

Strukturalna analiza N-glikanskog profila staničnih linija HepG2 i 1.1B4 HILIC-UPLC-FLR-MS/MS metodom

Šoić, Dinko

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:163:744165>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

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



Dinko Šoić

**Strukturalna analiza N-glikanskog profila
staničnih linija HepG2 i 1.1B4 HILIC-UPLC-
FLR-MS/MS metodom**

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 na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Tome Kesera.

Zahvaljujem se mentoru, dr. sc. Tomi Keseru, na ukazanoj prilici i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada. Njegova je znanstvena znatiželja zarazna, a jednostavnost i strpljenje čine ga odličnim mentorom.

Srdačno zahvaljujem i svojoj obitelji i prijateljima, bez njih ne bih bio onakav kakav jesam.

*Proučio sam mudroslovlje
I liječništvo, pa još i pravo,
K tom nažalost i bogoslovlje,
I sve sam s marom proučavo.
A jedna ostadoh budala
Što zna koliko je i znala.*

*Da išta pravo znam, ne tvrdim ja,
Nit učitelj da valjan mogu biti,
Obratiti taj svijet i popraviti.*

*Ja sad tek mudraca shvaćam riječ:
'Duhova svijet zatvoren ti nije;
Tek srce ti je mrtvo i duh tvoj!
I zato kupaj, đaće – prosto ti je –
Zemaljsku grud u zori rumenoj!'*

J.W. Goethe, *Faust*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GLIKANI	1
1.2. VRSTE GLIKANA I NJHOVA RAZNOLIKOST	3
1.3. GLIKOZILACIJA PROTEINA	5
1.4. BIOSINTETSKI PUT N-GLIKOZILACIJE	6
1.5. ANALIZA GLIKANA	8
1.5.1. HILIC	10
1.5.2. ESI-qTOF-MS/MS	11
1.6. STANIČNE KULTURE	13
1.6.1. HepG2 I 1.1B4 STANIČNE LINIJE	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. UZORAK	17
3.2. MATERIJALI	17
3.2.1. ANORGANSKE KEMIKALIJE	17
3.2.2. ORGANSKE KEMIKALIJE	17
3.2.3. BIOLOŠKE KEMIKALIJE	18
3.2.4. OTOPINE I PUFERI	18
3.2.5. LABORATORIJSKA OPREMA I PRIBOR	19
3.3. PRIPREMA UZORAKA	19
3.3.1. DENATURACIJA PROTEINA	20
3.3.2. DEGLIKOZILACIJA	20
3.3.3. PRIPREMA OTOPINE ZA OBILJEŽAVANJE GLIKANA	20
3.3.4. OBILJEŽAVANJE UZORKA	20
3.3.5. PREKONDITIONIRANJE GHP PLOČICE	21
3.3.6. NANOŠENJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA NA GHP PLOČICU	21
3.3.7. PROČIŠĆAVANJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA	21
3.3.8. ELUACIJA OBILJEŽENIH N-GLIKANA	21
3.3.9. PGC KONCENTRIRANJE	22
3.4. ANALIZA UZORAKA	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURA	39
7. SAŽETAK	43
8. SUMMARY	44

1. UVOD

1.1. GLIKANI

U proteklih tri milijarde godina koliko postoji život na Zemlji, svaka je živuća stanica na sebi imala gust površinski sloj glikana. Činjenica da evolucijski mehanizmi prirodne selekcije nisu uspjeli proizvesti nijednu stanicu lišenu ugljikohidratnih struktura potvrđuje njihovu esencijalnu važnost. Glikani stoga predstavljaju neophodnu komponentu života te su, uz nukleinske kiseline, lipide i proteine, jedan od četiri osnovna gradivna bloka živog svijeta (Varki, 2011). Građeni su od monosaharidnih jedinica koje se u staničnom sekretornom putu vežu za proteine i lipide u procesu glikozilacije, formirajući tako glikokonjugate. Glikani su najbrojniji i strukturno najraznovrsniji polimeri u prirodi, a njihova veličina može varirati od jednostavnih monosaharida poput N-acetilglukozamina (GalNAc) pa sve do kompleksnih glikozaminoglikanskih lanaca s tisućama podjedinica (Springer i Gagneux, 2016). Takva golema varijabilnost posljedica je izrazito kompleksnog procesa njihove biosinteze koja započinje u endoplazmatskom retikulumu, a nastavlja se u Golgijevom aparatu (Lowe i Marth, 2013). Ukupan glikanski profil nekog organizma ili stanice naziva se glikom i proučava ga glikomika, znanstvena disciplina koja u zadnje vrijeme sve više dobiva na značenju (Lauc i sur., 2015). Usprkos rastućem broju istraživanja, uloga je glikana i dalje znatno manje poznata od one ostalih staničnih makromolekula (Lowe i Marth, 2013).

Pretpostavka da je funkcija svakog proteina određena njegovom strukturom, koja je pak definirana slijedom nukleotida u molekuli DNA, predstavlja centralnu dogmu biologije. Sukladno toj dogmi, znanstvenici su prilično kruto gledali na regulaciju životnih procesa te su izvor čovjekova iznimne kompleksnosti planirali pročitati u genima. Završetkom kompletnog sekvenciranja ljudskog genoma početkom 21. stoljeća to je napokon bilo i omogućeno, no rezultati su bili prilično neočekivani. Naime, sekvenciranjem je uočeno da čovjek ima gotovo isti broj gena kao i miš, odnosno da mu je genom svega pet puta veći od bakterijskog. Ovo je saznanje omogućilo nov pogled na centralnu dogmu i potvrdilo da geni i proteini nisu jedini izvor čovjekova veličanstvena organizma. Procesu poput glikozilacije i ostalih ko- i post-translacijskih modifikacija, epigenetske promjene i postojanje nekodirajućih dijelova DNA, kao i brojni još uvijek nepoznati mehanizmi svi zajedno doprinose ovakvom neiscrpnom bogatstvu života kakvog poznajemo (Gornik i sur., 2012). Glikomika i epigenomika, premda dosad zanemarivani dijelovi biološke slagalice, sve bolje objašnjavaju tajne života čija se kompleksnost jednostavno ne može tražiti isključivo u genomu (Lauc i sur., 2014).

Za razliku od proteina i molekula RNA, koji su određeni slijedom nukleotida u odgovarajućim genima, glikani ne nastaju prema gotovom predlošku. Njihova je sinteza posljedica uzajamne interakcije stotine enzima, transkripcijskih faktora, ionskih kanala i ostalih proteina te predstavlja složen proces dodavanja, oduzimanja i modifikacije šećernih podjedinica (Springer i Gagneux, 2016). Ta kompleksna dinamična mreža gomile proteina uključenih u sintezu glikana čine proces glikozilacije izrazito osjetljivim na razne utjecaje unutar i van stanice. Uz gensku komponentu koja se reflektira na razini proteina uključenih u sintezu glikana (Lauc i sur., 2015), okoliš stoga također ima presudan utjecaj na njihovu konačnu strukturu, i to bilo direktnim utjecajem na glikozilacijske enzime, bilo indukcijom epigenetskih promjena i modifikacijom genske ekspresije. Glikanski profil tako znatno određuju i spol, dob, rasa, reproduktivni ciklus, prehrana i životne navike poput pušenja (Knežević i sur., 2010). Zbog tog se dvostrukog utjecaja genetike i okoline promjena glikanske strukture odvija znatno bržim tempom od one u molekuli DNA, a time i u proteinima. Ta je sposobnost brzog stvaranja novih bioloških struktura bez prethodne promjene u nukleotidnom slijedu ogromna evolucijska prednost od koje su eukarioti uvelike profitirali. Naime, zbog njihovog smanjenog reproduktivnog potencijala, upravo su glikanske modifikacije omogućile njihovu brzu i uspješnu prilagodbu na okolišne uvjete (Gornik i sur., 2012). Činjenica da im je struktura posljedica uzajamne interakcije genskih i okolišnih čimbenika čini glikane svojevrsnom staničnom memorijom. Sveukupnost utjecaja na stanicu tako se u svakom trenutku zrcalno odražava i u glikanskoj strukturi (Lauc i Zoldoš, 2010), a blisko srodni organizmi mogu imati prilično različite glikane vezane na praktički identičnu polipeptidnu osnovu (Gornik i sur., 2012).

Iako su prve strukture monosaharida prepoznate još 1880-ih godina, znanstvenicima je bilo potrebno gotovo cijelo stoljeće da bi počeli cijeniti kompleksnu ulogu glikana u organizmu (Hudak i Bertozzi, 2014). I dok u jednostaničnim organizmima služe prvenstveno kao strukturne komponente stanične membrane, u onim složenijima imaju brojne kompleksne uloge (Lauc i Zoldoš, 2010). Danas je poznato da sudjeluju u brojnim molekularnim procesima poput smatanja proteina i njihovom usmjeravanju u odgovarajuće stanične odjeljke, gradnje izvanstaničnog matriksa i osiguravanja strukturne potpore, stanične adhezije i signalizacije, transporta molekula i modulacije aktivnosti receptora, a služe i kao mjesta prepoznavanja u međustaničnim interakcijama (Lauc i sur., 2015; Cooper i Hausman, 2004). Stoga je jasno da imaju ogromnu ulogu u svim fundamentalnim funkcijama višestaničnih organizama, a njihovu esencijalnu važnost za višestanični život potvrđuje i činjenica da je njihova odsutnost letalna za embrij (Marek i sur., 1999).

Glikanski površinski sloj, tzv. glikokaliks, prisutan je i kod prokariota i kod eukariota, što samo potvrđuje univerzalnost glikana u živom svijetu. Glikokaliks predstavlja svojevrsni stanični otisak prsta, identifikator pomoću kojeg stanica raspoznaje svoje od tuđeg te mobilizira imunostanice kako bi uklonile potencijalne prijetnje. Karl Landsteiner ovo je uočio još davne 1900. godine svojim otkrićem ABO sustava krvnih grupa za što je nagrađen Nobelovom nagradom, iako sam nije znao presudnu strukturnu razliku na kojoj se temelji podjela. Tek će pedesetak godina nakon toga postati jasno da uspješnost transfuzije ovisi upravo o glikanskoj strukturi na površini eritrocita, definiranu trima alelskim varijantama istog glikoziltransferaznog gena (Hudak i Bertozzi, 2014; Springer i Gagneux, 2016; Gornik i sur., 2012).

Zahvaljujući njihovoj važnoj ulozi u regulaciji mnogih staničnih procesa, terapijski potencijal glikana postaje sve očitiji. Razni oblici defekata glikanske sinteze danas se smatraju direktnim uzrocima sve većeg broja oboljenja, a specifične se glikanske varijante sve više predstavljaju kao uspješni markeri bolesti. Njihov klinički potencijal prvenstveno se vidi na polju pretilosti i dijabetesa tipa 2 (Hudak i Bertozzi, 2014; Lemmers i sur., 2017). Mnogi su rekombinantni farmaceutici, uključujući monoklonska protutijela, glikoproteini čija je specifična glikoforma ključ uspješne aktivnosti. Farmaceutska industrija iz tog razloga sve više pridaje značaj upravo glikanskom dijelu glikokonjugata (Hart i Copeland, 2010).

1.2. VRSTE GLIKANA I NJIHOVA RAZNOLIKOST

Praktički se sve vrste biomolekula mogu naći i u glikoziliranoj formi (Agard i Bertozzi, 2009). Tipičan je glikan kompleksna molekula koja sadrži 10 do 15 monosaharida koji mogu biti povezani na najrazličitije načine (Lauc i sur., 2015). Kod sisavaca, golemu količinu od preko 7000 glikanskih struktura tako izgrađuje svega desetak monosaharida: fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), glukuronska kiselina (GlcA), iduronska kiselina (IdoA), manozna (Man), ksiloza (Xyl) i sialinske kiseline poput N-acetilneuraminske (NeuAc) i N-glikolilneuraminske (NeuGc) kiseline (Moremen i sur., 2012). Uzrok takve goleme strukturne raznolikosti glikana je njihova nelinearnost, odnosno sposobnost grananja, i to različitim oblicima glikozidnih veza. Glikani stoga nisu određeni samo slijedom monosaharidnih podjedinica, već i točnom pozicijom glikozidne veze, njenom stereokemijskom konfiguracijom, kao i brojem i mjestom grananja. Za razliku od linearnih polimera poput nukleotidnog slijeda i proteina koji posjeduju samo jednu vrstu veze, svaki monosaharid

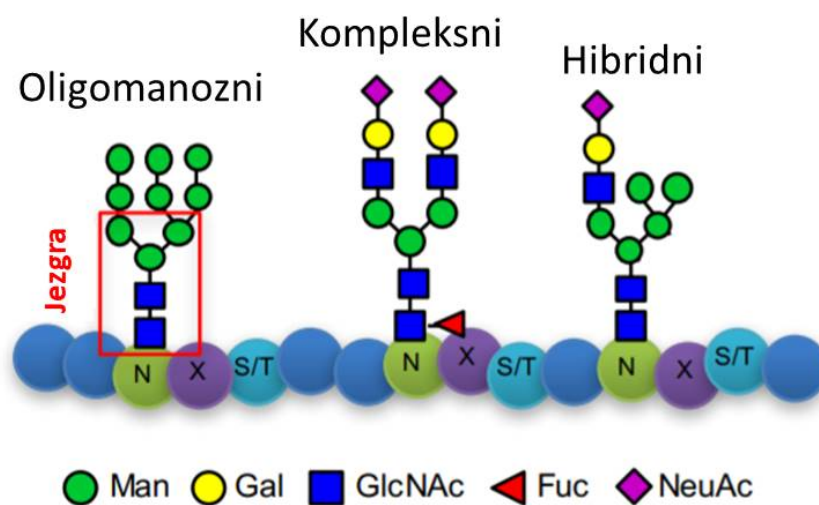
teoretski može na svakom od nekoliko svojih veznih mjesta vezati drugi monosaharid ili neku drugu molekulu i to α - ili β -vezom. Zahvaljujući tome, tri nukleotida imaju samo 6 mogućih izomera, dok pak tri heksoze mogu formirati čak 720 jedinstvenih trisaharida (Tablica 1.). Veće glikanske strukture u teoriji imaju ogroman broj izomera, no u biološkim je sustavima taj teorijski neizmjeran broj mogućnosti ipak donekle ograničen regulacijom mehanizama glikanske biosinteze (Varki i sur., 2009; Lauc i Zoldoš, 2010).

Tablica 1. Broj teoretski mogućih izomera glikana i peptida sastavljenih od dva, tri, četiri ili pet (identičnih ili različitih) monosaharida odnosno aminokiselina (preuzeto i modificirano iz Lauc i Zoldoš, 2010)

Oligomerna kompozicija	Glikan	Peptid
dimer AA	11	1
dimer AB	20	2
trimer AAA	120	1
trimer ABC	720	6
tetramer AAAA	1424	1
tetramer ABCD	34 560	24
pentamer AAAAA	17 872	1
pentamer ABCDE	2 144 640	120

Klasifikacija glikokonjugata prvenstveno se temelji na vrsti veze s aglikonom. Glikani kovalentno vezani na proteine tako formiraju nekoliko tipova glikoproteina, dok one vezane na lipide možemo podijeliti u nekoliko skupina glikolipida. Glikozilirano je čak preko 90 % sekretornih i membranskih proteina, odnosno oko polovice sveukupnih staničnih proteina (Agard i Bertozzi, 2009). Prema mjestu vezanja ugljikohidratnog bočnog lanca razlikujemo N-vezane ili O-vezane glikoproteine. N-glikan je šećerni lanac koji je preko N-acetilglukozamina kovalentno vezan na dušikov atom asparaginskog ogranka polipeptidnog lanca unutar slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr, pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro). Dakle, N-glikani ne mogu biti vezani na bilo koji bočni ogranak asparagina, nego isključivo na onaj unutar točno određenog aminokiselinskog slijeda. Svim N-glikanima zajednička je pentasaharidna sržna regija – tri manoze i dva N-acetilglukozamina ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$), a ovisno o šećerima vezanima na tu jezgru mogu se razvrstati u tri glavna tipa: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip. Oligomanoznom tipu pripadaju glikani čiji su ogranci sastavljeni isključivo od manozna, dok kompleksni tip ima ogranke koji su na jezgru vezani preko N-acetilglukozamina. Hibridni je tip kombinacija spomenutih: manozne su antene vezane preko $\text{Man}\alpha 1-6$, dok se ostali ogranci preko N-acetilglukozamina vežu na

Man α 1-3 jezgre (Slika 1.). U O-vezanim je glikoproteinima N-acetilgalaktozamin izravno vezan na kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina. Njihova se podjela temelji na strukturi sržne regije, a najpoznatiji su svakako mucini – ogromni glikoproteini koji sadrže brojne gusto zbijene O-glikane. Osim glikoproteina, glikanska raznovrsnost obuhvaća i proteoglikane, ganglioze, glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) sidra i glikosfingolipide, da nabrojimo samo one najčešće prisutne u eukariotskim stanicama (Cooper i Hausman, 2004; Varki i sur., 2015-2017).



Slika 1. Tipovi N-glikana (preuzeto i modificirano iz Holst i sur., 2019)

1.3. GLIKOZILACIJA PROTEINA

Gotovo su svi ljudski membranski i sekretorni proteini (osim albumina i β 2-mikroglobulina) (Baum i Cobb, 2017), kao i brojni unutarstanični proteini glikozilirani (Lauc i sur., 2015). Glikozilacija je proteina složena i visoko regulirana ko- i posttranslacijska modifikacija kovalentnog vezanja glikanskog lanca za proteine pri čemu nastaju glikoproteini (Cooper i Hausman, 2004). To je jedina posttranslacijska modifikacija koja može proizvesti bitnu strukturnu promjenu proteina. Barem 2000 različitih glikanskih determinanti veže se na polipeptidnu osnovu čineći tako glikoproteom nekoliko redova veličine kompleksnijim od samog proteoma. Proteom tako zapravo samo *predviđa* fenotip, dok glikoproteom zapravo *jest* sam fenotip (Lauc i Zoldoš, 2010). Naime, dok je polipeptidna sekvenca često praktički identična u brojnim vrstama, proces je glikozilacije taj koji stvara promjenu među njima. Upravo se vezanjem glikana stvara funkcionalni glikoprotein karakterističan za određenu vrstu. Glikanski epitopi jedne vrste stoga mogu biti meta imunološkog sustava neke druge

vrste. Tako je N-glikolilneuraminska kiselina, najčešće eksprimirana sijalinska kiselina sisavaca uključujući i miša, odsutna i imunogenična kod ljudi koji umjesto nje eksprimiraju N-acetilneuraminsku kiselinu (Reiding i sur., 2016).

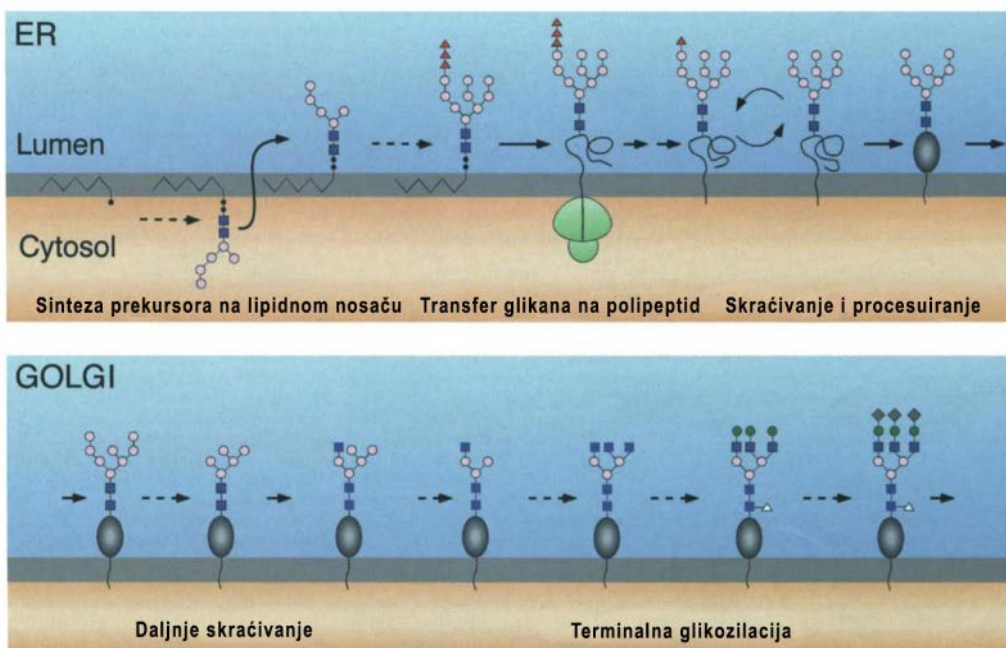
Usprkos njihovom različitom biosintetskim podrijetlom, i polipeptidni i glikanski dio formiraju jedinstven funkcionalan entitet u obliku glikoproteina. Glikani stoga predstavljaju integralni dio glikoproteina određujući njihovu ispravnu strukturu i funkciju u vidu pravilnog smatanja, topljivosti i stabilnosti. Također, variranjem glikanskog dijela (kroz proces alternativne glikozilacije) omogućeno je precizno moduliranje strukture proteina i prilagođavanje njihove funkcije specifičnim fiziološkim zahtjevima. Osim toga, glikani doprinose funkciji proteina stvarajući vezna mjesta za glikan-specifične receptore, tzv. lektine. Uz sve navedene uloge, jasno je da glikani patofiziološkim mehanizmima mogu sudjelovati u razvoju brojnih bolesti (Lauc i sur., 2015).

Već je spomenuto da su glikanske strukture posljedica dinamične mreže stotine gena koji kodiraju za glikozilacijske proteine, zajedno sa transkripcijskim faktorima i okolišem koji utječu na njihovu ekspresiju i aktivnost. Za sad je poznato oko 600 takvih proteina od kojih su najznačajnije glikozidaze i glikoziltransferaze, no pretpostavlja se da bi ih moglo biti i znatno više. Trenutne procjene prema kojima je čak 5 do 10 % našeg genoma na neki način uključeno u glikozilaciju čine ovaj proces našim najkompleksnijim biosintetskim putem (Gornik i sur., 2012). Prvenstveno se to odnosi na N-glikozilaciju koja sudjeluje u nastanku čak 90 posto glikoproteina, dok je svega desetak posto njih isključivo O-glikozilirano (Apweiler i sur., 1999).

1.4. BIOSINTETSKI PUT N-GLIKOZILACIJE

N-glikozilacija najviše je proučavana vrsta proteinske glikozilacije (Moremen i sur., 2012). U eukariota, većina se glikana sintetizira u specifičnim staničnim organelima: endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu. Proces glikozilacije započinje u endoplazmatskom retikulumu sintezom 14-saharidne jezgre $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ dodavanjem jednog po jednog šećera na lipidni membranski nosač dolikolfosfat. Sinteza oligosaharidne jezgre započinje na citoplazmatskoj strani ER-a dodavanjem 2 N-acetilglukozamina i 5 manoza, nakon čega se nastali prekursor uz pomoć enzima flipaze prebacuje na luminalnu stranu membrane. Na citoplazmatskoj strani donori monosaharida su nukleotidni šećeri, a na luminalnoj su to šećeri aktivirani dolikol-fosfatom (Aebi, 2013). Nakon dodavanja još 7 šećera i formiranja funkcionalnog prekursora, on se pomoću oligosahariltransferaza prenosi sa

nosača na rastući polipeptidni lanac stvaranjem N-glikozidne veze s bočnim ogrankom asparagina. Odmah nakon vezanja s polipeptidom dolazi do uklanjanja tri terminalne glukoze i jedne manoze pomoću ER glukozidaza i manozidaza. Sve se to događa prije nego je sama translacija u potpunosti završena, a dodani glikani imaju presudnu ulogu u pravilnom smatanju sintetiziranog proteina, kao i njegovom sortiranju i transportu. Repertoar je glikanskih struktura u ovom dijelu sekretornog puta i dalje relativno malen jer je njihovo procesuiranje praktički zajedničko svim glikoproteinima. Do prave raznolikosti dolazi tek u Golgijevom aparatu gdje glikani poprimaju izrazito kompleksne strukture omogućujući im čitav spektar funkcija koje obavljaju u gotovom glikoproteinu. Nakon uspješnog smatanja glikoprotein se stoga prebacuje u Golgijev aparat gdje se proces uklanjanja manoze nastavlja, a početni glikanski prekursor svodi se na samo 5 šećera – $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Slika 2.). Na tu se jezgru zatim u procesu terminalne glikozilacije dodaju razni šećeri od kojih su najčešći N-acetilglukozamin, galaktoza, sijalinska kiselina i fukoza. Terminalna se glikozilacija događa uz pomoć glikoziltransferaza koje uspostavljaju glikozidne veze i time sintetiziraju glikanski lanac, i glikozidaza koje hidrolizom veze uzrokuju njegovo pucanje. Iako glikoziltransferaze predstavljaju anabolički dio glikozilacije, oba ova enzima uzajamno određuju konačan produkt glikanske biosinteze (Ohtsubo i Marth, 2006). Upravo ovim procesom nastaju glikoproteini kompleksnog ili hibridnog tipa, dok oni koji su posve izbjegli terminalnu glikozilaciju pripadaju oligomanoznom tipu (Helenius i Aebi, 2001).



Slika 2. Biosinteza N-glikanskog oligosaharidnog prekursora u ER-u i Golgijevom aparatu (preuzeto i modificirano iz Helenius i Aebi, 2001)

Vrsta i broj dodanih šećera, kao i broj i oblik ogranaka koji stvaraju na prekursorskoj jezgri čine finalnu glikansku strukturu iznimno raznolikom. I dok su glikoforme u endoplazmatskom retikulumu prilično homogene, one nastale u Golgijevom aparatu pridonose ogromnoj varijabilnosti glikana i razlikuju se među pojedinim vrstama. Prijelaz iz strukturne uniformnosti prisutne u endoplazmatskom retikulumu do značajne diverzifikacije u Golgijevom aparatu poklapa se s promjenom glikanske funkcije u glikoprotenu. Iako partneri u sekretornom putu, ER i Golgijev aparat tako imaju fundamentalno drugačiju ulogu u glikozilaciji, a vjerojatno se razlikuju i u evolucijskom podrijetlu (Helenius i Aebi, 2001).

1.5. ANALIZA GLIKANA

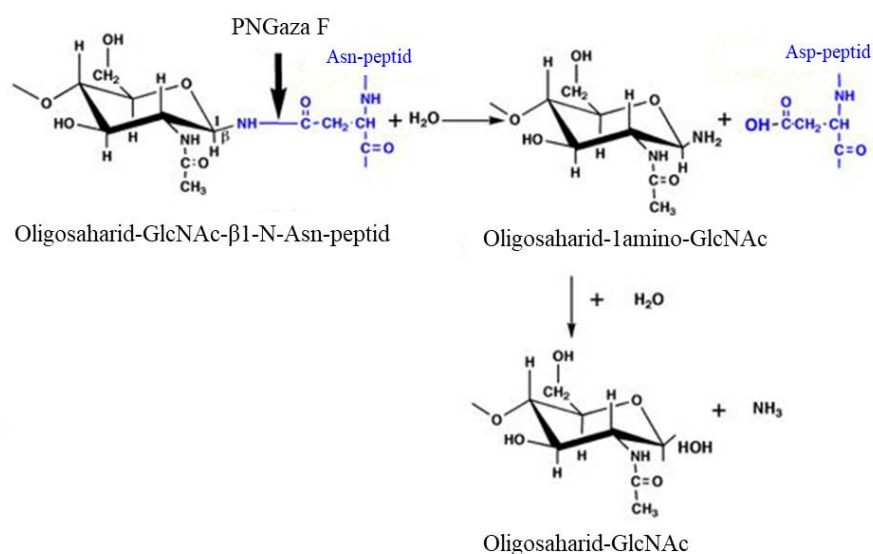
Kompleksnost je glikana dugo predstavljala ozbiljnu prepreku za njihovu strukturnu karakterizaciju. Usprkos toj ogromnoj heterogenosti i raznolikosti, nedavna tehnološka i analitička dostignuća omogućila su njihovo uspješno profiliranje (Go i sur., 2013).

Glikom predstavlja kompletan repertoar glikana i glikokonjugata određene stanice, tkiva ili organizma u nekom trenutku, a njegovom sustavnom analizom bavi se glikomika. Činjenica da kompleksnost genoma za nekoliko redova veličine nadmašuje proteom i genom čini zadatak glikomike još zahtjevnijim (Lauc i sur., 2015). Biosintetski glikanski put ovisi o brojnim parametrima poput genske komponente, dostupnosti nukleotidnih šećera, vremenu provedenom u ER i Golgijevom aparatu, kao i dostupnosti pojedinog glikozilacijskog mjesta (Clerk i sur., 2015). Zbog kompleksne biosinteze kao i njihove nelinearnosti teško je definirati univerzalni protokol za glikansku analizu. Ogromnu strukturnu raznolikost glikana stoga je praktički nemoguće odrediti samo jednom metodom, već je redovito riječ o kombinaciji fizikalnih, kemijskih i enzimatskih pristupa (Varki i sur., 2009).

Analiza glikana može se provoditi bilo na nekoliko razina: analizom netaknutog glikoproteina, analizom glikopeptida dobivenog iz glikoproteina enzimatskim reakcijama, analizom kemijskim i enzimatskim reakcijama oslobođenih glikana ili pak samom monosaharidnom analizom (Keser, 2016). Najčešće je korištena analiza oslobođenih glikana jer pruža prikladan način prikupljanja informacija o različitim glikanskim populacijama prisutnim na glikoproteinu, a obuhvaća separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju oslobođenih oligosaharida (Thobhani i sur., 2009).

Generalni pristup glikanske analize započinje njihovim oslobađanjem od samog glikoproteina, što se najčešće radi enzimskim reakcijama kako bi se spriječila razgradnja proteina i očuvala njegova informacija (kemijskim reakcijama dolazi do razgradnje

glikoproteina). Dostupna su dva tipa enzima, endoglikozidaze i egzoglikozidaze, a u slučaju N-glikana najčešće se koristi peptidna-N-glikozidaza F (PNGaza F) koja je zapravo amidaza, a pripada endoglikozidazama. Ona uspješno kida vezu između asparagina i na njega vezanog N-acetilglukozamina oslobađajući pritom protein bez šećera i slobodan 1-amino oligosaharid. Amino skupina ubrzo se hidrolizira i zamjenjuje hidroksilnom skupinom pa se na reducirajućem kraju finalnog oligosaharida nalazi Di-N-acetilkitobioza (Slika 3.) (Tarentino i Plummer, 1994). Ovakav oligosaharid sadrži reaktivnu karbonilnu skupinu koja se dalje može derivatizirati, i to odvojeno od svih ostalih hidroksilnih skupina (Han i Costello, 2013).

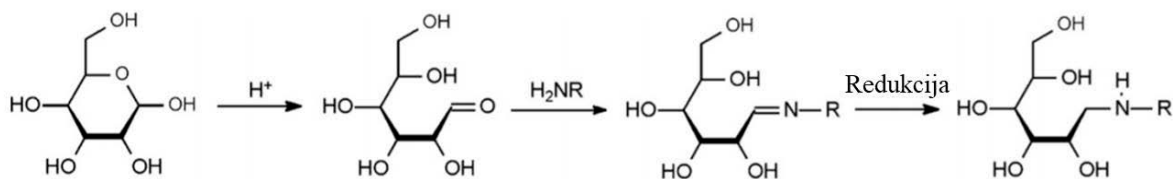


Slika 3. Mehanizam peptidne-N-glikozidaze F (PNGaza F) (preuzeto i modificirano s <https://jcgddb.jp/GlycoPOD/upload/39ef21a5-02d8-4d72-a92e-3729c503eb76.jpg>, pristupljeno 8.4.2019.)

Zbog činjenice da šećerne molekule ne sadrže kromofore, razvijen je čitav niz tehnika za njihovu detekciju. Oslobođeni glikani najčešće se obilježavaju fluorescentnom bojom na svojem reducirajućem kraju i to reakcijom reduktivne aminacije. Boja koja sadrži primarni amin reagira s aldehidnom skupinom glikana dajući Schiffovu bazu (imin) koja se odgovarajućim reducensom reducira do sekundarnog amina (Slika 4.). Najčešće korištene boje u tom procesu su fluorofori poput 2-aminobenzamida, 2-aminobenzojeve kiseline ili 2-aminopiridina, dok su najčešći reducensi natrijev cijanoborohidrid ili 2-pikolin boran. Velika prednost ovakvog načina označavanja je u tome što glikan i fluorescentna boja reagiraju u stehiometrijskom omjeru 1:1 čime je omogućena direktna kvantifikacija na temelju intenziteta fluorescencije (Ruhaak i sur., 2010). Ovakvo derivatizirani glikani mogu se zatim odvojiti

tekućinskom kromatografijom (visoke djelotvornosti – HPLC ili ultra djelotvornosti – UPLC) ili kapilarnom elektroforezom (CE) te detektirati fluorescencijskim detektorom ili masenim spektrometrom (MS). Tekućinska kromatografija naširoko se koristi za analizu kako neutralnih tako i nabijenih glikana, a najčešće je korištena HILIC-UPLC (eng. hydrophilic interaction ultra performance liquid chromatography) metoda temeljena na hidrofilnim interakcijama. U većini slučajeva UPLC i kapilarna elektroforeza omogućuju pouzdanu relativnu kvantifikaciju glikana, no njihova je separacija često nepotpuna i svaki je pik mješavina signala iz različitih glikana. Analiza masenom spektrometrijom nudi nam detaljniji uvid u strukturu, ali su njezine mogućnosti kvantifikacije ograničene (Keser, 2016).

Nijedna od trenutno dostupnih analitičkih metoda ne može samostalno omogućiti detaljan uvid u glikansku strukturu. Usprkos tome, kombinacija postojećih metoda u višestupnjevitom procesu pruža detaljnu karakterizaciju glikanskog profila u složenim biološkim uzorcima (Keser, 2016).



Slika 4. Obilježavanje glikana reakcijom reduktivne aminacije (preuzeto i modificirano iz Harvey, 2011)

1.5.1. HILIC

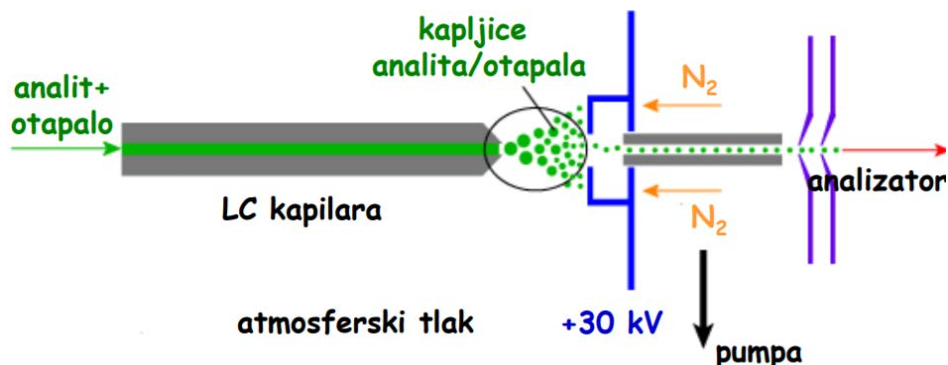
Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC) predstavlja varijantu normalno fazne tekućinske kromatografije (NP-LC) razvijenu 70-ih godina prošlog stoljeća. Koristi se za razdvajanje polarnih analita, a iako se smatra samo jednim oblikom normalno fazne kromatografije, mehanizam je separacije kod HILIC-a znatno složeniji (Buszewski i Noga, 2012). Kao i normalno fazna kromatografija, HILIC koristi tradicionalne polarne stacionarne faze, ali i polarne mobilne vodene faze slične onima u obrnuto faznoj kromatografiji (RP-LC). Stacionarne faze tako se uglavnom baziraju na silikagelu, dok je mobilna faza najčešće smjesa organskog otapala i vode, s tim da je voda snažniji eluens. Analiti se zadržavaju na hidrofilnoj stacionarnoj fazi na temelju stvaranja vodikovih veza te ionskih i dipol-dipol interakcija, dok većina kontaminanata poput neglikoziliranih peptida, soli i detergenata uopće ne pokazuju retenciju. Veličina glikana,

njegov naboj, kao naravno i njegova strukturu zajedno utječu na retencijsko vrijeme. Štoviše, HILIC prepoznaje i sterička svojstva analita čime je omogućeno odvajanje strukturnih izomera. Dodatna je pogodnost i mogućnost korištenja u sprezi s masenom spektrometrijom zahvaljujući kompatibilnim mobilnim fazama. Hidrofilnost glikana i njihova sposobnost stvaranja vodikovih veza stoga čine HILIC metodu iznimno popularnom u glikanskoj analizi (Rakus i Mahal, 2011; Wuhrer i sur., 2009).

1.5.2. ESI-qTOF-MS/MS

U zadnje je vrijeme HILIC metoda zajedno s masenim spektrometrom koji koristi ionizaciju elektroraspršenjem postala snažan analitički alat u strukturnoj analizi glikana. Masena spektrometrija predstavlja visoko specifičnu metodu za određivanje strukture ili potvrdu identiteta raznih tvari, pa tako i glikana. Maseni spektrometar sastoji se od ionizacijske komore, ubrzavajuće pločice, analizatora i detektora. Načelo je metode stvaranje nabijenih molekula ili molekularnih fragmenata bilo u visokom vakuumu ili pak neposredno prije ulaska u njega. Ioni se generiraju u plinovitoj fazi različitim metodama ionizacije nakon čega se primjenom električnog ili magnetskog polja razdvajaju prema njihovoj masi. Time se zapravo određuje molekulska masa ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta nastalog njenim cijepanjem. Dobiveni spektar masa pokazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta kao funkciju omjera mase i pozitivnog ili negativnog naboja iona (m/z) (Watson, 2012; Nigović, 2018).

Najčešće korištena metoda ionizacije za povezivanje s tekućinskom kromatografijom je ionizacija elektroraspršenjem (ESI). Ova se metoda redovito koristi za analizu velikih biomolekula poput proteina, peptida, glikana i biopolimera (Becker i Jakubowski, 2009). Tekući uzorak iz kromatografske kolone prelazi u usku kapilaru čiji se kraj nalazi na visokom naponu od 3 kV te se rasprši pri atmosferskom tlaku. Otapalo se uklanja strujom dušika te ioni analita ulaze u vakuum masenog spektrometra gdje se primjenom električnog ili magnetskog polja razdvajaju prema njihovoj masi (Slika 5.). Ioni oslobođeni ionizacijom elektroraspršenjem izrazito su stabilni i nisu u pobuđenom stanju pa ne dolazi do njihovog brzog raspada kao kod drugih ionizacijskih metoda (Wilm, 2011; Watson, 2012).



Slika 5. Mehanizam ionizacije elektroraspršenjem (preuzeto iz Nigović, 2018)

Tandemska masena spektrometrija (MS/MS) koristi ionizacijske tehnike koje ne uzrokuju fragmentaciju (npr. ESI) te ih povezuje s dodatnim analizatorom. Između dva se analizatora nalazi kolizijska ćelija ispunjena inertnim plinom koji inducira daljnju fragmentaciju odabranog prekursorskog iona odvojenog u prvom analizatoru. Fragmentacijom molekulskih iona dobivamo dodatne informacije o njihovim strukturama, a dobiveni se sekundarni fragmenti razdvajaju u drugom analizatoru. Prvi analizator tako zapravo predstavlja filter za prekursorski ion, dok drugi analizator daje spektar produkt iona. Dodatnim kolizijskim ćelijama i analizatorima postupak se fragmentacije i filtriranja može ponoviti još nekoliko puta (Watson, 2012; Ens i Standing, 2005).

Q-TOF (eng. quadrupole/time of flight) analiza vrsta je tandemске masene spektrometrije koja povezuje kvadrupolni analizator masa (Q) s analizatorom vremena leta (TOF). Kvadrupolni analizator masa predstavlja oscilirajuće električno polje kroz koje prolaze samo ioni određenog omjera mase i naboja koji rezoniraju s frekvencijom kvadrupola. Na ovaj je način omogućeno selektivno propuštanje iona odabranog m/z omjera, a odabrani se ioni dalje fragmentiraju u kolizijskoj ćeliji te razdvajaju u TOF analizatoru. Analizator vremena leta prvo ubrzava fragmente do velikih brzina a zatim ih pusti da slobodno putuju kroz dugu cijev. Mjeri se vrijeme putovanja svakog fragmenta, pri čemu je ionima manje mase i većeg naboja potrebno kraće vrijeme za dolazak do detektora. Q-TOF instrumenti tako kombiniraju ono najbolje od kvadrupolnih i TOF analizatora pa ih odlikuje visoka rezolucija i sposobnost mjerenja mase uz točnost na četiri decimalna mjesta (Watson, 2012; Nigović, 2018).

Masena spektrometrija esencijalna je analitička metoda za strukturnu karakterizaciju glikana. Ipak, činjenica da se MS temelji na omjeru mase i naboja dobivenih iona može predstavljati problem u analizi izomera zbog njihovih strukturnih razlika usprkos istoj masi.

Glikanske strukture stoga se najčešće određuju tandemskom masenom spektrometrijom kako bi se dobilo što više kompozicijskih informacija, a donekle se mogu odrediti i vezni položaji (Leymarie i Zaia, 2014). Većina se glikanske analize bazira na poznavanju biosintetskih puteva, a očekivane se strukture često dodatno potvrđuju sekundarnim tehnikama poput egzoglikozidazne digestije (Rakus i Mahal, 2011).

1.6. STANIČNE KULTURE

In vitro sustavi staničnih kultura omogućili su istraživanje rasta i diferencijacije stanica, kao i izvođenje genetičkih manipulacija nužnih za razumijevanje strukture i funkcije gena, proteina i glikana. Kulture animalnih stanica nastaju usitnjavanjem tkiva i dobivanjem suspenzija stanica koje se zatim stavljaju u posudicu za kulturu s hranjivim medijem. Većina tipova animalnih stanica (poput epitelnih stanica i fibroblasta) prihvaćaju se za dno stanične posudice i na njoj rastu. U istraživanjima se najčešće koriste tumorske stanice zbog njihovog brzog rasta, no i mnogi specijalizirani tipovi stanica također mogu uspješno rasti u kulturi. Hranjiva podloga za uzgoj animalnih stanica sadrži soli i glukozu, ali i različite aminokiseline i vitamine koje stanice ne mogu same sintetizirati. Medij također nerijetko sadrži i serum koji predstavlja izvor polipeptidnih faktora rasta nužnih za stimulaciju staničnog dioba.

Inicijalno uspostavljene stanične kulture nazivaju se primarnim staničnim kulturama, a obično rastu dok ne prekriju površinu dna posudice u kojoj se nalaze. Stanice se nakon toga mogu izvaditi i ponovno nasaditi u nove posudice što predstavlja sekundarnu kulturu. Taj se proces presađivanja može ponoviti mnogo puta, no većina stanica u kulturi ipak ne može beskonačno rasti. Nasuprot tomu, tumorske stanice imaju sposobnost neograničene proliferacije pa formiraju besmrtno stanične linije koje su iznimno korisne u istraživanjima jer predstavljaju kontinuiran i relativno uniforman izvor stanica (Cooper i Hausman, 2004).

Stanične kulture pružaju razne prednosti nad ostalim eksperimentalnim modelima. One omogućuju istraživanje u strogo definiranim i kontroliranim uvjetima oslobođenih kompleksnosti i varijabilnosti koje nalazimo *in vivo*. Rezultati se dobivaju znatno brže i uz manju cijenu, a njihova je interpretacija jednostavnija i preciznija. Zaključno, korištenje staničnih kultura nije moralno upitno i zadovoljava društvenu težnju za smanjenjem korištenja životinja u eksperimentalne svrhe (Dayeh i sur., 2013).

Istraživanje glikozilacije može se provoditi *ex vivo* analizom tkiva, krvi ili sluznica, *in vivo* korištenjem animalnih modela ili pak *in vitro* korištenjem staničnih linija. Iako stanične kulture omogućuju ekstenzivno istraživanje kroz dug vremenski period, prilikom donošenja

zaključaka valja biti iznimno oprezan jer se uvjeti u izoliranom sustavu mogu bitno razlikovati od onih *in vivo*. Također, zbog dvodimenzijske prirode staničnih kultura u plastičnim posudicama kao i nakupljanja mutacija njihovim višestrukim presađivanjem moguće su znatne promjene proučavanog glikoma (Chik i sur., 2014).

1.6.1. HepG2 I 1.1B4 STANIČNE LINIJE

Stanične linije hepatocelularnog karcinoma često se koriste kao *in vitro* alternativa humanim hepatocitima. Iako ih obilježava praktički besmrtni životni ciklus, stabilan fenotip i jednostavnost korištenja, njihov je ozbiljan nedostatak smanjena metabolička aktivnost u odnosu na hepatocite. Najčešće korištena stanična linija hepatocelularnog karcinoma u farmakotoksikološkim ispitivanjima je HepG2 linija. To su visoko proliferativne stanice bez tumorskog potencijala, a morfologija im je epitelna. Iako uspješno provode mnoge diferencirane hepatske funkcije, ekspresija pojedinih enzima i transportera važnih za metabolizam lijekova značajno je limitirana (Donato i sur., 2015). Ipak, realnije odražavaju *in vivo* uvjete u usporedbi sa subcelularnim modelima poput mikrosoma (Donato i sur., 2010).

Stanična linija 1.1B4 potječe od humanih beta stanica gušterače elektrofuzioniranih s besmrtnim stanicama linije PANC1. Tu novu staničnu liniju karakterizira stabilan rast i sposobnost lučenja inzulina, a posjeduju i ostale sekretorne funkcije beta stanica. Nedavne studije pokazuju da im je stanični odgovor na lipotoksičnost i citokinsku toksičnost vrlo sličan onome primarnih humanih beta stanica (Vasu i sur., 2013). Stanice su adherentne i po morfologiji epitelne, promjera 35 μm te im je vrijeme udvostručavanja otprilike 32 sata (Bečeheli, 2018). Zahvaljujući činjenici da su im signalni putevi i funkcije zajednički s humanim beta stanica, ova nova stanična linija pruža idealnu priliku za njihovo istraživanje (McCluskey i sur., 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikozilacija je najčešća i najkompleksnija posttranslacijska modifikacija kojom se glikanske strukture u sekretornom putu kovalentno vežu za proteine ili lipide. Gotovo je polovica ukupnih eukariotskih proteina glikozilirano čime se značajno utječe na proteinsku strukturu i stabilnost, kao i njegove funkcije. Glikanski dio može biti prisutan u različitim strukturnim oblicima tvoreći različite glikoforme iste molekule, a ta nam varijabilnost daje uvid u fiziološke i biokemijske uvjete stanice tijekom sinteze glikana. Iako glikanski dio glikoproteina nije direktno zapisan u genima, iznimna stabilnost N-glikanskog profila unutar pojedinca ukazuje na dominantnu genetsku uvjetovanost glikozilacije. Usprkos stotinama glikoziltransferaza, transportera, transkripcijskih faktora i drugih proteina, na sustavnoj je razini postojanost ovog procesa nevjerovatna. Promjene osobnog glikoma stoga su posljedica okolišnih faktora i patofizioloških procesa te kao takve imaju ogroman dijagnostički potencijal (Gornik i sur., 2009).

Iako su personaliziranom medicinom dugo dominirali genski markeri, ograničenja i nedovoljnost ovakvog pristupa sve su očitija. Iz tog se razloga krenulo u potragu za markerima koji bi odražavali i nenasljednu individualnu varijabilnost – starost, težinu, okoliš, prehrambene navike i ostalo. Zahvaljujući velikoj osjetljivosti glikozilacijske mašinerije na biokemijski okoliš u kojem se stanica nalazi, glikanski markeri stoga predstavljaju veliku priliku za dijagnozu brojnih bolesti (Etxebarria i Reichardt, 2016).

Zbog velikih ograničenja vezanih za provođenje studija *in vivo*, stanične linije se naširoko koriste kao modeli u istraživanjima. Zbog svog brzog rasta, dostupnosti, jednostavnosti i dobro definiranih uvjeta predstavljaju relevantnu alternativu drugim modelima (Holst i sur., 2016). Svakodnevno se koriste u preliminarnim ispitivanjima potencijalnih lijekova, a stanične linije deficitarne za pojedini glikozilacijski enzim pak predstavljaju neophodan alat za razumijevanje biosinteze N-glikana (Termini i sur., 2017).

Usprkos esencijalnoj ulozi staničnih kultura u biomedicinskim istraživanjima, znanstvena zajednica sve više propitkuje njihovu reprezentativnost, odnosno njihovu točnost kao model za originalno tkivo. Glavne sumnje za ispravnost ovakvog modela proizlaze iz činjenice da one ne posjeduju *in vivo* mikrookoliš i heterogenost, kao i to da njihov fenotip ovisi o uvjetima kulture (Wilding i Boldmer, 2014). Usporedbom genoma, stopa mutacija i ekspresije mRNA zaključeno je da postoji visok stupanj korelacije te da stanične linije prilično vjerno odražavaju primarno tkivo, no ovakvi se zaključci odnose samo na razinu gena. Upravo zbog te limitiranosti na gensku komponentu u donošenju zaključaka, sumnja u

ovakav oblik modela za istraživanje i dalje je prisutna. Unatoč dobroj genomskoj karakterizaciji, potrebno je stoga provesti detaljnu cjelokupnu karakterizaciju staničnih linija na molekularnoj razini. Određivanjem glikanskog profila i utvrđivanjem glikana karakterističnih za pojedinu staničnu liniju može se utvrditi prikladnost određene linije kao *in vitro* modela, a time i osigurati uspješnost istraživanja (Holst i sur., 2016).

Dobro je poznato da postoje značajne međusobne razlike u glikoformama između rekombinantnih proteina eksprimiranih u staničnim linijama sisavaca, insekata i kvasaca. Ipak, razlike u proteinskoj glikozilaciji između samih staničnih linija sisavaca znatno su manje poznate (Go i sur., 2013). Izbor stanične linije snažno utječe na glikanski profil jer on ovisi o repertoaru prisutnih glikozilacijskih enzima. Različite se linije stoga značajno razlikuju u glikanskim strukturama (Goh i Ng, 2018). Upravo zato glikanska karakterizacija staničnih linija može nam poslužiti kao presudni faktor za odabir odgovarajuće stanične linije u istraživanju, odnosno usporedbom glikanskih profila dobivenih *in vivo* i *in vitro* možemo odrediti uspješnost korištenog modela.

U ovom su radu odabrane stanične linije jetre i gušterače, organa koji imaju snažnu sekretornu funkciju i čiji se proteini redovito transportiraju u plazmu. Zbog činjenice da su gotovi svi eukariotski sekretorni proteini glikozilirani, očekivan je velik broj raznovrsnih glikana. Dobiveni glikanski profili uspoređeni su s poznatim plazmatskim glikanima s ciljem utvrđivanja razlika između glikozilacije u kulturi i živog organizma. Pažnja se usmjerila i na utvrđivanje prevladavajućih tipova glikana, ali i na sličnost između samih staničnih linija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORAK

Kao uzorak su korišteni metanol-kloroformni proteinski ekstrakti staničnih linija HepG2 i 1.1B4 dobiveni od Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. ANORGANSKE KEMIKALIJE

Tablica 2. Anorganske kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
Dinatrij hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Kalijev klorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Klorovodična kiselina (HCl)	Kemika
Natrijev klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich

3.2.2. ORGANSKE KEMIKALIJE

Tablica 3. Organske kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
2-pikolin boran (2-PB)	Sigma-Aldrich
Acetonitril (ACN)	Fluka
DMSO (dimetilsulfoksid)	Fluka
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Sigma-Aldrich
Ledena octena kiselina (CH_3COOH)	Merck
NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol) detergent	Sigma
Prokainamid (ProA)	Sigma-Aldrich
SDS (natrijev dodecil-sulfat) detergent	Sigma

3.2.3. BIOLOŠKE KEMIKALIJE

Tablica 4. Biološke kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
PNGazaF (peptid-N-glikozidaza)	Prozyme

3.2.4. OTOPINE I PUFERI

Tablica 5. Otopine i puferi

OTOPINA	PROIZVOĐAČ/NAČIN IZRADE
2% SDS	2 g SDS-a (natrijevog dodecil-sulfata) otopiti u 100 mL vode
30% octena kiselina u DMSO	Za 250 μ L otopine: u 175 μ L dimetilsulfoksida (DMSO) dodati 75 μ L octene kiseline
5xPBS	Za 200 mL pufera: otopiti 8,00 g NaCl, 1,38 g Na ₂ HPO ₄ , 0,29 g KH ₂ PO ₄ , 0,19 g KCl u 200 mL ultra čiste vode (miliQ H ₂ O), promiješati, otopinu filtrirati i prilagoditi pH s NaOH
96% acetonitril	Za 250 mL otopine: dodaje se 240 mL ACN-a i 10 mL H ₂ O (voda se dodaje zbog hidrofilnosti kolone u daljnjoj analizi glikana (HILIC))
Otopina za kalibraciju MS	Waters, Milford (2 μ g/ μ L otopine natrijevog jodida (NaI) u 50:50 izopropilnog alkohola i vode)
Otopina za označavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 μ L 30% octene kiseline u DMSO dodati 1,08 mg prokainamida (ProA) i 1,12 mg 2-pikolin borana (PB)

3.2.5. LABORATORIJSKA OPREMA I PRIBOR

Tablica 6. Laboratorijska oprema i pribor

OPREMA I PRIBOR	PROIZVOĐAČ
AcroPrep 96 GHP 0,2 µm filter pločica od 1 mL	Pall
Bio Vortex V1	Biosan
Centrifuga	Centifuge 5804 Eppendorf
Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Ranin
NanoAcquity UPLC analizator	Waters, Milford
PCR pločice	Frame Star
Pločice za pročišćavanje glikana	Orochem
Pločice za skupljanje uzoraka; polipropilen; 1 mL zapremnine; za 96 uzoraka	Waters, Milford
Synapt G2-Si MS system	Waters, Milford
Tresilica Schüttler MTS 4	IKA
Vacuum manifold – vakuumska pumpa	Pall Corporation
AB54-S, analitička vaga	Mettler Toledo
Waters Acquity UPLC kromatograf	Waters, Milford
Kolona za kromatografiju ACQUITY UPLC®BEH Glycan 1.7 µm	Waters, Milford

3.3. PRIPREMA UZORAKA

Kao uzorak su korišteni liofilizirani glikoproteini koje je prije analize potrebno obraditi. Prije svega, potrebno je osloboditi glikane s glikoproteina, odnosno provesti deglikozilaciju PNGazom F koja specifično kida vezu između šećera i proteina. Kako bi se PNGazi F sterički olakšao pristup asparaginskom ogranku, provodimo denaturaciju proteina. Slobodne glikane zatim je potrebno označiti fluorescentnom bojom kako bi se mogli detektirati fluorescencijskim detektorom na UPLC-u. Njihovo označavanje odvija se reduktivnom aminacijom u kiselim uvjetima s prokainamidom i reducirajućim agensom 2-pikolin boranom uz DMSO, a obilježeni se glikani potom pročiste od proteina i ostataka ostalih molekula.

3.3.1. DENATURACIJA PROTEINA

1,33% SDS, 4% Igepal i 5xPBS ostavimo da postignu sobnu temperaturu. Denaturacija se provodi dodatkom 30 μ L 1,33% SDS-a u svaku jažicu s uzorkom pipetom i to s nastavkom od 250 μ L. Uzorak se sa SDS-om nekoliko puta promiješa uvlačenjem u nastavak pipete nakon čega slijedi zatvaranje pločica adhezivnom folijom i inkubacija na 65 °C tijekom 10 minuta. Nakon inkubacije ostaviti pločicu 30 minuta na sobnoj temperaturi da se ohladi. Nakon ohlađenja, nastavkom od 250 μ L uzorcima se dodaje 10 μ L 4% Igepala koji veže SDS i time sprječava denaturaciju PNGaze F. Uzorci se promiješaju te se pločica s uzorcima stavlja na tresilicu tijekom 15 minuta.

3.3.2. DEGLIKOZILACIJA

Enzimska smjesa dobije se miješanjem 10 μ L 5xPBS i 0,12 μ L PNGaze F po uzorku. Nastavcima od 250 μ L dodati po 10 μ L enzimske smjese svakoj jažici i suspendirati uvlačenjem u nastavak pipete nekoliko puta. Pločica s jažicama prekrije se adhezivnom folijom i inkubira na 37 °C tijekom 18 sati prilikom čega dolazi do oslobađanja glikana.

3.3.3. PRIPREMA OTOPINE ZA OBILJEŽAVANJE GLIKANA

Otopina za označavanje glikana sastoji se od 25 μ L 30%-tne octene kiseline, 1,08 mg prokainamida i 1,12 mg 2-pikolin borana po uzorku. Prije vaganja birno je ostaviti 2-pikolin boran da postigne sobnu temperaturu. Otopina se priprema u digestoru dodavanjem 30%-tne octene kiseline u DMSO, a dobivena smjesa se potom doda u prokainamid i vorteksira do potpunog otapanja. Zatim dodati u 2-pikolin borana i opet vorteksirati do potpunog otapanja.

3.3.4. OBILJEŽAVANJE UZORKA

U svaku jažicu s uzorkom dodati 25 μ L otopine za obilježavanje koristeći pipetu s nastavcima od 250 μ L uz miješanje uvlačenjem u nastavak pipete. Ukoliko dođe do pjenjenja uzorka, potrebno ga je nakratko centrifugirati. Adhezivnom folijom prekriti pločicu i ostaviti na tresilici 10 minuta, a zatim inkubirati na 65°C tijekom dva sata. Nakon toga pločica se tijekom pola sata hladi na sobnoj temperaturi kako bi uzorci bili spremni za nanošenje na prethodno pripremljenu AcroPrep GHP 0,2 μ m filter pločicu s hidrofilnom polipropilenskom membranom na koju se vežu glikani.

3.3.5. PREKONDICIONIRANJE GHP PLOČICE

Prekondicioniranje GHP pločice se vrši ispiranjem pomoću vakuumske pumpe, pri čemu tlak pumpe ne smije prelaziti 2 inHg kako se ne bi oštetila hidrofilna polipropilenska membrana. Najprije se GHP pločica ispiri s 200 μ L svježe pripremljenog 70%-tnog etanola, zatim s 200 μ L ultra čiste vode te na kraju s 200 μ L svježe pripremljenog 96%-tnog acetonitrila prethodno ohlađenog na 4 °C. Acetonitril se dodaje posljednji jer se u daljnjem postupku koristi kao otapalo. Za ovaj korak koristiti nastavke od 300 μ L.

3.3.6. NANOŠENJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA NA GHP PLOČICU

Dodati 700 μ L hladnog 100% acetonitrila u svaki uzorak prokainamidom obilježenih glikana, promiješati uvlačenjem u nastavak pipete te prenijeti cijeli volumen uzorka od oko 800 μ L (75 μ L uzorka + 700 μ L ACN) na GHP pločicu. Koristiti nastavke od 1 mL. Zatim inkubirati tijekom 2 minute kako bi se omogućilo vezanje glikana za pločicu te ukloniti preostalu tekućinu vakuuskom pumpom.

3.3.7. PROČIŠĆAVANJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA

Pročišćavanje se provodi ispiranjem svake jažice pločice pomoću vakuumske pumpe s 200 μ L svježe pripremljenog 96%-tnog acetonitrila prethodno ohlađenog na 4 °C. Postupak ispiranja ponovi se još tri puta. Nakon završnog ispiranja GHP pločicu staviti na pločicu za sakupljanje uzoraka zapremnine 1 mL. Ponovo u svaku jažicu pipetirati 200 μ L hladnog 96%-tnog acetonitrila i sve skupa centrifugirati na 1000 rpm tijekom 5 minuta.

3.3.8. ELUACIJA OBILJEŽENIH N-GLIKANA

GHP pločica se postavi na čistu ABgene PCR pločicu za sakupljanje uzoraka. U svaki uzorak dodati 90 μ L ultra čiste vode koristeći nastavke od 300 μ L i staviti na tresilicu tijekom 15 minuta. Zatim se GHP pločica zajedno s PCR pločicom za sakupljanje uzoraka centrifugira na 1000 rpm tijekom 5 minuta kako bi se sakupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Navedeni postupak se provede još jednom, nakon čega je potrebno provjeriti ima li zaostalih kapljica na GHP pločici, odnosno je li sav sadržaj eluirao. Ukupan volumen eluata mora biti oko 180 μ L po jažici. Nakon provjere zatvoriti PCR pločicu s PCR poklopcem i pohraniti u zamrzivač.

3.3.9. PGC KONCENTRIRANJE

Grafit se ukloni iz spremnika i prebaci u epruvetu te se pripremi metanolna suspenzija koncentracije 50 mg/ml. Zatim se u Eppendorf epruvete stave prazni C18 nastavci za pipete te se u svaki nastavak pipetira 50 µl dobivene suspenzije kako bi se dobila mala PGC kolona. Epruvete se stave centrifugirati na 2000g kako bi se formirale kompaktne kolone i uklonile manje čestice. Sadržaj epruvete se odbaci. Nakon toga kolona se ispiri i centrifugira 2 puta s 60 µl vode, a zatim i 2 puta s 60 µl 100%-tnog acetonitrila. Sadržaj epruvete nakon svakog se ispiranja odbaci. Na tako pripremljenu kolonu stavlja se uzorak te se centrifugira. Uzorak se zatim dodatno ispiri i centrifugira korištenjem 60 µl vode, čime smo dobili PGC kolonu na koju su vezani isključivo glikani. Za njihovu eluciju s kolone koristi se 40 µl 75% acetonitrila i 100 mM amonijeva formijata, a eluat se prebaci u vialu za UPLC analizu. U svaku vialu doda se 10 µl 100% acetonitrila kako bi se nadoknadili njegovi gubitci zbog vezanja na kolonu.

3.4. ANALIZA UZORAKA

Nakon izolacije, N-glikani se analiziraju HILIC-UPLC metodom na *Waters Acquity* UPLC instrumentu (Waters, Milford, MA, USA). Uređaj se sastoji od jedinice za pripravu mobilne faze, automatskog injektora uzoraka i fluorescentnog detektora. Za razdvajanje glikana koristila se HILIC kolona *Waters BEH* dimenzija 150x2,1 mm i veličine čestica od 1,7 µm. Mobilnu fazu čine 50 mM otopina amonijeva formijata (pH 4,4) kao otapalo A i acetonitrila kao otapalo B. Temperatura kolone postavljena je na 25°C, a temperatura uzoraka na 10°C. Brzina protoka kroz prvih 24,81 minuta iznosi 0,561 mL/min, a pomoću programa *Empower 2* zadaju se uvjeti gradijentne elucije prema kojima se udio acetonitrila kroz to razdoblje promijeni od 70 do 53% (Tablica 7.). Valna je duljina ekscitacije fluorescentnog detektora za prokainamid 310 nm, a valna duljina detekcije 370 nm. Nakon provedene automatske integracije dodatno su se ručno integrirale površine pikova dobivenog kromatograma čime je izračunat relativni udio svakog glikanskog pika u ukupnom glikanskom profilu.

Tablica 7. Promjena udjela otapala A i B tijekom kromatografske analize

VRIJEME/min	PROTOK/(mL/min)	% otapalo A	% otapalo B
0	0,561	30,0	70,0
1,47	0,561	30,0	70,0
24,81	0,561	47,0	53,0
25,50	0,250	70,0	30,0
27,00	0,250	70,0	30,0
28,00	0,250	30,0	70,0
31,50	0,561	30,0	70,0

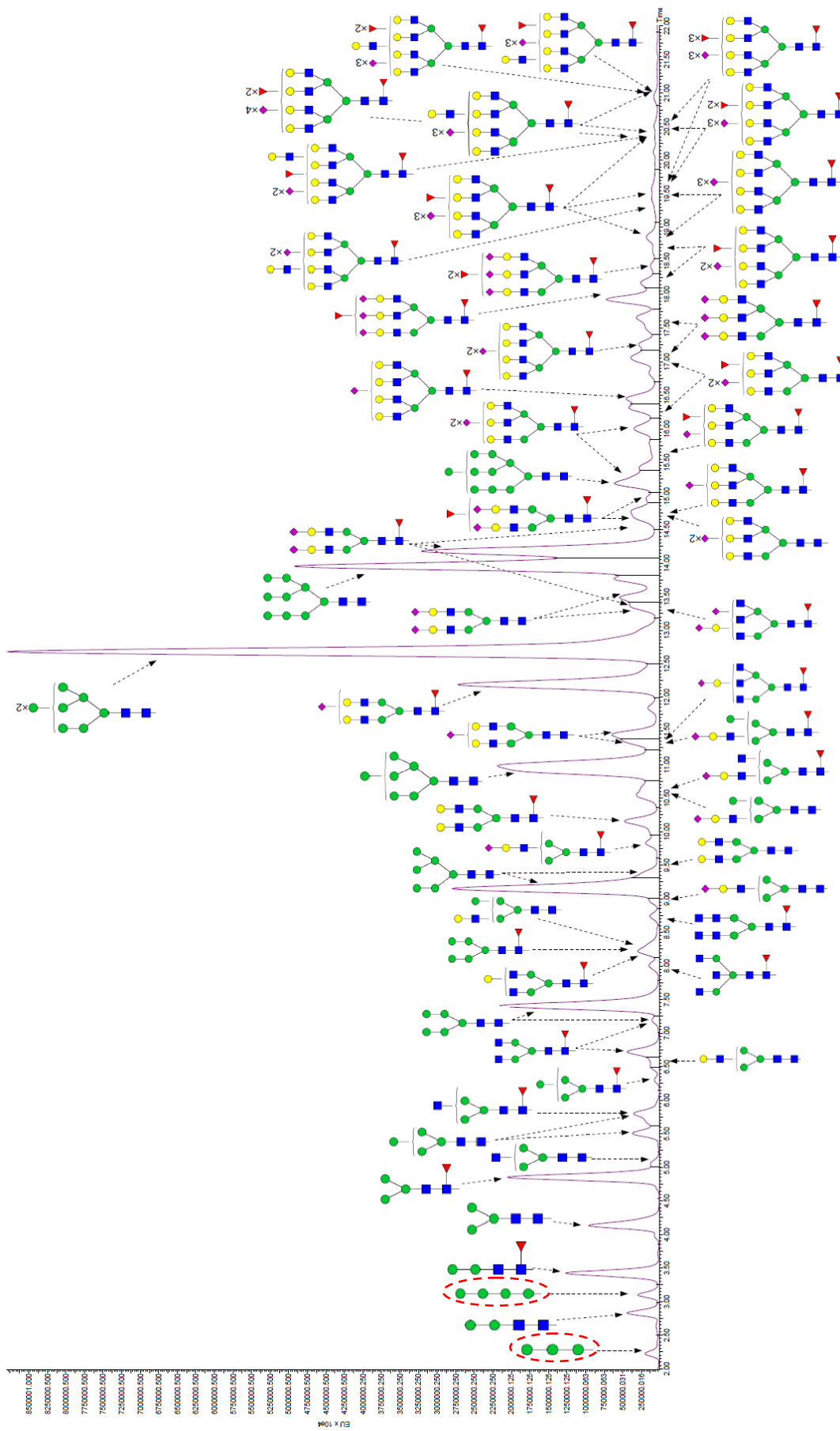
UPLC instrument je bio spregnut sa *Synapt G2-Si* MS sustavom (Waters, Milford, MA, USA). Maseni spektrometar je pod kontrolom programa *MassLynx v. 4.1* (Waters, Milford, MA, USA). Uvjeti za MS su bili: pozitivni ionski mod, napon kapilare 3 kV, napon stošca za uzorkovanje 30 V, temperatura izvora 120 °C, temperatura desolvacije 350 °C, a protok plina 800 L/h. Maseni spektar je sniman na frekvenciji od 1 Hz u rasponu m/z od 500 do 3000. MS/MS analiza provedena je u modu akvizicije neovisne o podacima (data-dependent acquisition, DDA). Najprije su snimljeni spektri od 500 do 3000 m/z pa su iz njih odabrana tri prekursora s najvišim intenzitetima za CID fragmentaciju (sniman je spektar m/z 100 to 3000). Za fragmentaciju je korišten raspon kolizijskih energija (LM CE Ramp Start 7 V, LM CE Ramp End 12 V, HM CE Ramp Start 105 V, HM CE Ramp End 115 V). Analiza MS/MS provedena je uz pomoć programa *MassLynx v. 4.1* i *GlycoWorkbench 2.1*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

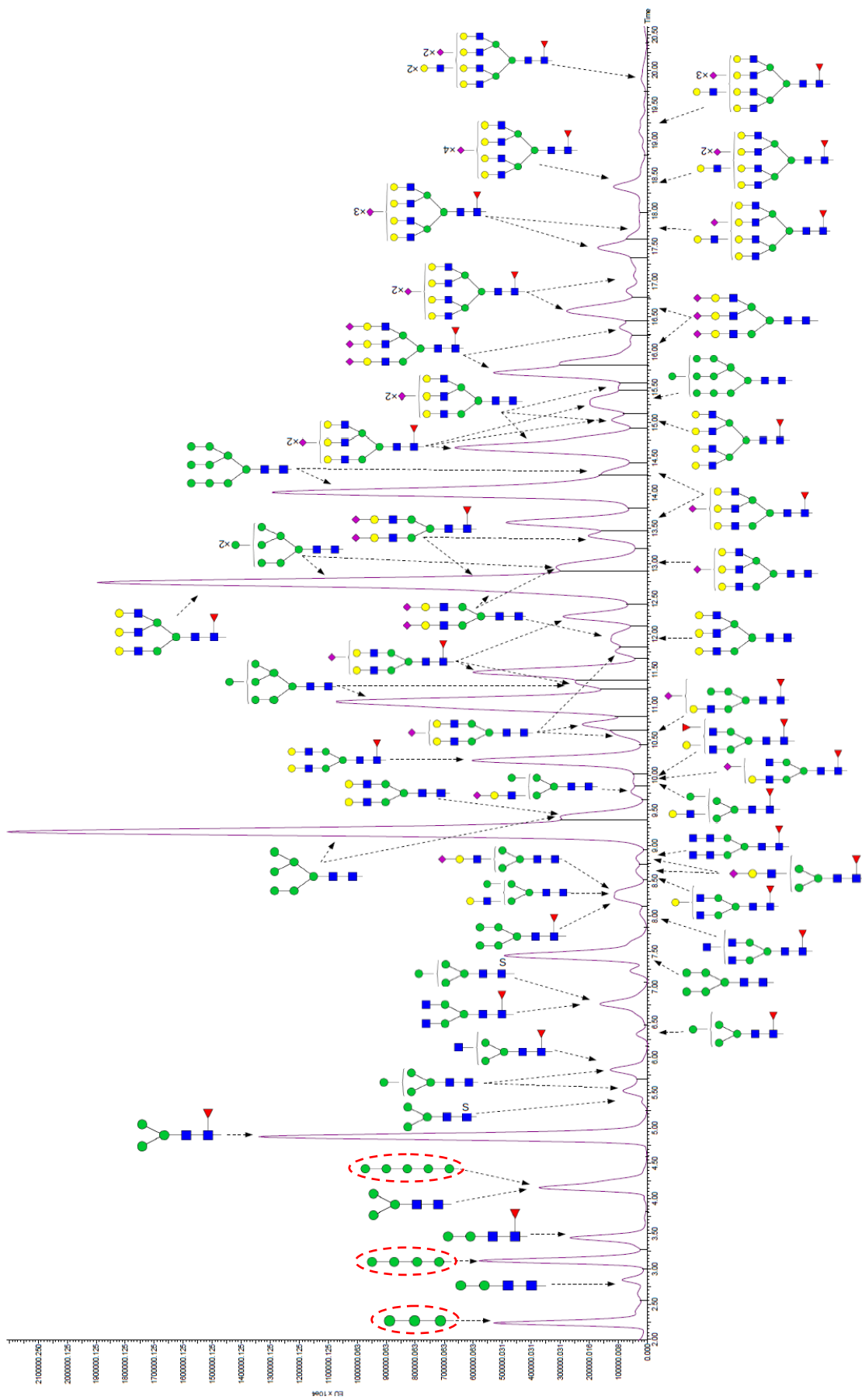
Cilj ovog diplomskog rada je strukturna karakterizacija N-glikanskog profila proteina stanične linije HepG2 i 1.1B4 HILIC-UPLC-FLR-MS/MS metodom. Priprema za analizu uključivala je oslobađanje N-glikana PNGazom F, a zbog što uspješnije enzimatske deglikozilacije prethodno je provedena denaturacija proteina. Slobodni su glikani zatim obilježeni prokainamidom kao fluorescentnom bojom nakon čega su bili spremni za analizu. Odijeljeni su tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti temeljene na hidrofilnim interakcijama i analizirani tandemskom masenom spektrometrijom u pozitivnom ionskom modu. Rezultati dobiveni nakon obrade podataka prikazani su asigniranim FLR kromatogramima i tablicama sa strukturnim prikazom glikanskih pikova.

Analiza HILIC-UPLC metodom mjeri vrijeme zadržavanja na koloni svakog glikana u uzorku, što se grafički prikazuje kromatogramom. Na apscisi je kromatograma retencijsko vrijeme pojedinog glikana, dok ordinata predstavlja intenzitet izmjerene fluorescencije u određenom trenutku. Ovom metodom manji glikani eluiraju prvi, dok oni veći imaju dulje retencijsko vrijeme. Naime, velike glikanske strukture s većim brojem šećernih podjedinica zbog svoje hidrofilnosti snažno stupaju u interakcije s hidrofilnom stacionarnom fazom te se dulje zadržavaju na koloni. Glikani s manjim brojem šećernih podjedinica zbog svoje manje hidrofilnosti slabije stupaju u interakcije s kolonom te stoga ranije izlaze, odnosno imaju kraće retencijsko vrijeme. Na Slici 6. i 7. rezultati analize HILIC-UPLC metodom prikazani su u obliku kromatograma podijeljenih na glikanske pikove s asigniranim strukturama. Pojedinih pikovima pripada više glikana koji su zbog svoje sličnosti zajedno eluirali. Strukture glikana sadržanih unutar glikanskog pika određene su na temelju MS/MS spektra korištenjem programa *GlycoMod* i *GlycoWorkbench*, a površina ispod svakog pika predstavlja udio pojedinih glikana u uzorku. Na kromatogramima se jasno vidi da jednostavnije manje strukture eluiraju prve, dok znatno kompleksniji glikani imaju duže retencijsko vrijeme.

Pet zaokruženih struktura uopće nisu N-glikani, iako daju fluorescencijski signal na kromatogramima. Kako bismo provjerili da je riječ uistinu o N-glikanskim strukturama, uzorke smo analizirali još jednom, ali ovaj put ih nismo obradili PNGazom F, odnosno nismo proveli deglikozilaciju. Pikove retencijskog vremena 2.25 i 3.10 min na staničnoj liniji HepG2, odnosno pikove retencijskog vremena 2.20, 3.20 i 4.25 min na liniji 1.1B4 vidjeli smo i prilikom te analize, dok su svi ostali pikovi izostali. Očito je riječ o strukturama koje su prisutne u uzorku i ne daju se lako ukloniti pročišćavanjem, a definitivno nisu N-glikani.

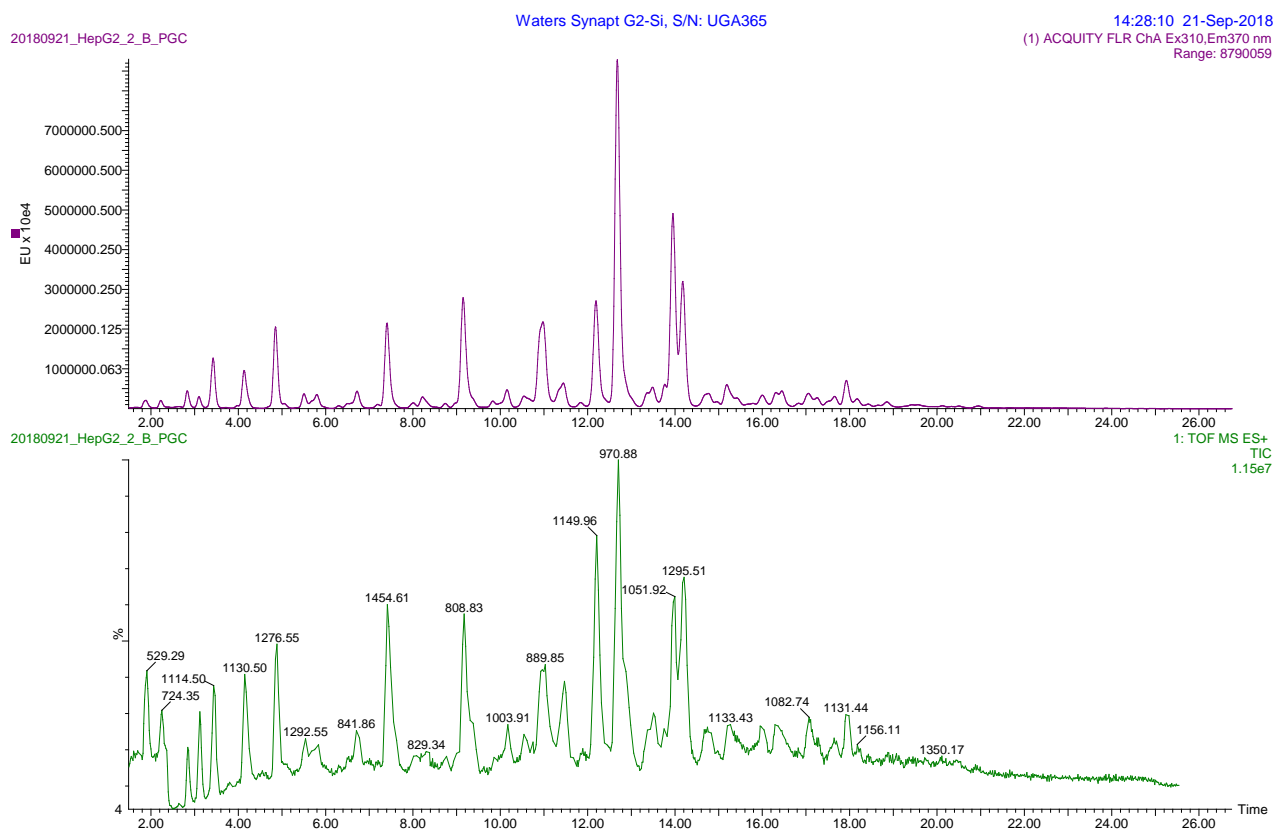


Slika 6. Glikani stanične linije HepG2 - FLR kromatogram sa asigniranim strukturama



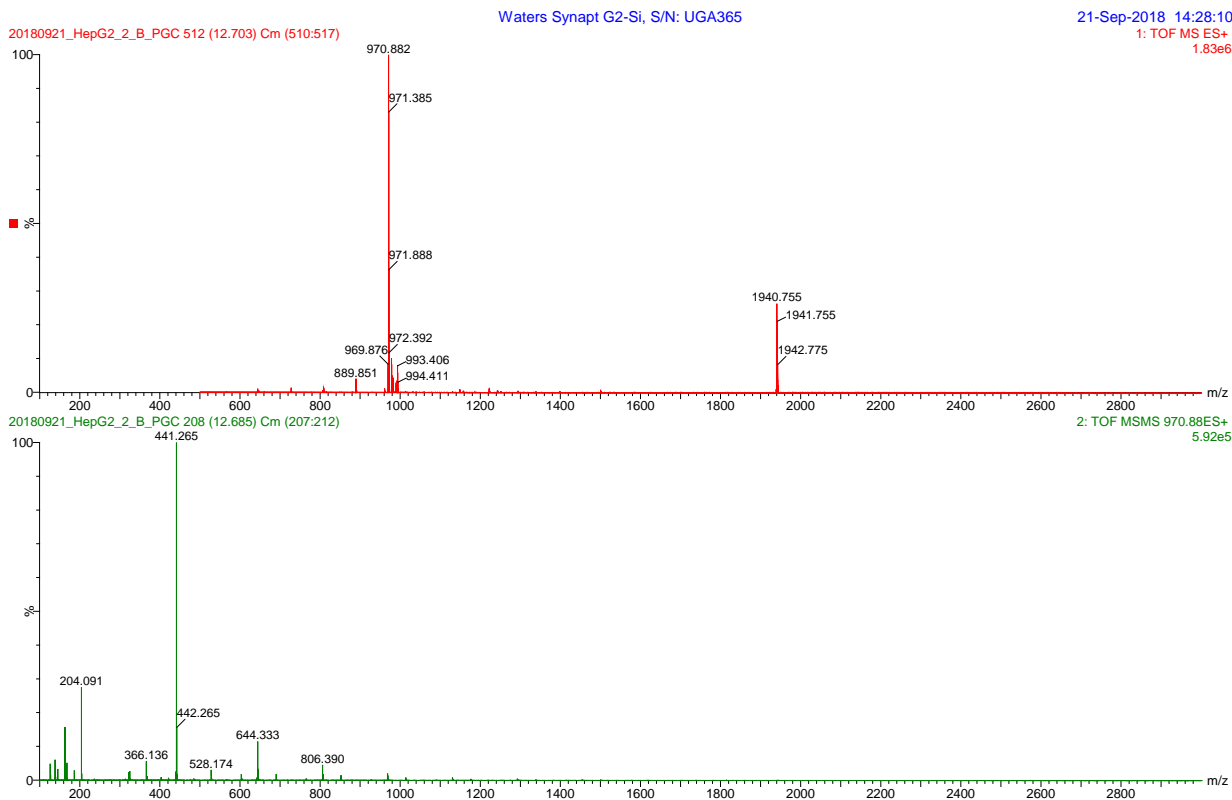
Slika 7. Glikani stanične linije 1.1B4 - FLR kromatogram sa asigniranim strukturama

Detaljan uvid u glikanske strukture na temelju dobivenih kromatograma, MS i MS/MS spektara omogućen je uz pomoć programa *MassLynx v. 4.1*, *GlycoWorkbench 2.1* i *GlycoMod*. Program *MassLynx v. 4.1* (Slika 8. i 9.) koristio se za pregled dobivenih kromatograma i spektara, a njegovi alati *Automatic peak detection* i *TOF transform* poslužili su za prvotnu obradu MS/MS spektara.



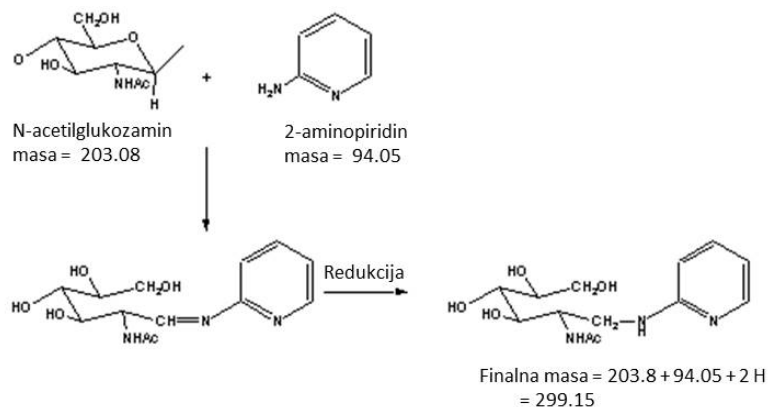
Slika 8. Prikaz fluorescencijskog kromatograma ovisnosti intenziteta signala o vremenu i TIC (eng. total ion current) kromatograma analize stanične linije HepG2 u programu *MassLynx*

Iz dobivenih m/z omjera možemo vrlo precizno izračunati molekulske mase glikana i time razlikovati masom izrazito slične glikane. Naboj se pojedinog ionskog fragmenta zaključuje prema izotopnom profilu u samom spektru. Naime, proučavanjem spektra i utvrđivanjem razlike m/z omjera između izotopa možemo jednostavno odrediti radi li se o jednostruko, dvostruko ili trostruko nabijenom ionskom fragmentu, pa ovisno o naboju lako izračunamo eksperimentalnu masu glikana.



Slika 9. Prikaz MS i MS/MS fragmentacijskog spektra dvostruko nabijenog glikana iz najintenzivnijeg pika stanične linije HepG2 u programu MassLynx

Potrebno je obratiti pozornost da se izmjerene mase odnose na derivatizirane, a ne na slobodne glikane. Eksperimentalna masa odnosi se stoga na masu glikana obilježenog fluorescentnom bojom. Dobivene mase uvećane su dakle za monoizotopnu molekulsku masu prokainamida dodatno uvećanog za još dvije monoizotopne mase vodika, što je posljedica reakcije reduktivne aminacije (Slika 10.).



Slika 10. Eksperimentalne mase odnose se na derivatizirane glikane čija je masa jednaka zbroju masa slobodnog glikana, fluorescentne boje (primjer 2-AP) i 2 atoma vodika

Iz vrlo precizno eksperimentalno određene mase glikana možemo pomoću *GlycoMod* programa odrediti njihove moguće strukturne kompozicije. Unosom izmjerene mase glikana, kao i mase korištene fluorescentne boje (u našem slučaju prokainamida), dobivamo popis potencijalnih strukturnih formula pojedinog glikana (Slika 11.). Odabiremo strukturnu formulu koja odgovara našim očekivanjima i čija teorijska masa najmanje odstupa od eksperimentalne mase određene masenim spektrometrom.

ExpASY
Bioinformatics & Metabolism Portal

GlycoMod

Home | Contact

GlycoMod
[Documentation / Mass values / Reference / Disclaimer].

User mass: 1682.727
Adduct ([M+H]⁺): 1.00727
Derivative mass (ProA): 237.184097

glycoform mass	Δmass (Dalton)	structure	type	Links
1444.338	0.198	(HexNAc) ₂ (NeuGc) ₂ (Pent) ₂ (Sulph) ₂	paucimannose	
1444.357	0.179	(HexNAc) ₂ (NeuGc) ₂ (Pent) ₂ (Phos) ₂	paucimannose	
1444.491	0.045	(HexNAc) ₆ (Deoxyhexose) ₁ (Sulph) ₁	-	
1444.498	0.038	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ (NeuGc) ₁ (Pent) ₁	paucimannose	
1444.498	0.038	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂ (Pent) ₁	paucimannose	
1444.501	0.035	(HexNAc) ₆ (Deoxyhexose) ₁ (Phos) ₁	-	
1444.534	0.002	(HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	hybrid/complex	GlyConnect

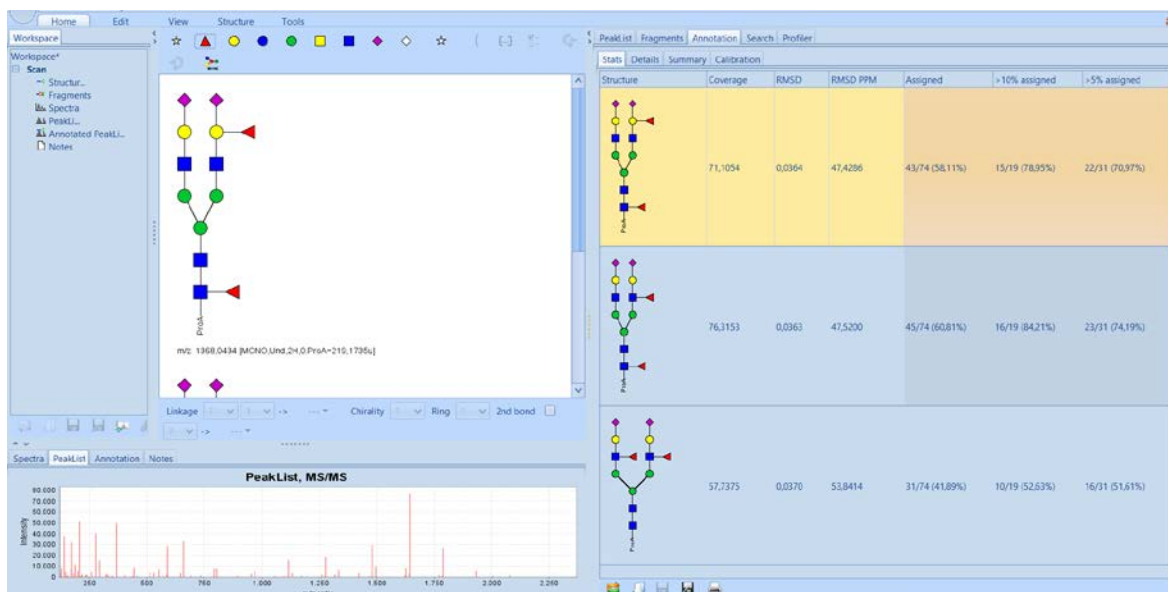
7 structures found.

SIB Swiss Institute of Bioinformatics | Disclaimer

Back to the Top

Slika 11. Program GlycoMod - predložene strukturne formule na temelju izmjerene mase

Za potvrdu strukture korišten je program *GlycoWorkbench 2.1*. Program se koristio za usporedbu dobivenih masa glikana s teorijskim masama iz *GlycoWorkbench* (GWB) baze podataka, kao i za anotaciju MS/MS spektra fragmentima potencijalnih glikanskih struktura (Slika 12.). Manualna anotacija spor je i mukotrpan posao koji se na ovaj način značajno olakšava. Ovim se programom evaluirala predložena struktura do koje se došlo na temelju odgovarajuće strukturne formule dobivene *GlycoMod* programom. Svi se teoretski mogući fragmenti predložene strukture uspoređuju s fragmentacijskim spektrom te se programom utvrdi vjerojatnost svakog predloženog strukturnog izomera. Glikanska struktura koja ima najveći postotak anotacije ujedno najbolje odgovara izmjerenom MS/MS spektru te je upravo to struktura koju tražimo. Anotirane strukture detaljno su manualno pregledane i dodatno empirijski potvrđene. Valja napomenuti da je na temelju prijašnjih istraživanja uočeno kako *GlycoWorkbench* poneki fragment pogrešno assignira, što je uzeto u obzir prilikom vrednovanja pojedinih struktura. Također, za veću sigurnost i potvrdu strukture kompleksnijih glikana bilo bi potrebno provesti fragmentaciju u negativnom modu u kojem se zbog pucanja samih glikanskih prstena dobiva znatno više informacija o njihovoj strukturi.



Slika 12. Anotacija glikana s prikazom vjerojatnosti za svaki pojedini strukturalni izomer

Analizom su utvrđena 47 glikanska pika u HepG2 staničnoj liniji, odnosno 46 pika u liniji 1.1B4. Glikanski profili uvelike se preklapaju, uz nekoliko karakterističnih glikana za svaku staničnu liniju. Eksperimentalno dobivene glikanske strukture prikazane su u Tablici 5. i 6., a navedene su prema redosljedu eluiranja, odnosno retencijskom vremenu. Jasno se vidi da porastom šećernih podjedinica raste i retencijsko vrijeme pa stoga kompleksnije strukture eluiraju kasnije. U glikoproteinima obje stanične linije prisutna su sva tri tipa N-vezanih glikana, a definitivno je najmanji udio onih hibridnih. Iako je većina utvrđenih glikana kompleksnog tipa, najintenzivnijim pikovima pripadaju oligomanozne strukture što je u skladu s prethodno objavljenim radovima koji su proučavali N-glikanske profile staničnih linija. Upravo ta velika prisutnost oligomanoznih struktura predstavlja bitnu razliku između glikana staničnih linija i plazmatskih glikana (Slika 13.). Naime, za razliku od staničnih linija, u plazmi značajno dominira kompleksni tip glikana dok je udio oligomanoznog tipa znatno manji. Posljedica je to činjenice da glikoproteini namijenjeni sekreciji prolaze kroz visokoreguliran proces terminalne glikozilacije u Golgijevom aparatu kojim se na pentasaharidnu glikansku jezgru dodaju raznoliki šećeri tvoreći kompleksni tip N-vezanih glikana. Unutarstanični glikoproteini izbjegavaju taj ključan proces, kao i proces skraćivanja i procesuiranja, jer nastaju u ER-u pa im ostane prekursorska glikanska jezgra bogata manoznim podjedinicama. Stanične linije jetre i gušterače, iako pripadaju važnim sekretornim organima te zasigurno proizvode brojne glikoproteine namijenjene izlasku iz stanice, očito sadrže i veliku količinu unutarstaničnih proteina glikoziliranih oligomanoznim strukturama. Upravo su to strukture po kojima se razlikuju glikanski profili plazme i staničnih linija.

Tablica 5. Glikanski pikovi sa asigniranim strukturama uz odgovarajuće retencijsko vrijeme, eksperimentalno određenu i teorijsku masu te njihovo odstupanje, udio glikana u piku kao i relativni udio pika u ukupnom uzorku za staničnu liniju HepG2

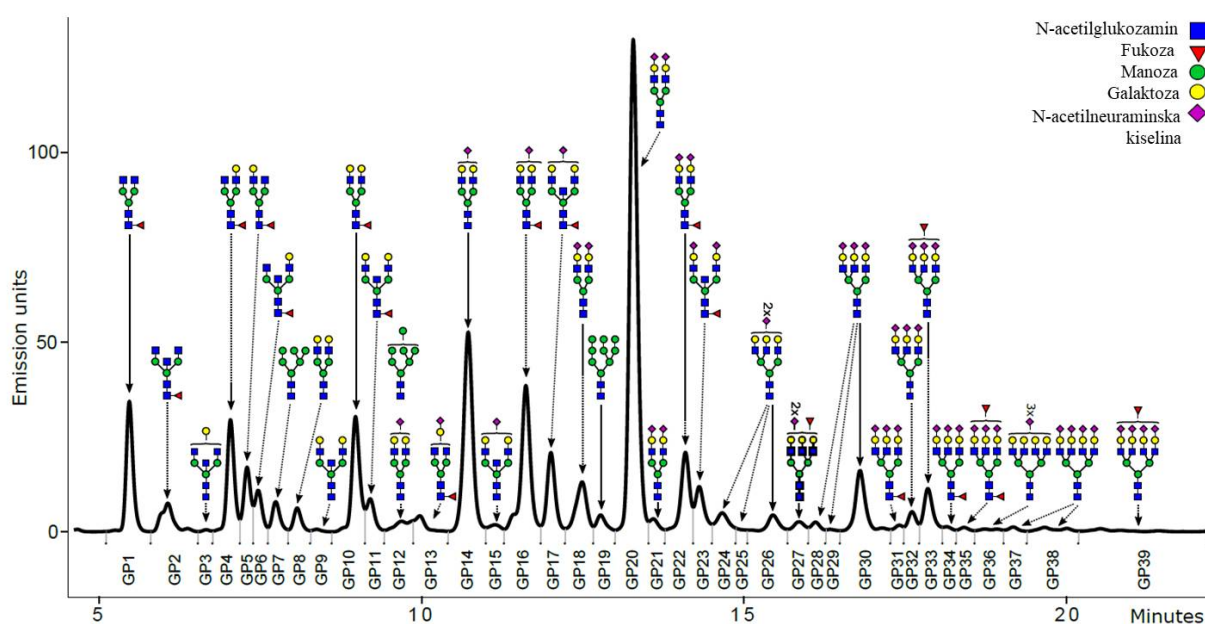
	Izmjerena masa/Da	Strukturna formula	Predložena struktura	Retencijsko vrijeme/min	Teorijska masa/Da	Odstupanje mase/ppm	Udio glikana u piku	Relativni udio pika/%
GP1	968,449	(Hex)2 (HexNAc)2		2,8	968,456	-6,92	100%	1,05
GP2	1114,502	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1		3,4	1114,514	-10,41	100%	2,78
GP3	1130,497	(Hex)3 (HexNAc)2		4,2	1130,509	-10,26	100%	2,27
GP4	1276,554	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1		4,85	1276,567	-9,79	100%	4,27
GP5	1333,573	(HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		5,05	1333,588	-11,17	100%	0,30
GP6	1292,555	(Hex)4 (HexNAc)2		5,5	1292,561	-4,95	100%	0,80
GP7	1292,555	(Hex)4 (HexNAc)2		5,8	1292,561	-4,95	57%	1,04
	1479,631	(HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2			1479,646	-10,00	43%	
GP8	1438,608	(Hex)4 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1		6,3	1438,619	-7,85	100%	0,16
GP9	1495,637	(Hex)1 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		6,6	1495,641	-2,54	100%	0,36
GP10	1682,727	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		6,7	1682,725	1,07	100%	0,91
GP11	1682,727	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		7,2	1682,725	1,07	38%	0,17
	1454,608	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2			1454,614	-4,26	62%	
GP12	1454,608	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2		7,45	1454,614	-4,26	100%	4,22
GP13	1885,781	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,05	1885,805	-12,51	100%	0,32
GP14	1600,667	(Hex)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,25	1600,672	-3,19	44%	0,92
	1657,676	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			1657,694	-10,62	29%	
	1844,751	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2			1844,778	-14,64	27%	
GP15	2088,864	(HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,75	2088,884	-9,57	100%	0,24
GP16	1786,722	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,95	1786,736	-7,95	100%	0,19
GP17	1616,652	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2		9,2	1616,667	-9,28	100%	5,10
GP18	1616,652	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2		9,45	1616,667	-9,28	33%	0,32
	1860,767	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			1860,773	-3,17	67%	
GP19	1932,769	(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		9,85	1932,794	-12,99	100%	0,32

GP20	2006,823	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		10,2	2006,831	-3,94	100%	1,15
GP21	1948,781	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		10,6	1948,789	-4,11	70%	0,89
	2135,846	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2135,874	-12,88	30%	
GP22	1778,695	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2		11	1778,720	-14,00	100%	6,05
GP23	2094,821	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		11,3	2094,847	-12,36	44%	0,87
	2151,853	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2151,868	-7,16	25%	
	2338,929	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2338,953	-10,18	31%	
GP24	2151,853	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		11,7	2151,868	-7,16	100%	1,32
GP25	2297,913	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		12,2	2297,926	-5,79	100%	6,22
GP26	1940,755	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2		12,7	1940,773	-9,12	100%	18,25
GP27	2442,935	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		13,35	2442,964	-11,79	23%	0,79
	2589,001	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2589,022	-8,00	45%	
	2630,023	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2630,048	-9,58	32%	
GP28	2442,935	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		13,6	2442,964	-11,79	100%	2,21
GP29	2102,825	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2		13,9	2102,826	-0,24	100%	10,40
GP30	2589,001	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		14,25	2589,022	-8,00	100%	7,64
GP31	2589,001	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		14,75	2589,022	-8,00	16%	1,43
	2663,049	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2663,059	-3,57	34%	
	2735,075	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2735,080	-1,68	23%	
	2808,059	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2808,096	-13,18	27%	
GP32	2735,075	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		15	2735,080	-1,68	100%	0,47
GP33	2264,861	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2		15,25	2264,878	-7,64	62%	1,79
	2954,114	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2954,154	-13,51	38%	
GP34	2809,073	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		15,6	2809,116	-15,45	100%	1,07
GP35	2954,114	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		16	2954,154	-13,51	100%	0,94
GP36	3100,163	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		16,3	3100,212	-15,74	100%	0,94

GP37	3028,175	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		16,5	3028,191	-5,18	100%	1,10
GP38	3100,163	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		17,1	3100,212	-15,74	53%	1,57
	3245,210	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3245,249	-12,11	47%	
GP39	3319,283	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		17,3	3319,286	-0,93	100%	0,64
GP40	3245,210	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		17,65	3245,249	-12,11	100%	1,16
GP41	3391,283	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		17,9	3391,307	-7,14	100%	1,90
GP42	3465,299	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		18,2	3465,344	-12,99	100%	0,71
GP43	3537,329	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		18,45	3537,365	-10,21	100%	0,28
GP44	3465,299	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		18,75	3465,344	-12,99	16%	0,74
	3610,370	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3610,382	-3,19	45%	
	3756,371	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3756,439	-18,21	39%	
GP45	3610,370	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		19,2 – 19,8	3610,382	-3,19	19%	0,92
	3684,386	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			3684,418	-8,77	18%	
	3756,371	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3756,439	-18,21	25%	
	3902,432	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3902,497	-16,73	25%	
	4048,487	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)4 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			4048,555	-16,85	13%	
GP46	3756,371	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		19,8 – 20,8	3756,439	-18,21	21%	0,58
	3975,503	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3975,514	-2,69	16%	
	3902,432	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3902,497	-16,73	14%	
	3830,411	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			3830,476	-17,02	18%	
	4048,487	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)4 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			4048,555	-16,85	18%	
	4193,597	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2			4193,593	1,03	13%	











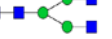


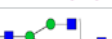
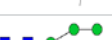








GP47	3975,503	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		20.8 – 21.85	3975,514	-2,69	34%	0,41
	4121,498	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			4121,572	-17,86	36%	
	4267,556	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			4267,630	-17,22	30%	

Još jedna razlika između glikanskog profila staničnih linija i plazme je postojanje tzv. paucimanoznih struktura. Naziv je to za glikane koji sadrže do 4 manoze vezane na 2 N-acetilglukozamina, a najkompleksniji im je pripadnik strukturne formule $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$. Glikanski pikovi GP1, GP3, GP6 i GP7 HepG2 stanične linije, odnosno pikovi GP1, GP3, GP5 i GP6 stanične linije 1.1B4 sadrže paucimanozne strukture, što je u skladu s prethodno objavljenim radovima. To su krnje strukture koje su prošle proces skraćivanja glikanske jezgre u Golgiju, ali još nisu došle do terminalne glikozilacije pa nisu nadograđene šećernim podjedinicama. Te su strukture zapravo još u procesu sinteze te služe kao prekursor za daljnja nadograđivanja kojima nastaju kompleksnije strukture. Kako se glikoproteini izlučuju iz stanice tek nakon uspješnog završetka biosinteze glikana, jasno je da u plazmi ne nalazimo takve krnje glikanske strukture.



Slika 13. Primjer N-glikanskog profila plazme

Tablica 6. Glikanski pikovi sa asigniranim strukturama uz odgovarajuće retencijsko vrijeme, eksperimentalno određenu i teorijsku masu te njihovo odstupanje, udio glikana u piku kao i relativni udio pika u ukupnom uzorku za staničnu liniju 1.1B4

	Izmjerena masa/Da	Strukturna formula	Predložena struktura	Retencijsko vrijeme/min	Teorijska masa/Da	Odstupanje mase/ppm	Udio glikana u piku	Relativni udio pika/%
GP1	968,449	(Hex)2 (HexNAc)2		2,85	968,456	-6,92	100%	0,37
GP2	1114,502	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1		3,45	1114,514	-10,41	100%	0,96
GP3	1130,497	(Hex)3 (HexNAc)2		4,25	1130,509	-10,26	100%	1,60
GP4	1276,554	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1		4,9	1276,567	-9,79	100%	5,08
GP5	1210,490	(Hex)3 (HexNAc)2 (Sulph)1		5,55	1210,465	20,32	60%	0,49
	1292,555	(Hex)4 (HexNAc)2			1292,561	-4,95	40%	
GP6	1292,555	(Hex)4 (HexNAc)2		5,85	1292,561	-4,95	23%	0,57
	1479,631	(HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2			1479,646	-10,00	77%	
GP7	1438,591	(Hex)4 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1		6,35	1438,619	-19,67	100%	0,18
GP8	1682,703	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		6,75	1682,725	-13,19	74%	0,97
	1372,547	(Hex)4 (HexNAc)2 (Sulph)1			1372,518	20,98	26%	
GP9	1454,608	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2		7,45	1454,614	-4,26	100%	2,38
GP10	1885,781	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,05	1885,805	-12,51	100%	0,16
GP11	1600,655	(Hex)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,3	1600,672	-10,68	38%	0,89
	1657,677	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			1657,694	-10,01	42%	
	1786,723	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			1786,736	-7,39	20%	
GP12	1844,751	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,65	1844,778	-14,64	48%	0,22
	1932,769	(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			1932,794	-12,99	52%	
GP13	1932,769	(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		8,85	1932,794	-12,99	55%	0,19
	2088,865	(HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2088,884	-9,10	45%	
GP14	1616,661	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2		9,2	1616,667	-3,71	100%	8,61
GP15	1616,661	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2		9,5	1616,667	-3,71	24%	0,89
	1860,747	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			1860,773	-13,92	76%	

GP16	1948,761	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		9,8	1948,789	-14,37	100%	0,18
GP17	1803,725	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		9,9	1803,752	-14,69	36%	0,26
	1990,815	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2			1990,836	-10,50	37%	
	2135,847	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2135,874	-12,41	27%	
GP18	2006,823	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		10,2	2006,831	-3,94	100%	3,35
GP19	2094,821	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		10,55	2094,847	-12,36	41%	0,37
	2151,853	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2151,868	-7,16	59%	
GP20	2151,853	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		10,7	2151,868	-7,16	100%	0,84
GP21	1778,695	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2		11,05	1778,720	-14,00	100%	6,37
GP22	1778,695	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2		11,3	1778,720	-14,00	46%	0,84
	2297,913	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2297,926	-5,79	54%	
GP23	2297,913	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		11,5	2297,926	-5,79	100%	3,48
GP24	2151,853	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		11,75	2151,868	-7,16	100%	0,55
GP25	2225,871	(Hex)3 (HexNAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		11,95	2225,905	-15,32	49%	0,89
	2442,935	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2442,964	-11,79	51%	
GP26	2297,913	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		12,3	2297,926	-5,79	100%	1,58
GP27	1940,757	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2		12,7	1940,773	-8,09	58%	12,90
	2371,943	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2371,963	-8,47	15%	
	2442,935	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2442,964	-11,79	9%	
	2589,001	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2589,022	-8,00	19%	
GP28	1940,757	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2		13,05	1940,773	-8,09	64%	1,76
	2442,935	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2442,964	-11,79	15%	
	2516,985	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2517,001	-6,20	31%	
GP29	2589,001	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		13,4	2589,022	-8,00	100%	1,16
GP30	2663,017	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		13,6	2663,059	-15,58	100%	3,34
GP31	2102,797	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2		14,05	2102,826	-13,55	100%	9,03

GP32	2102,797	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2		14,3	2102,826	-13,55	76%	1,02
	2663,017	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2			2663,059	-15,58	24%	
GP33	2808,059	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		14,7	2808,096	-13,18	21%	5,72
	2954,127	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2954,154	-9,11	79%	
GP34	2737,075	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2		15,1	2737,095	-7,38	64%	1,16
	2808,059	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2808,096	-13,18	20%	
	2954,127	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2954,154	-9,11	16%	
GP35	2264,861	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2		15,3	2264,878	-7,64	25%	2,10
	2954,127	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			2954,154	-9,11	75%	
GP36	2808,059	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		15,5	2808,096	-13,18	100%	0,42
GP37	3245,210	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		15,7	3245,249	-12,11	100%	3,67
GP38	3099,155	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		15,9	3099,191	-11,74	100%	2,00
GP39	3245,210	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		16,35	3245,249	-12,11	100%	0,53
GP40	3099,155	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		16,6	3099,191	-11,74	60%	2,47
	3319,238	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			3319,286	-14,49	40%	
GP41	3319,238	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		17,1	3319,286	-14,49	100%	1,16
GP42	3610,322	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		17,5	3610,382	-16,48	100%	1,83
GP43	3393,263	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2		17,75	3393,323	-17,65	54%	1,64
	3610,322	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2			3610,382	-16,48	46%	
GP44	3901,439	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2		18,4	3901,477	-9,71	55%	0,70
	3684,386	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2			3684,418	-8,77	45%	
GP45	3975,458	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2		18.8 – 19.7	3975,514	-14,01	100%	0,48
GP46	4049,495	(Hex)6 (HexNAc)6 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2		19.7 - 20.35	4049,551	-13,71	100%	0,28

5. ZAKLJUČAK

U ovom su radu analizirani N-glikani staničnih linija HepG2 i 1.1B4 HILIC-UPLC-FLR-MS/MS metodom. Utvrđena su 47 glikanska pika za staničnu liniju HepG2, odnosno njih 46 za liniju 1.1B4. Najintenzivniji pikovi sadržavali su oligomanozni tip glikana, dok je većina struktura pripadala kompleksnom tipu. Glikanski profili staničnih linija uvelike su se preklapali, uz nekoliko svojstvenih struktura za svaku liniju. Otkrivena je i prisutnost paucimanozних struktura, po tri u obje stanične linije. Dobiveni glikanski profili razlikuju se od onih plazmatskih upravo po prisutnosti paucimanozних struktura, kao i po velikom udjelu oligomanoznog tipa N-vezanih glikana.

Zbog činjenice da se stanične linije učestalo koriste kao eksperimentalni model u biomedicinskim istraživanjima važno je detaljno okarakterizirati njihov glikanski profil. Upravo usporedbom glikanskih struktura staničnih linija s onima primarnog tkiva ili plazme može se utvrditi stupanj korelacije i uspješnost korištenog modela. Iz tog se razloga predlažu daljnja istraživanja koja bi utvrdila razlike u glikozilaciji između staničnih linija i izravno usporedila glikanske profile dobivene *in vivo* i *in vitro*.

6. LITERATURA

- Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833, 2430-2437.
- Agard NJ, Bertozzi CR. Chemical approaches to perturb, profile, and perceive glycans. *Acc Chem Res*, 2009, 42, 788-97.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISSPROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473, 4-8.
- Baum LG, Cobb BA. The direct and indirect effects of glycans on immune function. *Glycobiology*, 2017, 27, 619-624.
- Becker JS, Jakubowski N. The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences. *Chem Soc Rev*, 2009, 38, 1969-83.
- Bečeheli I. Povezanost metilacije gena HNF1A i glikozilacije proteina u adenokarcinomu gušterače i dijabetesu. Doktorski rad, 2018.
- Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402, 231–247.
- Chik JH, Zhou J, Moh ES, Christopherson R, Clarke SJ, Molloy MP, Packer NH. Comprehensive glycomics comparison between colon cancer cell cultures and tumours: implications for biomarker studies. *J Proteomics*, 2014, 108, 146-62.
- Cooper G, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup, peto izdanje. Medicinska naklada Zagreb, 2010, str. 33-36, 335-337, 397-398, 410-411.
- Dayeh VR, Bols NC, Tanneberger K, Schirmer K, Lee LE. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants: an update following OECD's fish toxicity testing framework No. 171. *Curr Protoc Toxicol*, 2013, 1, 43-84.
- Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol*, 2015, 1250, 77-93.
- Donato MT, Hallifax D, Picazo L, Castell JV, Houston JB, Gomez-Lechón MJ, Lahoz A. Metabolite formation kinetics and intrinsic clearance of phenacetin, tolbutamide, alprazolam, and midazolam in adenoviral cytochrome P450-transfected HepG2 cells and comparison with hepatocytes and in vivo. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38, 1449-55.
- Ens W, Standing KG. Hybrid quadrupole/time-of-flight mass spectrometers for analysis of biomolecules. *Methods Enzymol*, 2005, 402, 49-78.

Ettxebarria J, Reichardt NC. Methods for the absolute quantification of N-glycan biomarkers. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860, 1676-87.

Go EP, Liao HX, Alam SM, Hua D, Haynes BF, Desaire H. Characterization of host-cell line specific glycosylation profiles of early transmitted/founder HIV-1 gp120 envelope proteins. *J Proteome Res*, 2013, 12, 1223-34.

Goh JB, Ng SK. Impact of host cell line choice on glycan profile. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38, 851-867.

Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins — Implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820, 1318-26.

Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redzic I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*, 2009, 19, 1547-53.

Han L, Costello CE. Mass Spectrometry of Glycans. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, 78, 710-720.

Hart GW, Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell*, 2010, 143:672-6.

Harvey DJ. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879, 1196-225.

Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 2001, 291, 2364-9.

Holst S, Deuss AJ, van Pelt GW, van Vliet SJ, Garcia-Vallejo JJ, Koeleman CA, Deelder AM, Mesker WE, Tollenaar RA, Rombouts Y, Wuhrer M. N-glycosylation Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Association of Fucosylation with Differentiation and Caudal Type Homeobox 1 (CDX1)/Villin mRNA Expression. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15, 124-40.

Holst S, Wilding J, Koprowska K, Rombouts Y, Wuhrer M. N-Glycomic and Transcriptomic Changes Associated with CDX1 mRNA Expression in Colorectal Cancer Cell Lines. *Cells*, 2019, 8, 273.

Hudak JE, Bertozzi CR. Glycotherapy: new advances inspire a reemergence of glycans in medicine. *Chem Biol*, 2014, 21, 16-37.

Keser T. Influence of genetic and environmental factors on N-glycosylation of immunoglobulin g and total plasma proteins determined by twin study. Doktorski rad, 2016.

Knezevic A, Gornik O, Polasek O, Pucic M, Redzic , Novokmet M, Rudd PM, Wright AF, Campbell H, Rudan I, Lauc G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*, 2010, 20, 959-69.

Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1860, 1574-1582.

Lauc, G, Vojta A, Zoldoš V. Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840, 65-70.

Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation—an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst*, 2010, 6, 2373-9.

Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klaric L, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wilson JF, Lieve 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 Gen Subj*, 2017, 1861:2240-2249.

Leymarie N, Zaia J. Effective use of mass spectrometry for glycan and glycopeptide structural analysis. *Anal Chem*, 2012, 84, 3040-8.

Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72, 643-91.

Marek KW, Vijay IK, Marth JD. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*, 1999, 9, 1263-71.

McCluskey JT, Hamid M, Guo-Parke H, McClenaghan NH, Gomis R, Flatt PR. Development and functional characterization of insulin-releasing human pancreatic beta cell lines produced by electrofusion. *J Biol Chem*, 2011, 286, 21982-92.

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

Nigović B. Predavanja iz analitike lijekova. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018.

Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126, 855-67.

Rakus JF, Mahal LK. New technologies for glycomic analysis: toward a systematic understanding of the glycome. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2011, 4, 367-92.

Reiding KR, Hipgrave Ederveen AL, Rombouts Y, Wuhrer M. Murine Plasma N-Glycosylation Traits Associated with Sex and Strain. *J Proteome Res*, 2016, 15, 3489-3499.

Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 3457-81.

Springer SA, Gagneux P. Glycomics: Revealing the Dynamic Ecology and Evolution of Sugar Molecules. *J Proteomics*, 2016, 135, 90-100.

Tarentino AL, Plummer TH Jr. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol*, 1994, 230, 44-57.

Termini JM, Silver ZA, Bryony C, Antonopoulos A, Haslam SM, Dell A, Desrosiers RC. HEK293T cell lines defective for O-linked glycosylation. *PLoS One*, 2017, 12, e0179949.

Thobhani S, Yuen CT, Bailey MJ, Jones C. Identification and quantification of N-linked oligosaccharides released from glycoproteins: an inter-laboratory study. *Glycobiology*, 2009, 19, 201-11.

Varki A. Evolutionary Forces Shaping the Golgi Glycosylation Machinery: Why Cell Surface Glycans Are Universal to Living Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3: a005462.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. Essentials of Glycobiology, 2nd edition. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2009. At <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH. Essentials of Glycobiology, 3rd edition. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2015-2017. At <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/>

Vasu S, McClenaghan NH, McCluskey JT, Flatt PR. Cellular responses of novel human pancreatic β -cell line, 1.1B4 to hyperglycemia. *Islets*, 2013, 5, 170-7.

Watson, David G. Pharmaceutical analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, Elsevier, Oxford, 2012, str. 204-248.

Wilding JL, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res*, 2014, 74, 2377-84.

Wilm M. Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10, M111.009407

Wuhrer M, de Boer AR, Deelder AM. Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2009, 28, 192-206.

7. SAŽETAK

Glikozilacija je najčešća i najkompleksnija modifikacija proteina te kao takva ima presudnu ulogu na konačna svojstva i funkcije glikoproteina. Budući da se sinteza glikana ne odvija po predlošku već je izrazito osjetljiva na okolišne uvjete i patofiziološke procese, dijagnostički potencijal glikana sve se više istražuje. Zbog velike potrebe za jednostavnošću i lakoćom manipuliranja, kao modeli u biomedicinskim istraživanjima naširoko se koriste stanične linije. Detaljna karakterizacija njihovog glikanskog profila izrazito je važna za utvrđivanje uspješnosti korištenog modela u glikomskim istraživanjima.

U ovom su radu analizirani N-glikani staničnih linija HepG2 i 1.1B4 HILIC-UPLC-FLR-MS/MS metodom. Rezultati rada prikazani su asigniranim FLR kromatogramima i tablicama sa strukturnim prikazom glikanskih pikova. U staničnoj liniji HepG2 utvrđena su 47 glikanska pika, odnosno njih 46 u liniji 1.1B4. Glikanski profili staničnih linija uvelike su se preklapali, uz nekoliko karakterističnih struktura za svaku liniju. Iako je većina struktura pripadala kompleksnom tipu, najintenzivniji pikovi sadržavali su oligomanozni tip glikana. Dobiveni glikanski profili razlikuju se od onih plazmatskih upravo po velikom udjelu oligomanoznog tipa N-vezanih glikana, kao i po prisutnosti paucimanoznih struktura.

8. SUMMARY

Glycosylation is the most common and complex modification of proteins and as such has a key role in shaping the final properties and functions of glycoproteins. Since glycan synthesis is not template-driven, but is instead strongly affected by environmental factors and pathophysiological processes, the diagnostic potential of glycans is being thoroughly researched. Due to the strong need for simplicity and ease of manipulation, cell lines are widely used as models in biomedical research. Detailed characterization of their glycane profile is extremely important for determining the success of the model used in glycome research.

This thesis analyzed N-glycans of HepG2 and 1.1B4 cell lines using HILIC-UPLC-FLR-MS/MS method. The results are presented as assigned FLR chromatograms and tables with the structural representation of the glycan peaks. In the HepG2 cell line there were 47 glycane peaks determined, while in the 1.1B4 line there were 46 peaks respectively. The glycan profiles of the cell lines vastly overlapped, with several characteristic structures for each line. Although most structures belonged to a complex type, the most intense peaks contained a high-mannose type of glycans. The obtained glycane profiles differ from those of the plasma precisely due to the large proportion of high-mannose type of N-linked glycans, as well as the presence of the paucimannose structures.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

STRUKTURNA ANALIZA N-GLIKANSKOG PROFILA STANIČNIH LINIJA HepG2 I 1.1B4 HILIC-UPLC-FLR-MS/MS METODOM

Dinko Šoić

SAŽETAK

Glikozilacija je najčešća i najkompleksnija modifikacija proteina te kao takva ima presudnu ulogu na konačna svojstva i funkcije glikoproteina. Budući da se sinteza glikana ne odvija po predlošku već je izrazito osjetljiva na okolišne uvjete i patofiziološke procese, dijagnostički potencijal glikana sve se više istražuje. Zbog velike potrebe za jednostavnošću i lakoćom manipuliranja, kao modeli u biomedicinskim istraživanjima naširoko se koriste stanične linije. Detaljna karakterizacija njihovog glikanskog profila izrazito je važna za utvrđivanje uspješnosti korištenog modela u glikomskim istraživanjima.

U ovom su radu analizirani N-glikani staničnih linija HepG2 i 1.1B4 HILIC-UPLC-FLR-MS/MS metodom. Rezultati rada prikazani su asigniranim FLR kromatogramima i tablicama sa strukturnim prikazom glikanskih pikova. U staničnoj liniji HepG2 utvrđena su 47 glikanska pika, odnosno njih 46 u liniji 1.1B4. Glikanski profili staničnih linija uvelike su se preklapali, uz nekoliko karakterističnih struktura za svaku liniju. Iako je većina struktura pripadala kompleksnom tipu, najintenzivniji pikovi sadržavali su oligomanozni tip glikana. Dobiveni glikanski profili razlikuju se od onih plazmatskih upravo po velikom udjelu oligomanoznog tipa N-vezanih glikana, kao i po prisutnosti paucimanoznih struktura.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 13 grafičkih prikaza, 7 tablica i 52 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikani, glikozilacija, stanične linije, HILIC-UPLC, MS/MS

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, viši asistent – poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Tamara Pavić, poslijedoktorand na projektu Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Biljana Nigović, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

STRUCTURAL ANALYSIS OF N-GLYCANE PROFILE IN HepG2 AND 1.1B4 CELL LINES USING HILIC-UPLC-FLR-MS/MS METHOD

Dinko Šoić

SUMMARY

Glycosylation is the most common and complex modification of proteins and as such has a key role in shaping the final properties and functions of glycoproteins. Since glycan synthesis is not template-driven, but is instead strongly affected by environmental factors and pathophysiological processes, the diagnostic potential of glycans is being thoroughly researched. Due to the strong need for simplicity and ease of manipulation, cell lines are widely used as models in biomedical research. Detailed characterization of their glycane profile is extremely important for determining the success of the model used in glycome research.

This thesis analyzed N-glycans of HepG2 and 1.1B4 cell lines using HILIC-UPLC-FLR-MS/MS method. The results are presented as assigned FLR chromatograms and tables with the structural representation of the glycan peaks. In the HepG2 cell line there were 47 glycane peaks determined, while in the 1.1B4 line there were 46 peaks respectively. The glycan profiles of the cell lines vastly overlapped, with several characteristic structures for each line. Although most structures belonged to a complex type, the most intense peaks contained a high-mannose type of glycans. The obtained glycane profiles differ from those of the plasma precisely due to the large proportion of high-mannose type of N-linked glycans, as well as the presence of the paucimannose structures. □

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

Thesis includes: 48 pages, 13 figures, 7 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycans, glycosylation, cell lines, HILIC-UPLC, MS/MS

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

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.** *Postdoctoral researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tamara Pavić, Ph.D. *Postdoctoral researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2019.