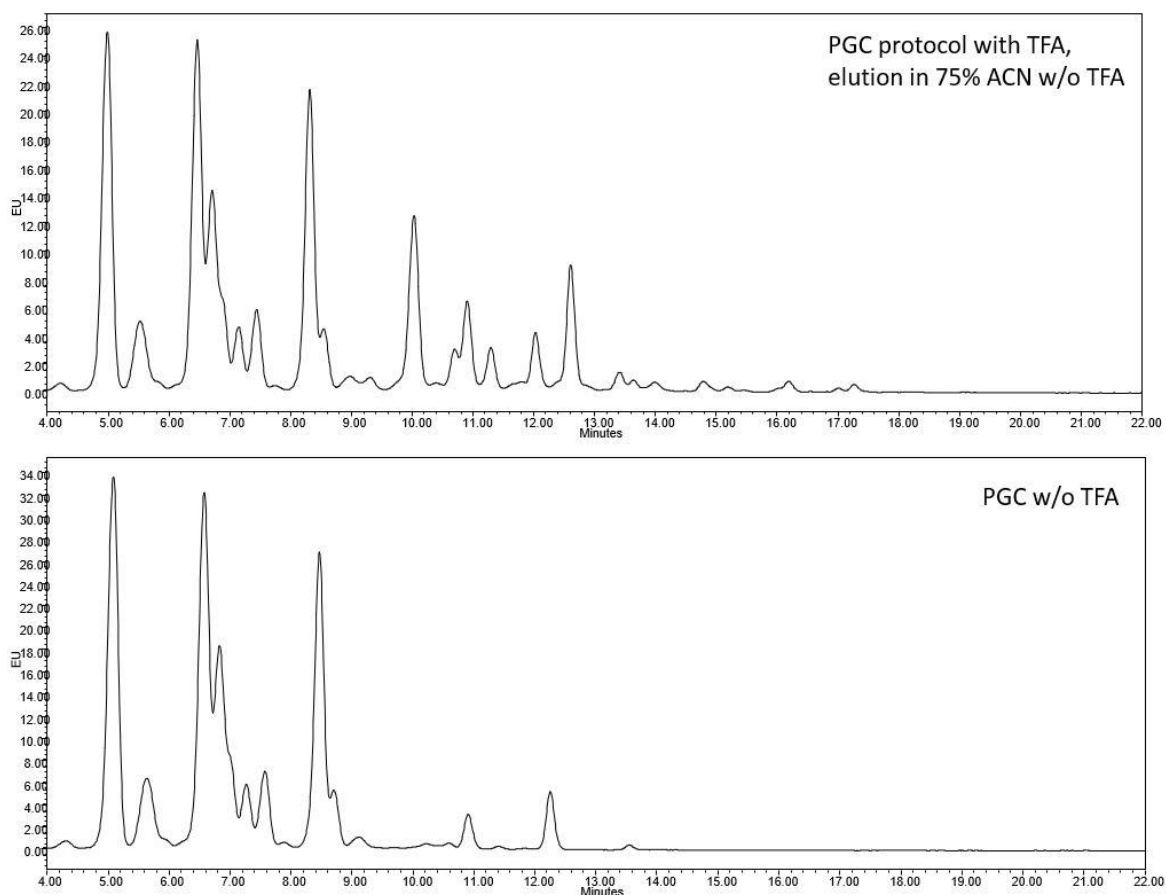
Provedeni eksperimenti pokazali su da sušenje nije prikladna metoda za ukoncentriravanje glikana. Prihvatljiv koeficijent varijacije u ovom slučaju iznosio bi oko 5 %, dok je kod sušenja najmanja dobivena srednja vrijednost koeficijenta varijacije iznosila 18 %. Također, na Slici 7 usporedbom intenziteta glavnih vršaka za neukoncentrirane glikane i glikane ukoncentrirane sušenjem pri različitim masama IgG od kojeg su se glikani injektirali na kolonu, može se uočiti da se sušenjem nije postigao željeni efekt.

Problem osjetljivosti prilikom analize glikana zatim se nastojao riješiti metodom ukoncentriravanja PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Kao uzorak ovaj je put uzeta plazma kako bi se proučio i utjecaj PGC-a na kompleksne glikane, s tri i četiri antene, koji nisu prisutni kod IgG-a. Ekstrakcija se provela prema ranije navedenom protokolu (Jensen i sur., 2012). Iz protokola je izuzet zadnji korak sušenja, a rezultati analize uspoređivani su s kromatogramom dobivenim analizom istog uzorka bez korištenja PGC-a na Slici 8.



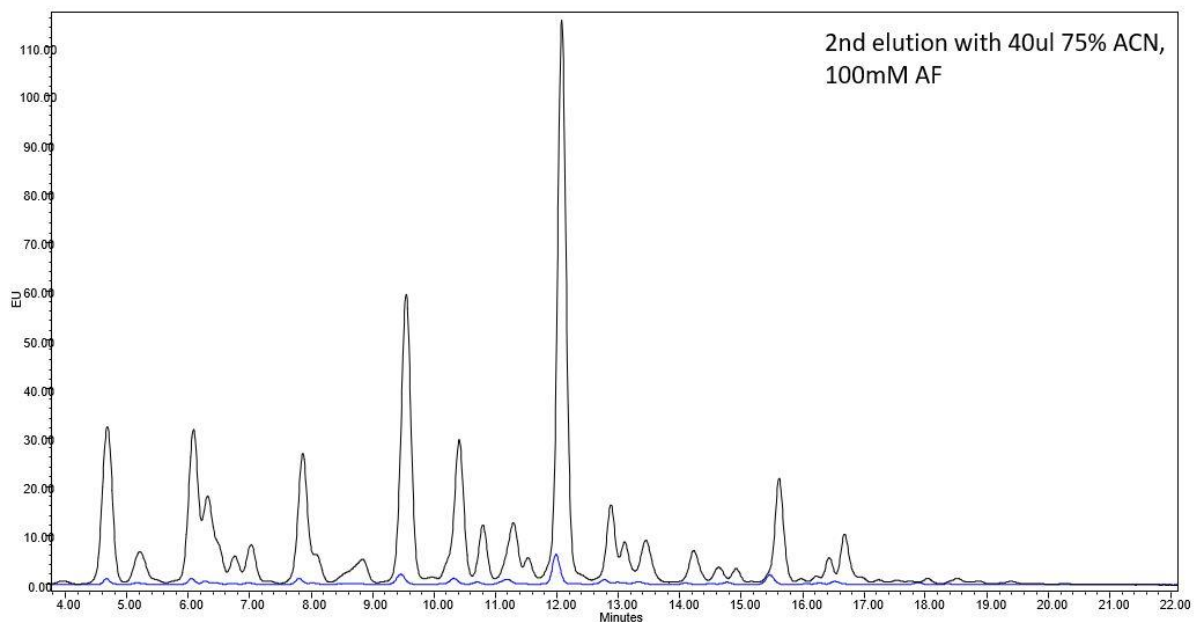
**Slika 8. Usporedba kromatograma dobivenih UPLC analizom uzoraka pripremljenih bez PGC-a (gornji kromatogram, w/o PGC) i s PGC-om uz dodatak TFA (donji kromatogram, PGC protocol with TFA). Kod uzoraka pripremljenih PGC protokolom uz dodatak TFA došlo je do širenja vršaka, osobito na početnom dijelu kromatograma. Dodatak TFA također je utjecao na retencijsko vrijeme.**

Preuzeti protokol uz dodatak TFA uzrokovao je širenje vršaka, što se može objasniti činjenicom da TFA nije prisutna u puferu za kromatografiju te zbog toga utječe na sam proces kromatografije i retencijsko vrijeme. Isproban je modificirani protokol u kojem se TFA izostavlja u zadnjem koraku elucije te modificirani protokol u kojem se uopće ne koristi TFA, a dobiveni kromatogrami prikazani su na Slici 9.



**Slika 9. Kromatogrami dobiveni UPLC analizom uzoraka pripremljenih bez TFA u zadnjem koraku protokola (gornji kromatogram, PGC protocol with TFA, elution in 75 % ACN w/o TFA) te analizom uzoraka pripremljenih izostavljanjem TFA iz cijelog protokola (donji kromatogram, PGC w/o TFA).** Kod oba modificirana protokola došlo je do značajnog širenja vršaka. Kod uzoraka pripremljenih bez TFA u zadnjem koraku protokola došlo je do gubitka dijela glikana koji u svojoj strukturi imaju dvije ili više sijalinske kiseline, a kod uzoraka pripremljenih izostavljanjem TFA iz cijelog protokola glikani koji imaju dvije ili više sijalinske kiseline uopće nisu vidljivi na kromatogramu.

Budući da su modificirani protokoli bez TFA rezultirali kromatogramima na kojima dolazi do djelomičnog ili potpunog nestajanja glikana s dvije ili više sijalinske kiseline, nužno je prilagoditi protokol tako da se izbací TFA, ali zadrži njezina funkcija. Sukladno činjenici da glikani sa sijalinskom kiselinom sve više izlaze s PGC kolone povećanjem ionske jakosti (Pabst i Altmann, 2008), kao zamjena za TFA isproban je AF, pufer korišten u HILIC-UPLC analizi, te AF u različitim koncentracijama uz dodatak FA, koja je korištena u spomenutom radu. Navedene zamjene također bi trebale potaknuti eluciju glikana sa sijalinskom kiselinom s PGC-a tijekom ekstrakcije na čvrstoj fazi, a zbog sličnosti s mobilnom fazom uklonio bi se negativan učinak na proces kromatografije. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 3 i 4. U ovom eksperimentu također je ispitan intenzitet signala nakon elucije druge frakcije glikana s PGC-a, prikazan na Slici 10.



**Slika 10. Intenzitet vršaka nakon elucije druge frakcije glikana (plave boje) u usporedbi s intenzitetom vršaka nakon elucije prve frakcije (crne boje).** Intenzitet vršaka nakon elucije druge frakcije glikana znatno je manji u odnosu na prvu eluciju.

Zbog znatno manjeg intenziteta vršaka dobivenih elucijom druge frakcije glikana, ta se frakcija u idućim eksperimentima zanemaruje i mjerenja se provode isključivo na prvoj frakciji glikana.

**Tablica 3. Srednja vrijednost koeficijenta varijacije (CV) površina glikanskih vršaka, normaliziranih na ukupnu površinu, dobivenih UPLC analizom glikana plazme obilježenih s 2-AB te ukoncentriranih PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz uvjete: 100 mM AF, 100 mM AF + FA, 200 mM AF + FA. Kod računa je korišten triplikrat. Sivom bojom označeni su koeficijenti varijacije veći od 5 %. Posebno je izračunata vrijednost za glikane sa sijalinskom kiselinom (SK).**

	<b>100mM AF</b>	<b>100 mM AF + FA</b>	<b>200 mM AF + FA</b>
<b>VRŠAK</b>	<b>CV (2-AB)</b>		
<b>GP1</b>	1.5 %	1.5 %	0.6 %
<b>GP2</b>	3.5 %	2.2 %	3.5 %
<b>GP3</b>	21.7 %	24.1 %	39.6 %
<b>GP4</b>	8.0 %	8.2 %	12.3 %
<b>GP5</b>	1.7 %	6.7 %	15.2 %
<b>GP6</b>	22.6 %	19.8 %	19.2 %
<b>GP7</b>	2.4 %	1.8 %	4.2 %
<b>GP8</b>	1.0 %	2.0 %	1.3 %
<b>GP9</b>	4.3 %	4.2 %	22.4 %
<b>GP10</b>	4.0 %	3.8 %	4.5 %
<b>GP11</b>	13.5 %	8.3 %	15.4 %
<b>GP12</b>	15.3 %	23.6 %	14.5 %
<b>GP13</b>	8.5 %	9.8 %	8.1 %
<b>GP14</b>	1.0 %	1.0 %	0.6 %
<b>GP15</b>	2.9 %	5.2 %	12.4 %
<b>GP16</b>	0.2 %	0.8 %	0.8 %
<b>GP17</b>	0.2 %	0.5 %	0.2 %
<b>GP18</b>	0.5 %	1.3 %	1.1 %
<b>GP19</b>	3.6 %	3.5 %	6.1 %
<b>GP20</b>	0.8 %	0.2 %	0.4 %
<b>GP21</b>	14.8 %	4.2 %	5.0 %
<b>GP22</b>	0.8 %	0.5 %	2.0 %
<b>GP23</b>	2.3 %	2.2 %	4.2 %
<b>GP24</b>	2.6 %	2.4 %	1.1 %
<b>GP25</b>	0.7 %	1.2 %	0.9 %
<b>GP26</b>	1.4 %	0.7 %	1.3 %
<b>GP27</b>	4.7 %	8.4 %	4.2 %
<b>GP28</b>	18.2 %	7.7 %	18.2 %
<b>GP29</b>	1.5 %	3.3 %	1.2 %
<b>GP30</b>	3.5 %	8.5 %	6.6 %
<b>GP31</b>	2.0 %	3.1 %	2.3 %
<b>GP32</b>	3.2 %	2.5 %	1.5 %
<b>GP33</b>	8.2 %	2.2 %	2.2 %
<b>GP34</b>	5.2 %	2.7 %	2.7 %
<b>GP35</b>	5.3 %	7.9 %	4.1 %
<b>GP36</b>	6.1 %	15.1 %	6.7 %

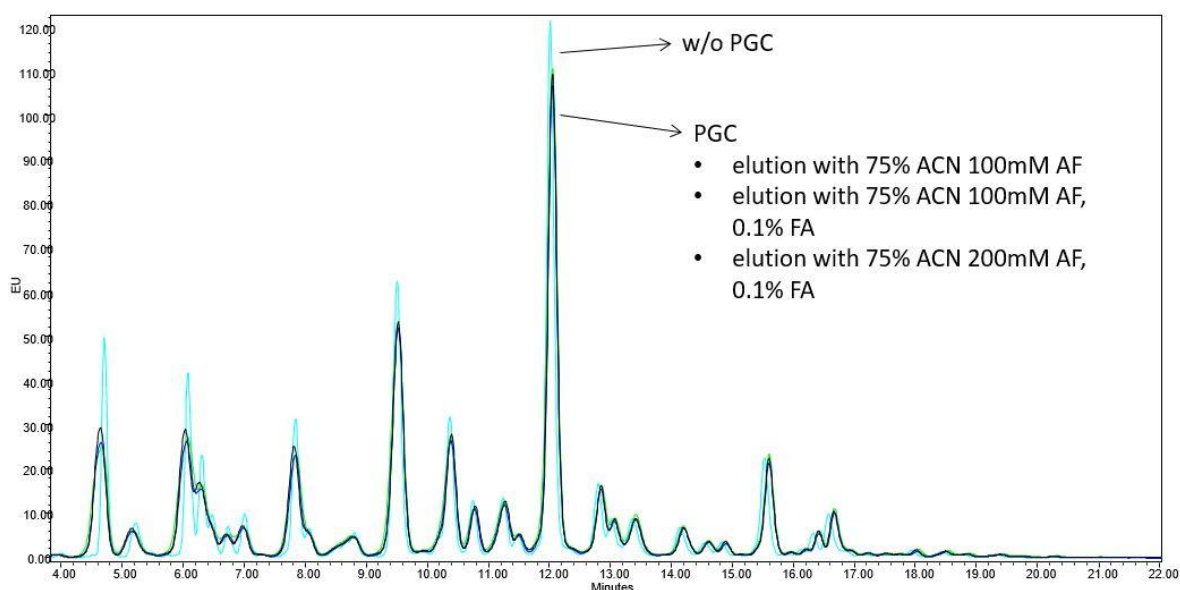
<b>GP37</b>	1.9 %	7.7 %	2.5 %
<b>GP38</b>	1.5 %	8.3 %	1.5 %
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>5.3 %</b>	<b>5.7 %</b>	<b>6.6 %</b>
<b>Srednja vrijednost (SK)</b>	<b>4.4 %</b>	<b>4.7 %</b>	<b>3.6 %</b>

Tablica 4. Srednja vrijednost koeficijenta varijacije (CV) površina glikanskih vršaka, normaliziranih na ukupnu površinu, dobivenih UPLC analizom glikana plazme obilježenih s ProA te ukoncentriranih PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz uvjete: 100 mM AF, 100 mM AF + FA, 200 mM AF + FA. Kod računa je korišten triplikat. Sivom bojom označeni su koeficijenti varijacije veći od 5 %. Posebno je izračunata vrijednost za glikane sa sijalinskom kiselinom (SK).

VRŠAK	100mM AF	100 mM AF + FA	200 mM AF + FA
	CV (ProA)		
<b>GP1</b>	1.2 %	1.7 %	2.1 %
<b>GP2</b>	7.1 %	4.8 %	2.6 %
<b>GP3</b>	19.9 %	30.2 %	33.1 %
<b>GP4</b>	2.5 %	4.8 %	5.7 %
<b>GP5</b>	1.4 %	3.4 %	1.9 %
<b>GP6</b>	4.1 %	16.1 %	6.5 %
<b>GP7</b>	12.2 %	7.6 %	6.1 %
<b>GP8</b>	5.4 %	0.4 %	1.5 %
<b>GP9</b>	14.3 %	0.0 %	7.5 %
<b>GP10</b>	2.0 %	0.4 %	3.0 %
<b>GP11</b>	3.1 %	9.0 %	5.0 %
<b>GP12</b>	1.3 %	0.6 %	1.0 %
<b>GP13</b>	0.3 %	1.2 %	0.4 %
<b>GP14</b>	5.4 %	9.1 %	8.2 %
<b>GP15</b>	0.4 %	0.4 %	0.4 %
<b>GP16</b>	5.3 %	3.5 %	3.4 %
<b>GP17</b>	2.6 %	2.9 %	3.1 %
<b>GP18</b>	0.9 %	1.0 %	0.4 %
<b>GP19</b>	4.1 %	2.1 %	2.2 %
<b>GP20</b>	2.2 %	1.6 %	0.6 %
<b>GP21</b>	1.2 %	3.7 %	5.0 %
<b>GP22</b>	1.2 %	0.7 %	1.1 %
<b>GP23</b>	2.2 %	1.1 %	1.7 %
<b>GP24</b>	3.5 %	2.1 %	2.9 %
<b>GP25</b>	3.8 %	4.1 %	3.9 %
<b>GP26</b>	12.7 %	19.7 %	6.7 %
<b>GP27</b>	1.3 %	3.2 %	3.7 %
<b>GP28</b>	3.2 %	4.6 %	2.9 %
<b>GP29</b>	4.2 %	5.2 %	5.9 %
<b>GP30</b>	0.9 %	4.5 %	3.8 %

GP31	3.4 %	4.5 %	3.6 %
GP32	4.2 %	6.7 %	6.8 %
GP33	2.3 %	3.8 %	4.4 %
GP34	1.5 %	7.1 %	7.6 %
GP35	3.6 %	6.6 %	5.2 %
GP36	2.9 %	5.9 %	6.9 %
Srednja vrijednost	4.1 %	5.1 %	4.6 %
Srednja vrijednost (SK)	3.1 %	4.6 %	4.0 %

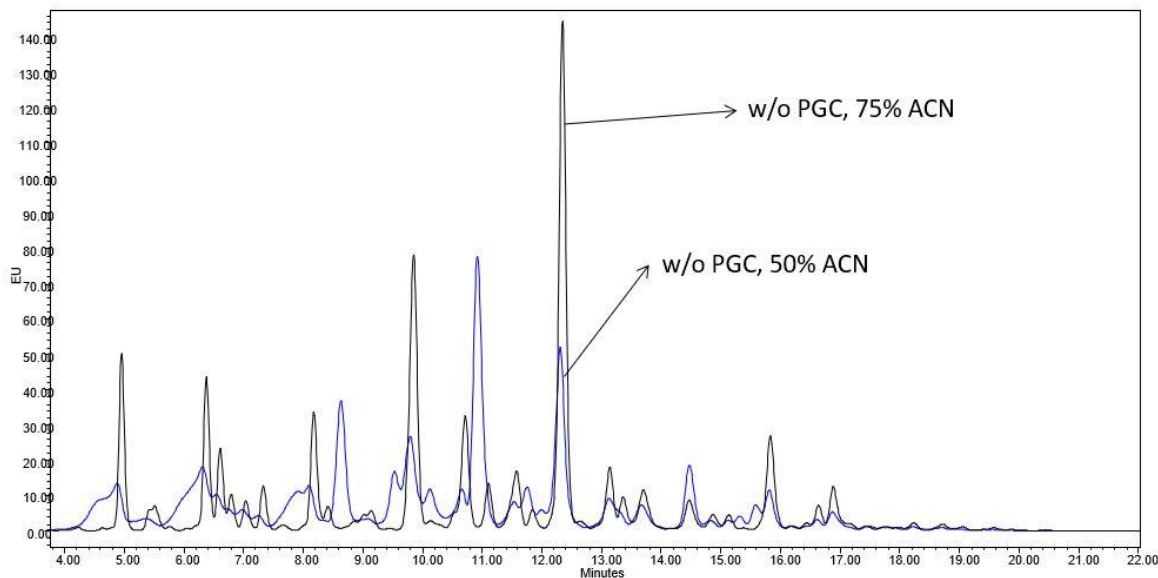
Sve tri isprobane zamjene pokazale su se jednako vrijednima za eluciju glikana sa sijalinskim kiselinama s PGC-a. Kao metoda izbora uzeta je ona koja sadrži samo 100 mM AF, kako bi eluat imao sastav identičan sastavu mobilne faze za kromatografiju. Riješen je problem utjecaja na retencijsko vrijeme, no i dalje preostaje problem širenja vršaka na početnom dijelu kromatograma. Širenje vršaka na početnom dijelu kromatograma vidljivo je na Slici 11.



**Slika 11. Usporedba kromatograma dobivenih mjerenjem uzorka N-glikana proteina plazme obilježenog s 2-AB-om, prirednog bez korištenja PGC-a i uzorka N-glikana proteina plazme, obilježenih s 2-AB-om i ukoncentriranih PGC-om te u zadnjem koraku eluiranih sa 100 mM AF, 100 mM AF + FA ili s 200 mM AF + FA. Vršci pokazuju jednako retencijsko vrijeme. Na početnom dijelu kromatograma vidljivo je širenje vršaka.**

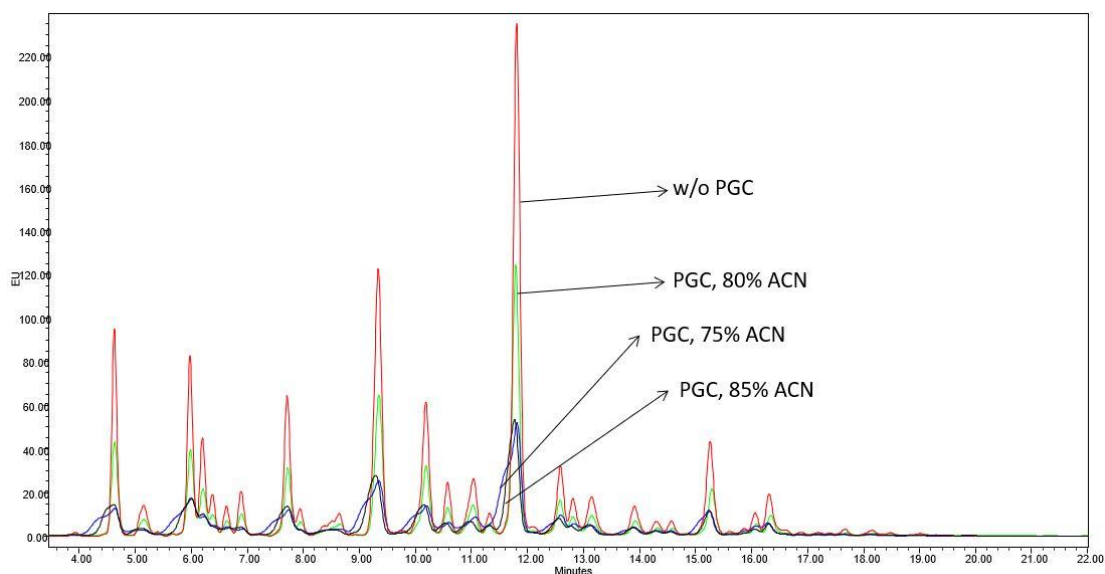


Širenje vršaka nakon korekcije svih ostalih uvjeta metode može se objasniti prisustvom prevelike količine vode u uzorku nakon elucije. Kako bi se ta teorija provjerila, analizirani su neukoncentrirani uzorci sa 75 % ACN-a i 50 % ACN-a, a rezultati su prikazani na Slici 12.



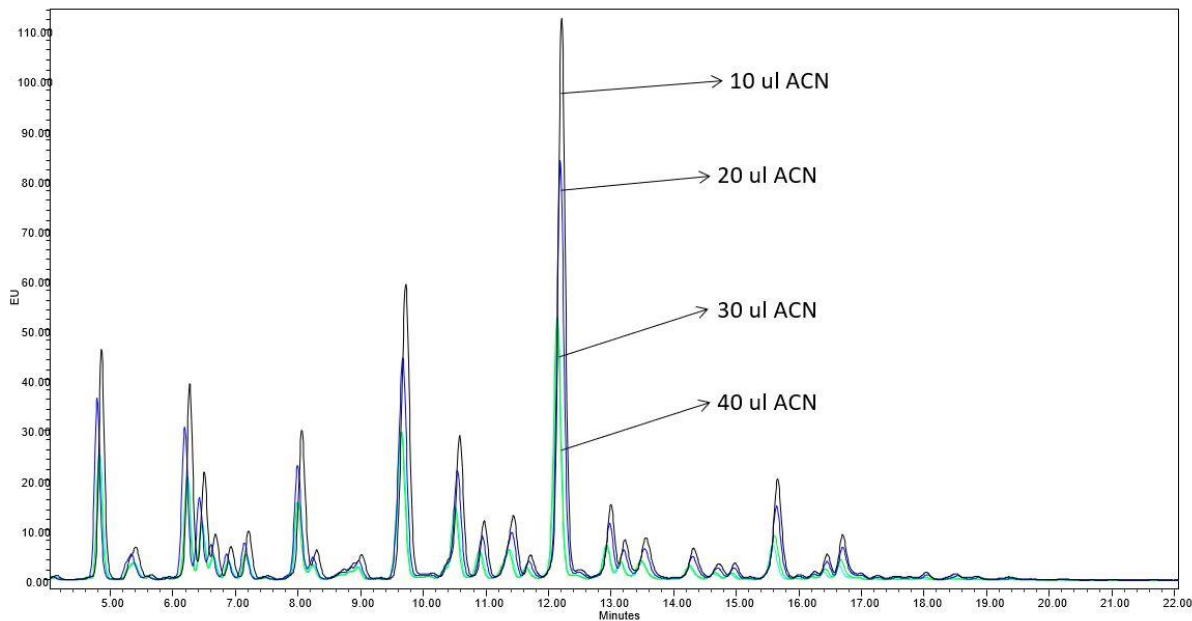
**Slika 12. Usporedba kromatograma dobivenih mjerenjem uzoraka N-glikana proteina plazme obilježenih 2-AB-om, priredeni bez korištenja PGC-a sa 75 % i 50 % ACN-a. Uzorci s 50 % ACN-a pokazuju jako širenje vršaka na početnom dijelu kromatograma.**

Uzorak s 50 % ACN-a, u odnosu na uzorak sa 75 % ACN-a, pokazuje značajnije širenje vršaka na početku kromatograma, koje odgovara širenju vršaka u prethodnim uzorcima. Takav rezultat potvrđuje teoriju da je do efekta širenja vršaka došlo zbog prisustva prevelike količine vode u eluiranom uzorku glikana. U svrhu daljnjeg razjašnjenja problema, analizirali su se uzorci glikana plazme ukoncentrirani PGC-om i eluirani sa 75 % ACN-a, 80 % ACN-a i 85 % ACN-a te se pratilo kako povećanje udjela ACN-a, a smanjenje udjela vode utječe na izgled vršaka. Rezultati mjerenja prikazani su na Slici 13.



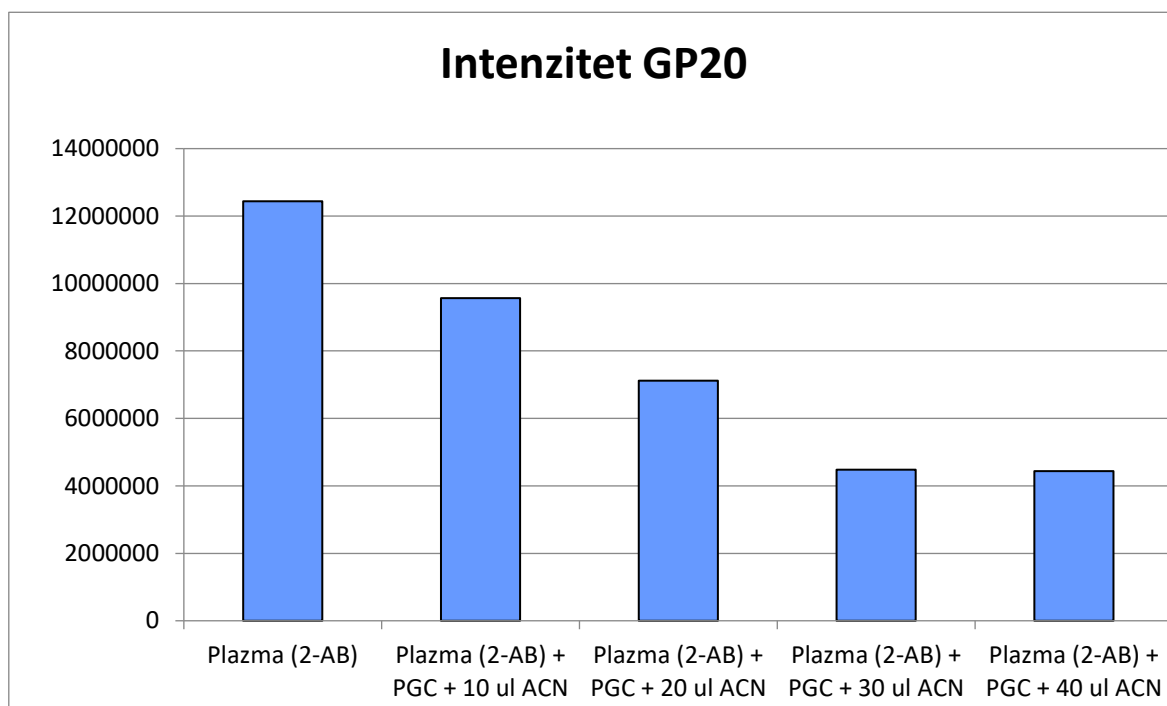
**Slika 13. Usporedba kromatograma dobivenih mjerenjem uzoraka N-glikana proteina plazme označenih 2-AB-om i priređenih ukoncentriravanjem PGC-om sa 75 % ACN-a, 80 % ACN-a i 85 % ACN-a.**

Iz dobivenih kromatograma vidljivo je da povećanje udjela ACN-a u smjesi za eluciju nema željeni učinak na širenje vršaka. Budući da je ranije dokazano da je povećani udio vode u eluatu glikana uzrok problema, stvara se pretpostavka da se dio ACN-a gubi na čvrstoj fazi, odnosno PGC-u. U tom slučaju, umjesto povećanja udjela ACN-a u smjesi za eluciju, određena količina ACN-a dodala bi se naknadno. U eluat glikana plazme dodano je 10  $\mu$ l ACN-a, 20  $\mu$ l ACN-a, 30  $\mu$ l ACN-a i 40  $\mu$ l ACN-a te je provedena kromatografska analiza, čiji su rezultati prikazani na Slici 14.



**Slika 14. Usporedba kromatograma dobivenih mjerenjem uzoraka N-glikana proteina plazme obilježenih 2-AB-om i prirednih ukoncentriranjem PGC-om te naknadnim dodavanjem 10 µl ACN-a, 20 µl ACN-a, 30 µl ACN-a i 40 µl ACN-a u eluat. Postignut je normalan kromatografski profil.**

Naknadnim dodatkom ACN-a u eluat postignut je kromatografski profil bez širenja vršaka na početnom dijelu kromatograma. Intenzitet vršaka smanjivao se s povećanjem količine dodanog ACN-a, što je vidljivo na Slici 15. Ostali rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 5.



**Slika 15. Usporedba intenziteta glavnog vrška dobivenih mjerenjem uzoraka N-glikana proteina plazme obilježenih 2-AB-om i priređenih ukoncentriravanjem PGC-om te naknadnim dodatkom 10  $\mu$ l ACN-a, 20  $\mu$ l ACN-a, 30  $\mu$ l ACN-a i 40  $\mu$ l ACN-a u eluat. Dodatkom veće količine ACN-a smanjuje se intenzitet vrška.**

**Tablica 5. Srednja vrijednost koeficijenta varijacije (CV) površina glikanskih vršaka normaliziranih na ukupnu površinu, dobivenih UPLC analizom glikana plazme obilježenih 2-AB-om, ukoncentriranih PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz eluciju 100 mM AF-om i naknadnim dodatkom 10  $\mu$ l ACN-a, 20  $\mu$ l ACN-a, 30  $\mu$ l ACN-a i 40  $\mu$ l ACN-a u eluat. Kod računa je korišten triplikrat. Sivom bojom označeni su koeficijenti varijacije veći od 5 %.**

	10 $\mu$ l ACN	20 $\mu$ l ACN	30 $\mu$ l ACN	40 $\mu$ l ACN
VRŠAK	CV (2-AB)			
GP1	1.4 %	2.7 %	5.7 %	7.8 %
GP2	1.5 %	2.4 %	6.2 %	8.0 %
GP3	6.9 %	13.3 %	19.2 %	34.6 %
GP4	1.7 %	2.5 %	5.3 %	6.4 %
GP5	0.2 %	1.8 %	3.9 %	5.0 %
GP6	1.4 %	3.2 %	4.7 %	7.3 %

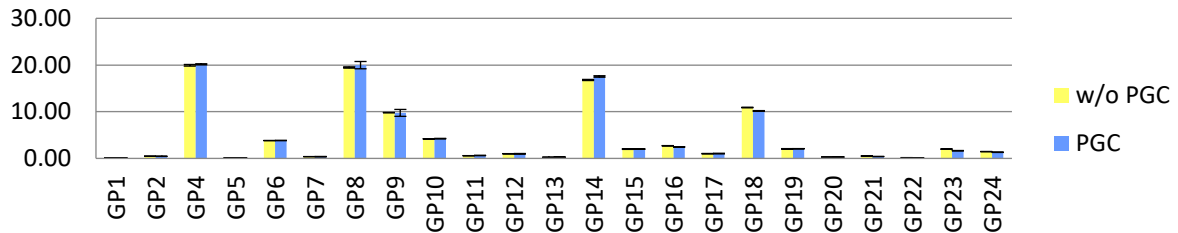
<b>GP7</b>	1.4 %	2.9 %	5.8 %	7.3 %
<b>GP8</b>	1.2 %	2.2 %	4.6 %	6.3 %
<b>GP9</b>	16.1 %	19.7 %	23.1 %	29.5 %
<b>GP10</b>	1.8 %	2.3 %	3.9 %	5.5 %
<b>GP11</b>	0.9 %	1.9 %	3.5 %	2.9 %
<b>GP12</b>	1.2 %	3.2 %	4.4 %	18.3 %
<b>GP13</b>	1.3 %	1.7 %	2.8 %	2.8 %
<b>GP14</b>	0.6 %	1.0 %	1.8 %	3.8 %
<b>GP15</b>	13.2 %	7.3 %	10.3 %	27.5 %
<b>GP16</b>	0.6 %	0.5 %	0.5 %	2.1 %
<b>GP17</b>	1.7 %	1.4 %	1.4 %	2.0 %
<b>GP18</b>	0.5 %	0.7 %	1.1 %	1.1 %
<b>GP19</b>	0.0 %	1.1 %	2.8 %	4.9 %
<b>GP20</b>	0.9 %	1.9 %	3.2 %	1.7 %
<b>GP21</b>	9.7 %	12.1 %	13.0 %	14.9 %
<b>GP22</b>	1.8 %	2.3 %	4.3 %	4.5 %
<b>GP23</b>	0.0 %	1.4 %	3.1 %	3.5 %
<b>GP24</b>	1.5 %	2.0 %	2.7 %	7.3 %
<b>GP25</b>	1.2 %	1.5 %	2.6 %	8.5 %
<b>GP26</b>	2.6 %	2.5 %	3.8 %	10.9 %
<b>GP27</b>	2.2 %	3.6 %	6.1 %	15.1 %
<b>GP28</b>	4.2 %	4.2 %	12.1 %	12.1 %
<b>GP29</b>	1.7 %	3.3 %	6.7 %	17.0 %
<b>GP30</b>	4.7 %	3.5 %	9.8 %	19.8 %
<b>GP31</b>	0.6 %	2.6 %	6.8 %	18.6 %
<b>GP32</b>	2.1 %	3.2 %	8.4 %	21.7 %
<b>GP33</b>	2.2 %	2.2 %	6.7 %	21.7 %
<b>GP34</b>	2.7 %	2.7 %	7.4 %	19.6 %
<b>GP35</b>	3.1 %	1.5 %	9.6 %	22.3 %
<b>GP36</b>	2.8 %	2.8 %	12.8 %	30.8 %
<b>GP37</b>	3.7 %	2.8 %	13.9 %	31.4 %
<b>GP38</b>	2.9 %	2.9 %	16.0 %	39.0 %
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>2.7 %</b>	<b>3.4 %</b>	<b>6.8 %</b>	<b>13.2 %</b>

Dodatkom samo 10  $\mu$ l ACN-a u eluat, postignut je adekvatan kromatografski profil bez širenja vršaka na početnom dijelu kromatograma, uz prisutnost svih glikana sa sijalinskom kiselinom i uz prihvatljiv koeficijent varijacije. Sljedeći korak bio je primijeniti optimiziranu metodu za analizu izoliranog i standardnog IgG-a u različitim koncentracijama, označenog 2-AB-om i ProA-om, kako bi se kvantitativno odredila sposobnost ukoncentriravanja.

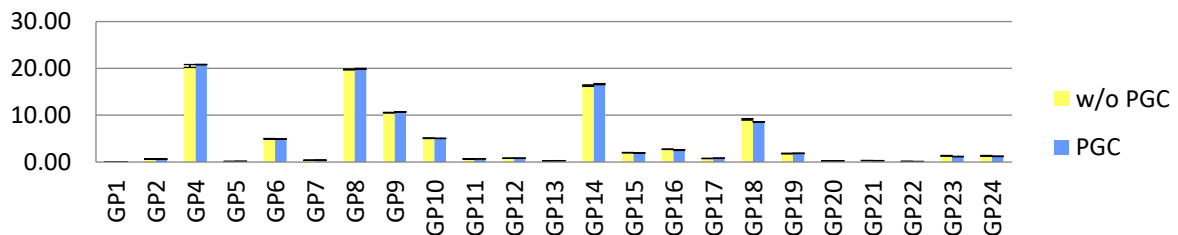
**Tablica 6. Srednja vrijednost koeficijenta varijacije (CV) površina glikanskih vršaka normaliziranih na ukupnu površinu, dobivenih UPLC analizom glikana izoliranog i standardnog IgG obilježenih 2-AB-om i ProA-om te ukoncentriranih PGC-om.** Sivom bojom označeni su koeficijenti varijacije veći od 5 %. Glikanski vršak 5 izostavljen je za ProA jer se ne pojavljuje na kromatogramu. U eksperimentu gdje su glikani obilježeni 2-AB-om isprobane su koncentracije od 1 µg, 5 µg, 10 µg i 25 µg izoliranog i standardnog IgG-a, a u eksperimentu gdje su obilježeni ProA-om isprobane su koncentracije od 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg i 5 µg izoliranog i standardnog IgG-a. Kod računa je korišten triplikat.

	<b>izolirani IgG/2-AB</b>	<b>standardni IgG/2-AB</b>	<b>izolirani IgG/ProA</b>	<b>standardni IgG/ProA</b>
<b>VRŠAK</b>	<b>CV</b>			
<b>GP1</b>	6.3 %	6.8 %	9.2 %	13.7 %
<b>GP2</b>	4.0 %	1.4 %	8.2 %	3.2 %
<b>GP4</b>	0.6 %	0.2 %	1.9 %	1.2 %
<b>GP5</b>	7.5 %	4.0 %	-	-
<b>GP6</b>	1.1 %	0.4 %	0.3 %	1.1 %
<b>GP7</b>	14.3 %	3.4 %	9.9 %	1.5 %
<b>GP8</b>	3.9 %	0.5 %	1.5 %	2.8 %
<b>GP9</b>	7.6 %	0.3 %	1.1 %	2.3 %
<b>GP10</b>	1.5 %	0.2 %	2.2 %	3.6 %
<b>GP11</b>	7.0 %	1.3 %	1.5 %	4.3 %
<b>GP12</b>	5.8 %	2.6 %	3.6 %	3.1 %
<b>GP13</b>	10.8 %	7.8 %	7.3 %	5.4 %
<b>GP14</b>	0.9 %	0.7 %	2.5 %	3.9 %
<b>GP15</b>	1.7 %	1.5 %	2.0 %	2.8 %
<b>GP16</b>	1.5 %	2.3 %	3.2 %	10.7 %
<b>GP17</b>	6.6 %	3.3 %	4.1 %	6.1 %
<b>GP18</b>	0.8 %	0.5 %	2.3 %	9.3 %
<b>GP19</b>	1.5 %	2.6 %	3.2 %	9.3 %
<b>GP20</b>	7.4 %	7.1 %	11.0 %	19.6 %
<b>GP21</b>	7.0 %	4.6 %	3.6 %	11.3 %
<b>GP22</b>	9.9 %	7.4 %	2.6 %	8.5 %
<b>GP23</b>	2.3 %	2.6 %	3.6 %	11.4 %
<b>GP24</b>	2.8 %	3.6 %	3.3 %	11.4 %
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4.9 %</b>	<b>2.8 %</b>	<b>4.0 %</b>	<b>6.7 %</b>

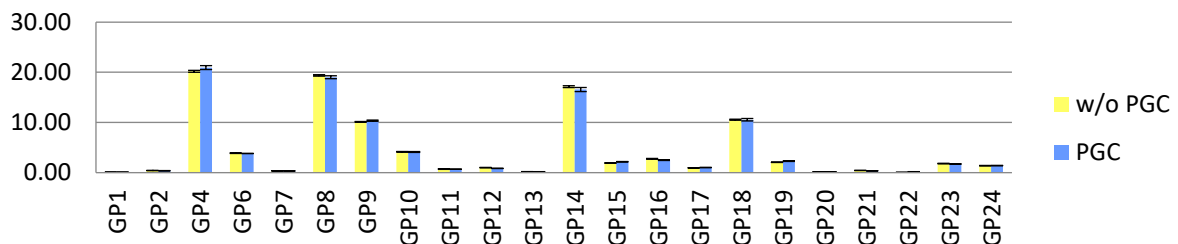
## 2-AB izolirani IgG



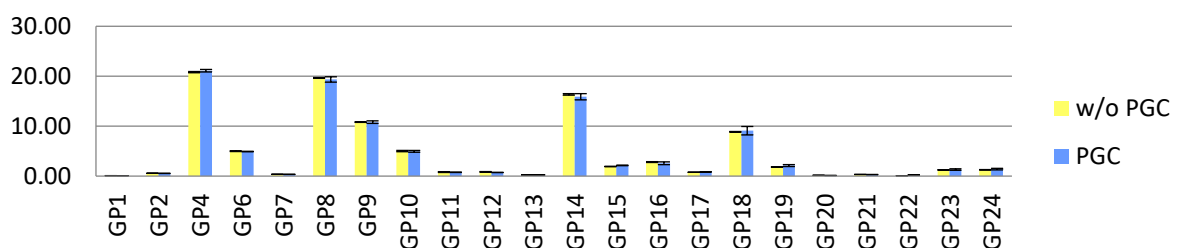
## 2-AB standardni IgG



## ProA izolirani IgG

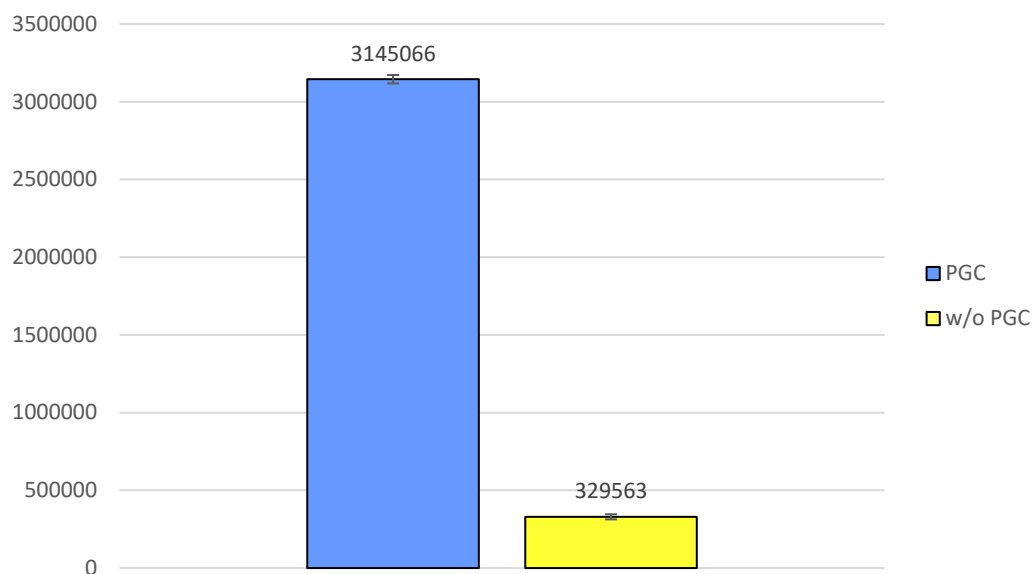


## ProA standardni IgG

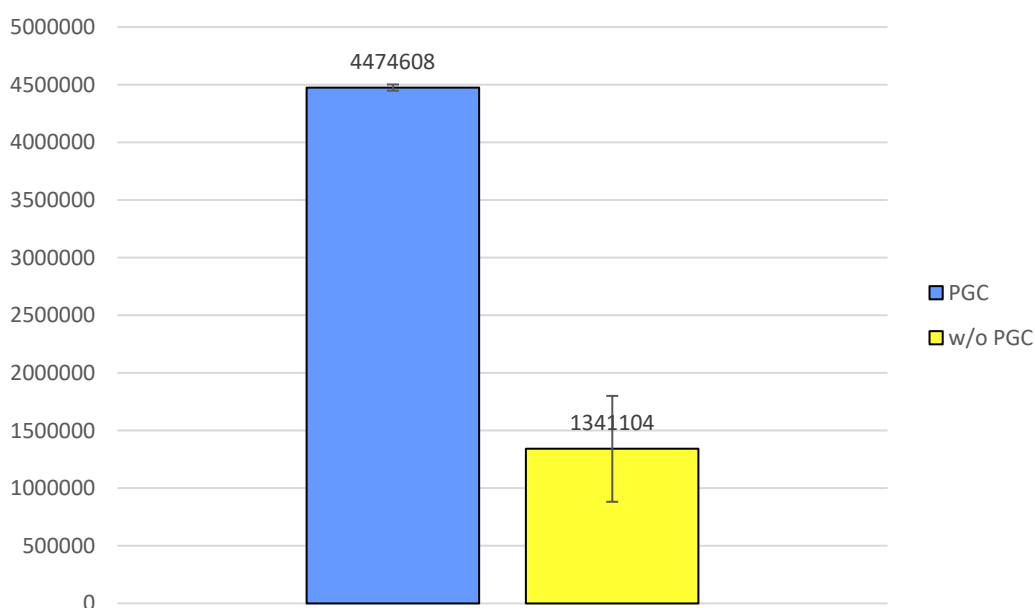


Slika 16. Srednja vrijednost površine vršaka, normaliziranih na ukupnu površinu, za različite koncentracije neukoncentriranih (w/o PGC; žuta boja) i PGC-om ukoncentriranih (PGC; plava boja) glikana izoliranog i standardnog IgG-a, označenih 2-AB-om ili ProA-om.

## 2-AB izolirani IgG - 5 $\mu$ g

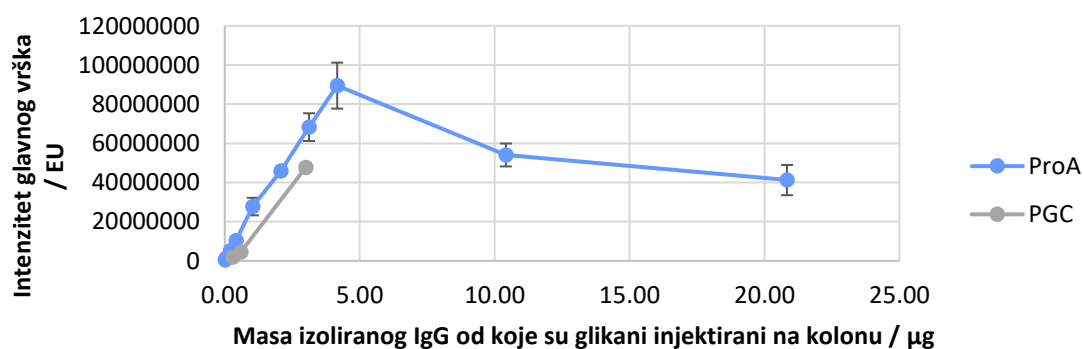
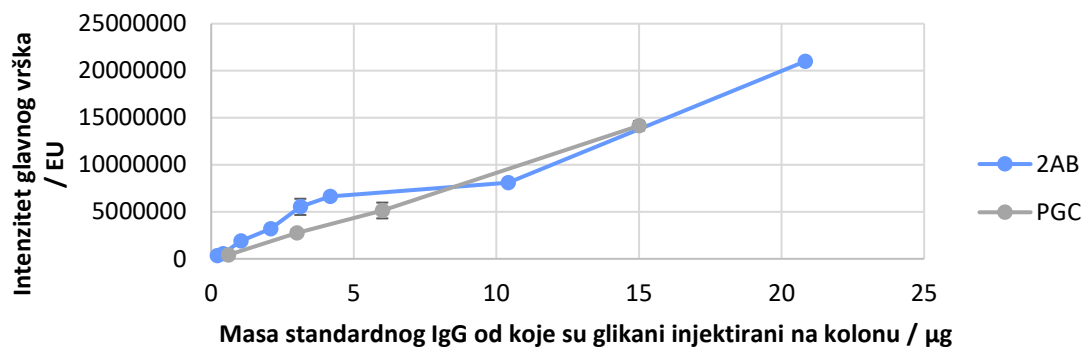
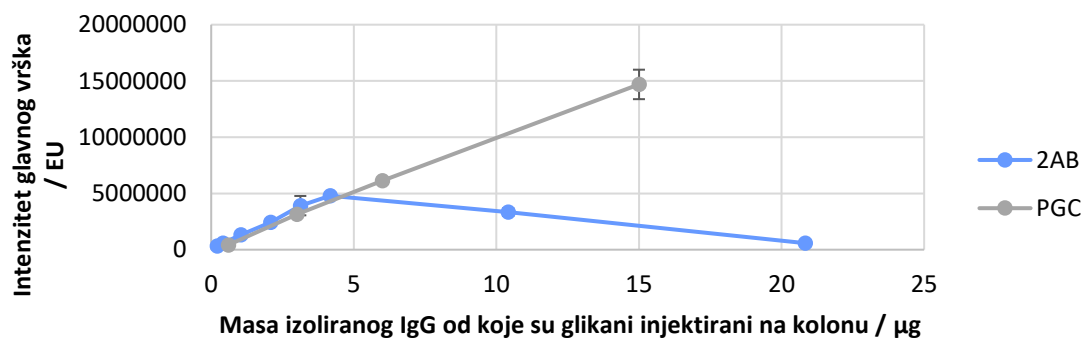


## ProA izolirani IgG - 1 $\mu$ g



**Slika 17.** Površina glavnog vrška izoliranog IgG čiji su glikani obilježeni 2-AB-om i ProA-om te ukoncentriranog PGC-om (PGC; plava boja) u odnosu na površinu vršaka neukoncentriranog izoliranog IgG (w/o PGC; žuta boja) čiji su glikani obilježeni istim bojama. Za 2-AB prikazane su izmjerene površine vršaka za početnu koncentraciju IgG-a od 5  $\mu$ g, a za ProA za početnu koncentraciju IgG-a od 1  $\mu$ g.





Slika 18. Usporedba intenziteta glavnog vrška za neukoncentrirane glikane obilježene 2-AB-om i ProA-om (2-AB, ProA; plava boja) i za glikane obilježene 2-AB-om i ProA-om te ukoncentrirane PGC-om (PGC; siva boja) pri različitim masama IgG od kojih su glikani injektirani na kolonu.

Rezultati kvantitativnog određivanja sposobnosti PGC metode da ukoncentrira uzorak prikazani su u Tablici 6 te na Slici 16, Slici 17 i Slici 18. U eksperimentu gdje su glikani obilježeni 2-AB-om isprobane su koncentracije od 1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  i 25  $\mu\text{g}$  izoliranog i standardnog IgG-a, a u eksperimentu gdje su obilježeni ProA-om isprobane su koncentracije od 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  i 5  $\mu\text{g}$  izoliranog i standardnog IgG-a. Zbog prevelikih koeficijenata varijacije koncentracije od 1  $\mu\text{g}$  za IgG čiji su glikani obilježeni 2-AB-om te od 0,1  $\mu\text{g}$  za IgG čiji su glikani obilježeni ProA-om izostavljene su iz daljnjih analiza i računa.

Metoda je, kao i kod optimizacije na uzorcima plazme, pokazala prihvatljive koeficijente varijacije koji su u svim slučajevima, osim kod standardnog IgG-a obilježenog s ProA, iznosili manje od 5 %. Srednje vrijednosti površine vršaka, normaliziranih na ukupnu površinu, dobivenih ukoncentriravanjem PGC-om također su se usporedile sa srednjim vrijednostima vršaka neukoncentriranih glikana kako bi se provjerilo podudaranje (Slika 16). Za koncentraciju od 5  $\mu\text{g}$  za glikane obilježene 2-AB-om te za koncentraciju od 1  $\mu\text{g}$  za glikane obilježene ProA-om uspoređeni su intenziteti glavnog vrška, gdje je ukoncentriravanjem PGC-om u prosjeku postignut oko 5x veći intenzitet od onog neukoncentriranih uzoraka (Slika 17). Usporedbom intenziteta glavnog vrška za neukoncentrirane glikane obilježene 2-AB-om i ProA-om i za glikane obilježene 2-AB-om i ProA-om te ukoncentrirane PGC-om pri različitim masama IgG od kojih su glikani injektirani na kolonu također je postignut mnogo bolji profil od onog dobivenog sušenjem (Slika 18). U odnosu na prijašnju metodu bez PGC ekstrakcije na čvrstoj fazi kojom je bilo moguće odrediti glikane s 25  $\mu\text{g}$  IgG-a za glikane obilježene 2-AB-om i s 5  $\mu\text{g}$  IgG-a za glikane obilježene ProA-om, ovom je metodom moguće mjeriti glikane od 5  $\mu\text{g}$  IgG-a za glikane obilježene s 2-AB, odnosno od 1  $\mu\text{g}$  IgG-a za glikane obilježene s ProA.

## 5. ZAKLJUČCI

Razvijena metoda ukoncentriravanja glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi, za razliku od sušenja, pokazala se uspješnom za ukoncentriravanje glikana prilikom njihove analize. Kako bi se dobio odgovarajući kromatografski profil, potrebno je pripaziti na kompatibilnost reagensa s mobilnom fazom za kromatografsku analizu, ionsku jakost prilikom elucije glikana s PGC-a te udio vode u eluatu glikana. Modifikacijom preuzetog protokola (Jensen i sur., 2012) moguće je uspješno odrediti 5x manje koncentracije glikana u odnosu na prijašnje metode bez PGC ekstrakcije na čvrstoj fazi.

PROTOKOL (~10 minuta po uzorku)

- 1| Grafit se ukloni iz spremnika i prebaci u epruvetu te se pripremi metanolna suspenzija koncentracije 50 mg/ml.
- 2| U Eppendorf epruvete stave se prazni C18 nastavci za pipete te se u svaki nastavak pipetira 50  $\mu$ l dobivene suspenzije kako bi se dobila mala PGC kolona.
- 3| Epruvete se centrifugiraju kako bi se formirale kompaktne kolone i uklonile manje čestice. Sadržaj epruvete se odbaci.
- 4| Kolona se ispiri i centrifugira 2 puta sa 60  $\mu$ l 100 % acetonitrila. Sadržaj epruvete se odbaci.
- 5| Kolona se ispiri i centrifugira 2 puta sa 60  $\mu$ l vode. Sadržaj epruvete se odbaci.
- 6| Na kolonu se nanese uzorak te se centrifugira.
- 7| Uzorak se ispere i centrifugira 1 puta sa 60  $\mu$ l vode. Sadržaj epruvete se odbaci.
- 8| Glikani, koji su sada vezani za PGC kolonu, eluiraju se 1 puta s 40  $\mu$ l 75 % acetonitrila sa 100 mM amonijevim formijatom.
- 9| Eluat se prebaci u viala za UPLC analizu i u svaku se doda 10  $\mu$ l 100 % acetonitrila.

Centrifugiranje se provodi 30 sekundi na 2000 G.

## 6. LITERATURA

Stern R, Jedrzejewski MJ. Carbohydrate polymers at the center of life's origins: the importance of molecular processivity. *Chem Rev*, 2008, 108, 5061-5085.

Hart GW, Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell*, 2010, 143, 672–676.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology*, 2<sup>nd</sup> Edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

Van Kooyk Y, Kalay H, Garcia-Vallejo JJ. Analytical Tools for the Study of Cellular Glycosylation in the Immune System. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4, 451.

Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1, 845-867.

Ruhaak LR, Uh HW, Deelder AM, Dolhain RE, Wuhrer M. Total plasma N-glycome changes during pregnancy. *J Proteome Res*, 2014, 13, 1657-1668.

Russell A, Adua E, Ugrina I, Laws S, Wang W. Unravelling Immunoglobulin G Fc N-Glycosylation: A Dynamic Marker Potentiating Predictive, Preventive and Personalised Medicine. *Int J Mol Sci*, 2018, 19, 390.

Gornik, O, Pavic T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820, 1318–1326.

Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med*, 1995, 1, 237-243.

Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, Rudd PM, Wright AF, Campbell H, Rudan I. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*, 2010, 20, 959-969.

Pabst M, Altmann F. Influence of Electrosorption, Solvent, Temperature, and Ion Polarity on the Performance of LC-ESI-MS Using Graphitic Carbon for Acidic Oligosaccharides. *Anal Chem*, 2008, 80, 7534-7542.

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, Wührer M, Lauc G. Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13, 1598-1610.

Wang JR, Gao WN, Grimm R, Jiang S, Liang Y, Ye H, Li ZG, Yau LF, Huang H, Liu J, Jiang M, Meng Q, Tong TT, Huang HH, Lee S, Zeng X, Liu L, Jiang ZH. A method to identify trace sulfated IgG N-glycans as biomarkers for rheumatoid arthritis. *Nature Communications*, 2017, 8, 631.

Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science*, 2006, 313, 670-673.

Michel M, Buszewski B. Porous graphitic carbon sorbents in biomedical and environmental applications. *Adsorption*, 2009, 15, 193-202.

Melmer M, Stangler T, Premstaller A, Lindner W. Comparison of hydrophilic-interaction, reversed-phase and porous graphitic carbon chromatography for glycan analysis. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 118-123.

Bapiro TE, Richards FM, Jodrell DI. Understanding the Complexity of Porous Graphitic Carbon (PGC) Chromatography: Modulation of Mobile-Stationary Phase Interactions Overcomes Loss of Retention and Reduces Variability. *Anal Chem*, 2016, 88, 6190-6194.

Ross P, Knox JH. Carbon-based packing materials for liquid chromatography: applications. *Adv Chromatogr*, 1997, 37, 121-162.

Jensen PH, Karlsson NG, Kolarich D, Packer NH. Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins. *Nat Protoc*, 2012, 7, 1299-1310.

Huhn C, Selman MH, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 2009, 9, 882-913.

Pasek M, Duk M, Podbielska M, Sokolik R, Szechinski J, Lisowska E, Krotkiewski H. Galactosylation of IgG from rheumatoid arthritis (RA) patients – changes during therapy. *Glycoconj J*, 2006, 23, 463-471.

Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klarić L, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wilson JF, Lieveise AG, Gornik O, Sijbrands EJG, Lauc G, van Hoek M. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861, 2240-2249.

Troelsen LN, Jacobsen S, Abrahams JL, Royle L, Rudd PM, Narvestad E, Heegaard NH, Garred P. IgG glycosylation changes and MBL2 polymorphisms: associations with markers of systemic inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2012, 39, 463-469.

Kizuka Y, Kitazume S, Taniguchi N. N-glycan and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861, 2447-2454.

<http://www.insungcolumns.com>, pristupljeno 8.4.2018.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1. Sažetak

N-glikom predstavlja jedinstvenu poveznicu između genskih predispozicija za razvoj pojedinih bolesti i okolišnih faktora kojima je organizam izložen te je stoga moguća njegova uporaba kao biomarkera u preventivnoj i personaliziranoj medicini. Jedan je od glavnih ciljeva moderne glikobiologije razviti brze i osjetljive metode za analizu N-glikana u tragovima. Razvijenom metodom za ukoncentriravanje N-glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi moguće je pomoću HILIC-UPLC-FLR kvantitativno odrediti 5x manje koncentracije N-glikana u odnosu na prijašnju metodu. Kako bi kromatografski profil bio prihvatljiv, tijekom analize potrebno je pripaziti na kompatibilnost reagensa s mobilnom fazom za kromatografsku analizu, ionsku jakost prilikom elucije glikana s PGC-a i udio vode u eluatu glikana. Razvijena metoda ima potencijal korištenja u istraživanjima različitih stanja i bolesti kod kojih dolazi do promjene glikozilacijskog profila, a u kojima je potrebna veća osjetljivost zbog male količine glikana u uzorku.

### 7.2. Summary

N-glycome represents a unique connection between the genetic predisposition for the development of certain diseases and the environmental exposure of the organism, making it a potential biomarker in preventive and personalised medicine. Consequently, the development of fast and sensitive methods for the analysis of trace N-glycans is one of the main goals in the field. By using the newly developed PGC SPE method for the enrichment of N-glycans, followed by HILIC-UPLC-FLR, it is possible to quantitatively measure 5x lower concentrations of N-glycans than with previous methods. During the analysis, it is important to adjust the compatibility of the reagents with the mobile phase used in chromatography, ionic strength for elution of the N-glycans from PGC and the amount of water in the N-glycan eluate. The method can be used in research of different conditions and diseases which are known to have an altered glycosylation profile, as well as in molecular diagnostics.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

### Razvoj metode za ukoncentriravanje N-glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Isabella Koprivec

#### SAŽETAK

N-glikom predstavlja jedinstvenu poveznicu između genskih predispozicija za razvoj pojedinih bolesti i okolišnih faktora kojima je organizam izložen te je stoga moguća njegova uporaba kao biomarkera u preventivnoj i personaliziranoj medicini. Jedan je od glavnih ciljeva moderne glikobiologije razviti brze i osjetljive metode za analizu N-glikana u tragovima. Razvijenom metodom za ukoncentriravanje N-glikana PGC ekstrakcijom na čvrstoj fazi moguće je pomoću HILIC-UPLC-FLR kvantitativno odrediti 5x manje koncentracije N-glikana u odnosu na prijašnju metodu. Kako bi kromatografski profil bio prihvatljiv, tijekom analize potrebno je pripaziti na kompatibilnost reagensa s mobilnom fazom za kromatografsku analizu, ionsku jakost prilikom elucije glikana s PGC-a i udio vode u eluatu glikana. Razvijena metoda ima potencijal korištenja u istraživanjima različitih stanja i bolesti kod kojih dolazi do promjene glikozilacijskog profila, a u kojima je potrebna veća osjetljivost zbog male količine glikana u uzorku.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 18 grafičkih prikaza, 6 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikani, koncentriranje, PGC, HILIC-UPLC

Mentor: **Dr. sc. Toma Keser**, *poslijedoktorand/viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, *poslijedoktorand/viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Tamara Pavić**, *poslijedoktorand/znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.



## Basic documentation card

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

### Development of the method for N-glycan enrichment using PGC solid phase extraction

**Isabella Koprivec**

#### SUMMARY

N-glycome represents a unique connection between the genetic predisposition for the development of certain diseases and the environmental exposure of the organism, making it a potential biomarker in preventive and personalised medicine. Consequently, the development of fast and sensitive methods for the analysis of trace N-glycans is one of the main goals in the field. By using the newly developed PGC SPE method for the enrichment of N-glycans, followed by HILIC-UPLC-FLR, it is possible to quantitatively measure 5x lower concentrations of N-glycans than with previous methods. During the analysis, it is important to adjust the compatibility of the reagents with the mobile phase used in chromatography, ionic strength for elution of the N-glycans from PGC and the amount of water in the N-glycan eluate. The method can be used in research of different conditions and diseases which are known to have an altered glycosylation profile, as well as in molecular diagnostics.

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

Thesis includes: 42 pages, 18 figures, 6 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycans, enrichment, PGC, HILIC-UPLC

Mentor: **Toma Keser, Ph.D.** *Postdoctoral Researcher/Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.** *Postdoctoral Researcher/Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Tamara Pavić, Ph.D.** *Postdoctoral Researcher/Research Associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Anita Hafner, Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September 2018.