

# Usporedba efikasnosti obilježavanja N-glikana imunoglobulina G 2-aminobenzamidom, prokainamidom i RapiFluor-MS-om

---

Brkušić, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:460018>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



**Mirna Brkušić**

**Usporedba efikasnosti obilježavanja N-glikana  
imunoglobulina G 2-aminobenzamidom,  
prokainamidom i RapiFluor-MS-om**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je 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 izv. prof. dr. sc. Olge Gornik.

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Olgi Gornik na ukazanom povjerenju i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Tomi Keseru na pomoći prilikom izrade praktičnog dijela rada, kao i na ugodnoj radnoj atmosferi te na strpljenju i svim savjetima bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i poticanju tijekom studiranja.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. GLIKOZILACIJA .....	1
1.2. GLIKANI .....	2
1.2.1. N-glikani .....	2
1.3. IMUNOGLOBULINI .....	4
1.3.1. IgG .....	4
1.4. ANALIZA GLIKANA .....	6
1.4.1. HILIC-UPLC .....	8
1.4.2. ESI-QToF-MS .....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. UZORAK .....	13
3.2. MATERIJALI .....	13
3.2.1. Anorganske kemikalije .....	13
3.2.2. Organske kemikalije .....	14
3.2.3. Biološke kemikalije .....	14
3.2.4. Otopine i puferi .....	15
3.2.5. Laboratorijska oprema i pribor .....	16
3.3. PROTOKOL PRIPREME UZORKA .....	16
3.3.1. Protokol za označavanje N-glikana 2-aminobenzamidom i prokainamidom .....	17
3.3.1.1. Denaturacija proteina .....	17
3.3.1.2. Deglikozilacija .....	17
3.3.1.3. Priprema otopine 2-AB i ProA za označavanje .....	17
3.3.1.4. Označavanje N-glikana .....	18
3.3.1.5. Prekondicioniranje GHP pločica .....	18
3.3.1.6. Nanošenje i pročišćavanje označenih N-glikana .....	18

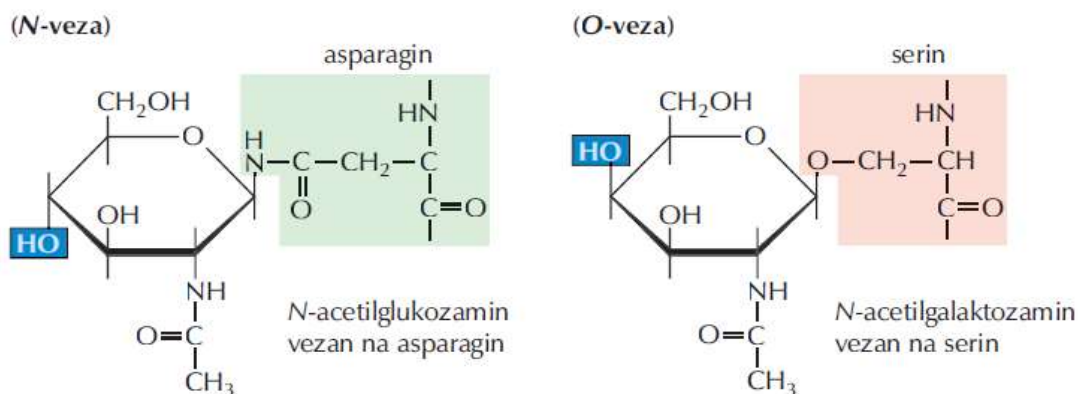
3.3.1.7. Eluiranje N-glikana.....	19
3.3.2. Protokol za označavanje N-glikana RapiFluor-MS-om .....	19
3.3.2.1. Ubrzana deglikozilacija .....	20
3.3.2.2. Označavanje N-glikana .....	20
3.3.2.3. HILIC SPE pročišćavanje označenih N-glikana .....	21
3.4. ANALIZA UZORAKA.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	22
5. ZAKLJUČAK.....	33
6. LITERATURA .....	34
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	36
7.1. SAŽETAK .....	36
7.2. SUMMARY.....	37

## 1. UVOD

### 1.1. GLIKOZILACIJA

Glikozilacija je složena kotranslacijska i postranslacijska reakcija modifikacije posredovana enzimima u kojoj se šećerne strukture kovalentno vežu na proteine i lipide. Započinje u endoplazmatskom retikulumu još za vrijeme trajanja translacije, a dovršava se u Golgijevom aparatu. Proteini na koje je vezan ugljikohidratni lanac su nazvani glikoproteini i uglavnom se izlučuju ili su smješteni na staničnoj površini, premda su i mnogi citosolni i jezgri proteini glikozilirani.

Ovisno o mjestu vezanja bočnog ugljikohidratnog lanca na protein razlikujemo O- i N- glikozilaciju. (Cooper i Hausman, 2004) Kod N-vezanih glikoproteina, ugljikohidrat je vezan na dušikov atom bočnog ogranka asparagina unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina, dok je kod O-vezanih glikoproteina mjesto vezanja kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina. (Ohtsubo i Marth, 2006) Šećeri izravno vezani na te položaje su N-acetilglukozamin kod N-vezanih i N-acetilgalaktozamin kod O-vezanih glikoproteina.



**Slika 1.** Vrste glikoproteina: N-vezani i O-vezani (preuzeto i modificirano iz Cooper i Hausman, 2004)

Glikani imaju ulogu u mnogim važnim biološkim procesima kao što su npr. smatanje novosintetiziranih proteina u endoplazmatskom retikulumu i usmjeravanje istih u određene stanične odjeljke, međustanična komunikacija, prepoznavanje vlastitih i stranih stanica te patogenih mikroorganizama i aktivacija receptora. (Cooper i Hausman, 2004) Važnost glikozilacije se očituje i u činjenici da su većina proteina višestaničnih organizama u formi

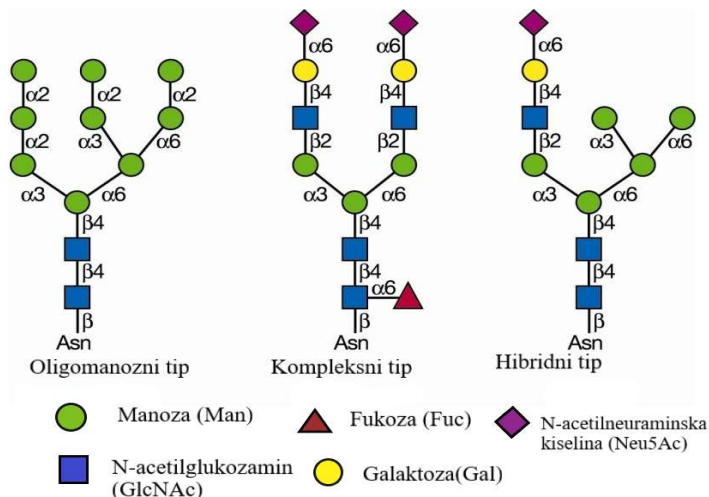
glikokonjugata. Također, mnogo stanica našeg organizma mogu funkcionirati bez jezgre, ali do danas nije poznata živa stanica koja može funkcionirati bez glikana na svojoj površini. (Lauc i sur.,2014)

## **1.2. GLIKANI**

U nastanku glikokonjugata sudjeluju dvije vrste enzima: glikozil-transferaza i glikozidaza, pri čemu prvi enzim stvara, a drugi hidrolizira glikozidnu vezu. (Ohtsubo i Marth, 2006) Monosaharidi koji se najčešće javljaju kao dio glikanske strukture su fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glu), manozna (Man), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), sialinska kiselina (Sia) i ksiloza (Xyl). (Lauc i sur, 2014) Treba naglasiti da za razliku od aminokiselina i nukleotida kod kojih tri različita monomera mogu tvoriti 6 različitih trimera, tri različite heksoze mogu tvoriti između 1056 i 27648 različitih trisaharida. Kako broj monomera raste, razlike u kompleksnosti strukture postaju sve vidljivije. S obzirom na toliku raznolikost mogućih glikanskih struktura koja je uvjetovana slijedom monosaharida, položajem i anomernom konfiguracijom glikozidne veze te brojem i položajem mjesta grananja, utjecaj na raznolikost ponašanja i funkcija makromolekula na koje su glikani vezani je ogroman. (Varki i sur.,2009)

### **1.2.1. N-glikani**

N-glikani su kovalentno vezani na proteine N-glikozidnom vezom preko asparaginskih ostataka, a najčešća veza je ona N-acetilglukozamina na asparagin. Svi N-glikani imaju zajedničku šećernu jezgru koja se sastoji od 2 N-acetilglukozamina i 3 manoze na koju mogu biti vezani različiti ogranci. Prema glikanskim ostacima koji mogu biti vezani na jezgru razlikujemo tri osnovna tipa N-glikana: oligomanozni u kojem je na jezgru vezano samo manji broj manoznih jedinica, kompleksni koji sadrže jedan ili više ogranka s po barem jednom N-acetilglukozaminskom i jednom galaktoznom jedinicom koje su vezane na jezgru te hibridni tip koji je kombinacija prethodna dva. (Varki i sur.,2009)

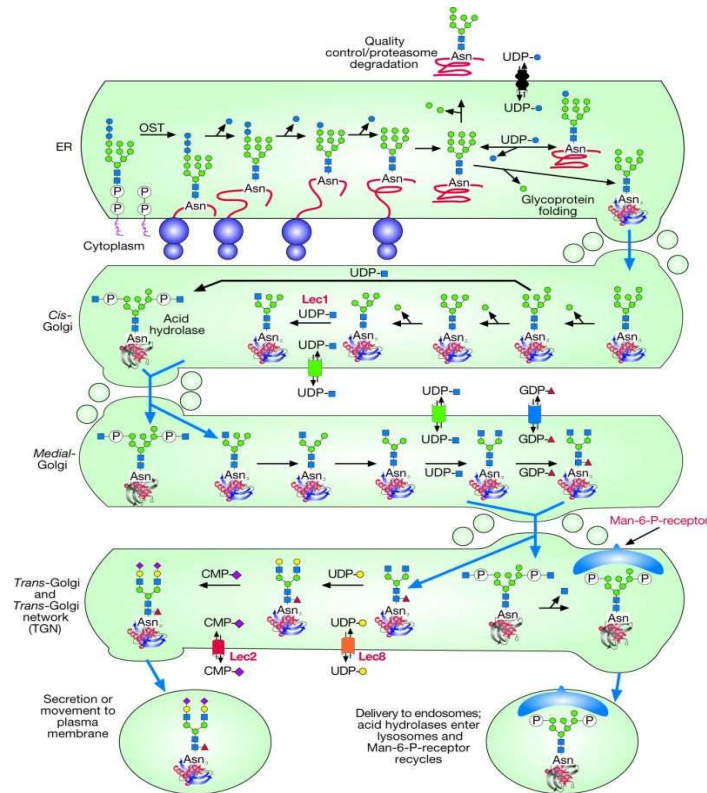


**Slika 2.** Osnovni tipovi N-glikana (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2009)

Biosinteza svih eukariotskih N-glikana započinje na citoplazmatskoj strani membrane hrapavog endoplazmatskog retikuluma s transferom N-acetilglukozamina (GlcNAc) s aktiviranog donora UDP-GlcNAc na lipidni nosač dolikol-fosfat pri čemu nastaje dolikol-pirofosfat-N-acetilglukozamin, a zatim kasnije i  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$ . Slijedi prebacivanje glikana na luminalnu stranu membrane. Na citoplazmatskoj strani donori monosaharida su nukleotidni šećeri, a na luminalnoj strani to su šećeri aktivirani dolikol-fosfatom. Glikan se nadograđuje do  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  i sad je spreman za transfer pomoću oligosaharid-transferaze (OST) na Asn-X-Ser/Thr sekvencu proteina koji se sintetizira i translocira kroz endoplazmatski retikulum.

Tijekom daljnje dorade osnovni se N-vezani oligosaharid modificira i u endoplazmatskom retikulumu, gdje mu se uklanjaju tri glukoza ostatka i jedna manosa, i u Golgijevom aparatu gdje poprima svoj krajnji oblik uklanjanjem i dodavanjem ugljikohidratnih ostataka. Odlazak glikoproteina u Golgijev aparat je direktno povezano sa njegovim smatanjem koje je potpomognuto lektinima kalneksinom i kalretikulinom te oni, prepoznavanjem specifičnih dijelova strukture, određuju hoće li se glikoprotein razgraditi ili pak otići u Golgijev aparat. (Varki i sur.,2009) Dorađivanje se događa ovisno o enzimima koji su prisutni u različitim stanicama i o dostupnosti oligosaharida glikozidazama i glikozil-transferazama, enzimima koji kataliziraju ove modifikacije. (Cooper i Hausman, 2004)





**Slika 3.** Sinteza N-glikana (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2009)

### 1.3. IMUNOGLOBULINI

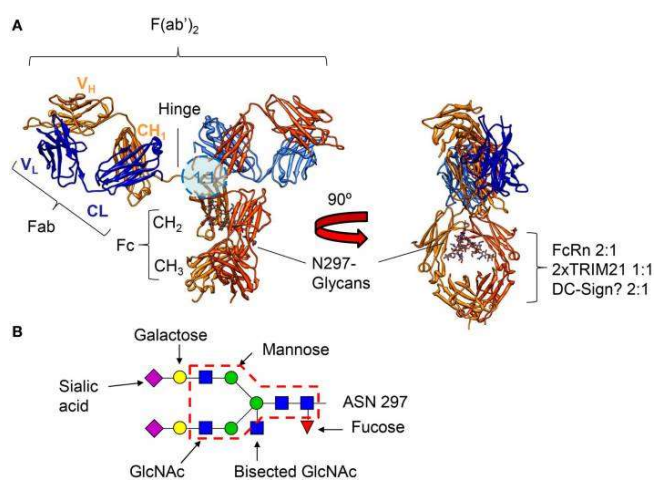
Imunoglobulini, poznati i pod nazivom protutijela, su glikoproteini prisutni u tijelu kao receptori vezani za membranu na površini B-stanica ili kao topljive molekule proizvedene od strane plazma stanica. Kontakt između receptora na B-stanici (BCR) i antigena kojeg prepoznaje rezultira aktivacijom i diferencijacijom B-stanica u plazma stanice koje onda stvaraju veliku količinu protutijela iste specifičnosti vezanja kao i originalni BCR. U osnovnoj strukturi svakog imunoglobulina su dva laka (L) i dva teška (H) lanca međusobno povezana disulfidnim vezama i brojnim nekovalentnim interakcijama. Imunoglobuline dijelimo u pet klasa (IgM, IgG, IgD, IgA i IgE) i podklase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 te IgA1 i IgA2) koje se međusobno razlikuju po veličini, naboju, aminokiselinskom slijedu konstantne regije teškog lanca i sadržaju glikana. (Male i sur., 2009)

#### 1.3.1. IgG

Imunoglobulin G je jedan od najzastupljenijih proteina u ljudskom serumu, čineći oko 10-20 % plazmatskih proteina te je ujedno i najzastupljeniji od svih pet izotipova

imunoglobulina. IgG se dalje može podijeliti u 4 podklase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) koja se razlikuju u strukturi i funkciji. Iako im je sličnost u aminokiselinskom slijedu u nekim slučajevima preko 90 %, svaka podklasa ima jedinstven profil vezanja antigena, formacije imunih kompleksa, aktivacije komplementa i efektorskih stanica, placentarnog prijenosa te poluvijek života. (Vidarsson i sur., 2014)

Kao i ostali izotipovi, IgG se sastoji od 4 polipeptidna lanca od kojih su 2 identična  $\gamma$  teška lanca od 50 kDa („heavy chains“, H) i 2 identična  $\kappa$  ili  $\lambda$  laka („light chains“, L) lanca od 25 kDa. Svaki teški lanac se sastoji od N-terminalne varijabilne domene (VH) i tri konstantne domene (CH1, CH2, CH3) sa zglobnom regijom („hinge region“) između CH1 i CH2. Na sličan način su građeni i laki lanci, s tim da oni uz N-terminalnu varijabilnu domenu (VL) sadrže samo jednu konstantnu domenu (CL). Ova 4 lanca tvore 3 funkcionalne regije; dvije Fab („fragment antigen binding“) regije i jednu Fc („fragment crystalline“) regiju povezane zglobnom regijom. Fab regije čine laki lanci povezani s VH i CH1 domenama, od kojih se samo varijabilne domene vežu za antigen pa kažemo da su one antigen-specifične. Preostale konstantne regije teškog lanca (CH2 i CH3) čine Fc regiju koja se veže na Fc receptore na stanicama imunskog sustava. Dva heterodimera (HL), koja se sastoje od teškog i lakog lanca, se preko disulfidnih veza u zglobnoj regiji i nekovalentnih interakcija između CH3 domena spajaju u jednu molekulu protutijela ( $H_2L_2$ ). (Vidarsson i sur., 2014)



**Slika 4. A** - Kristalna struktura humanog IgG1 iz dva različita kuta (Mjesto vezanja Fc $\gamma$ R označeno je svijetlo plavim krugom) **B** - Prikaz moguće strukture N-vezanog glikana. (Slika modificirana i preuzeta iz Vidarsson i sur., 2014)

Jako konzervirano glikozilacijsko mjesto na svakom imunoglobulinu G je na poziciji N297 koja se nalazi na sučelju CH2 i CH3 domene koje formiraju Fc regiju. Srž vezanog glikana obuhvaća monosaharide manozu i N-acetilglukozamin, dok kao dodatke mogu sadržavati sržnu fukožu, račvajući N-acetilglukozamin, galaktozu i sijalinsku kiselinu. Ovaj je glikan odgovoran za male, ali značajne promjene kvarterne strukture Fc regije koje čine mjesto vezanja Fc $\gamma$ R dostupnijim. Također, ovi glikani direktno sudjeluju u vezanju Fc $\gamma$ R te mogu promijeniti tu interakciju visoko specifičnim modifikacijama reguliranim tijekom specifičnog imunskog odgovora. (Vidarsson i sur., 2014) Dodatak fukoze na prvi N-acetilglukozamin u srži glikana modificira konformaciju Fc regije na način da drastično smanjuje njenu mogućnost vezanja za Fc $\gamma$ RIIIa. (Shields i sur., 2002) Fc $\gamma$ RIIIa je aktivirajući Fc receptor eksprimiran prvenstveno na NK stanicama te vezanjem za njega, IgG započinje aktivaciju citotoksičnosti ovisne o protutijelu (ADCC) koja rezultira uništenjem ciljanih stanica. U prosjeku, 95% imunoglobulina G ima vezanu sržnu fukožu, što predstavlja „sigurnosni prekidač“ i sprječava pretjeranu aktivaciju citotoksičnosti ovisne o protutijelu. Nedostatak regulacije ovog procesa može dovesti do autoimunih bolesti uzrokovane pretjeranom aktivacijom ili do karcinoma uzrokovanog nedovoljnom aktivacijom ADCC-a. (Lauc i sur., 2014) Iako se N297 glikozilacijsko mjesto često smatra jedinim glikozilacijskim mjestom imunoglobulina G, varijabilne regije (V) otprilike 10-15 % svih protutijela su glikozilirane. (Vidarsson i sur., 2014)

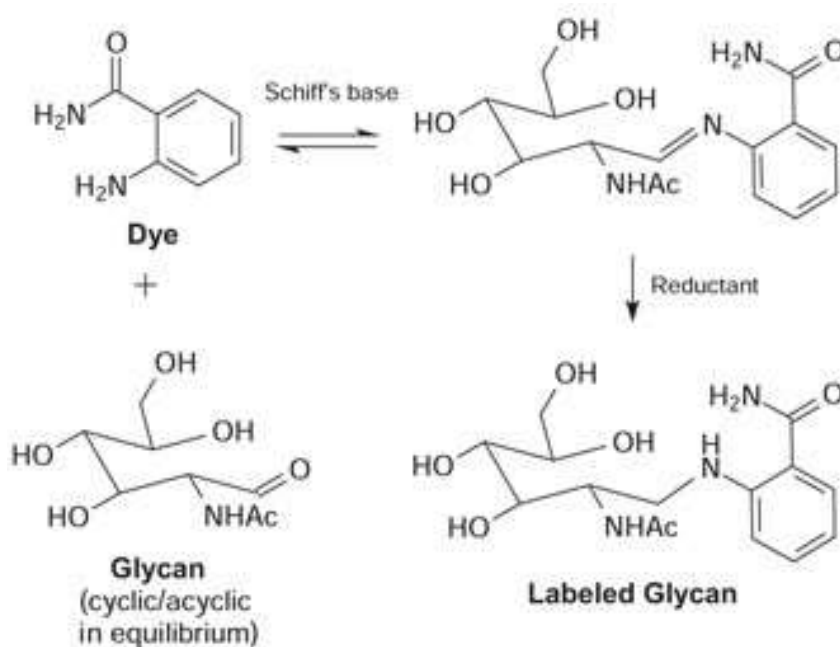
#### **1.4. ANALIZA GLIKANA**

Glikani mogu biti prisutni u različitim strukturnim oblicima na istom proteinu i na istom glikozilacijskom mjestu, što rezultira različitim glikoformama iste molekule. Smatra se da takve promjene odražavaju porijeklo molekule te nam daju informaciju o fiziološkom i biokemijskom stanju organizma. Dakle, najvažnija karakteristika glikoproteina je njihova mikroheterogenost koja se očituje u širokom rasponu razlika poput različitog grananja, gubitka ili dodatka monosaharida na jednom od ogranaka ili pak, različite vrste veze između šećera. (Gornik i Lauc, 2008) Zahvaljujući spoznaji da varijacije u strukturi glikana imaju važnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji brojnih bolesti, analize glikana postaju prioritet današnjih istraživanja. (Huffman i sur., 2014)

Za ovakvu vrstu analize najčešće se koriste metode poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrija masa. (Gornik i Lauc, 2008) Zbog kompleksnosti strukture i male količine analita, često je potrebno kombinirati i modificirati više metoda i

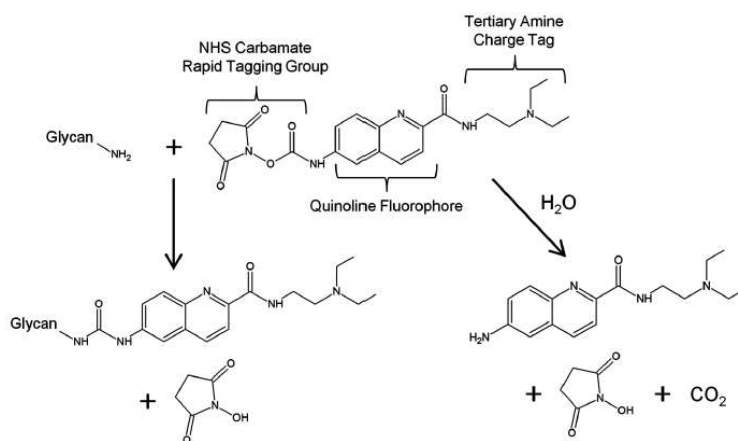
obavljati pretpripremu uzorka koristeći enzime. (Varki i sur., 2009) U slučaju N-vezanih glikana, za odvajanje šećerne strukture od proteina najčešće se koristi enzim PNGaza F, koji je najučinkovitiji enzim za odvajanje gotovo svih N-vezanih oligosaharida. Deaminacijom asparaginskog ostatka u asparaginsku kiselinu, ostavlja oligosaharid odvojen od proteina i netaknut za daljnju analizu. Da bi se postigao kompletan učinak tj. smanjile steričke smetnje i olakšao pristup enzima vezi, preporuča se prethodna denaturacija proteina pomoću natrijevog dodecil sulfata (SDS). Ukoliko denaturacija nije poželjna, moguće je djelovanje enzima i u prirodnim uvjetima, ali pri većoj količini enzima. (www.neb.com)

Kako bi detekcija glikana bila moguća, obilježavaju se fluoroforom ili kromoforom. Jedan od čestih primjera je obilježavanje glikana 2-aminobenzamidom u reakciji reduktivne aminacije. Reakcija se odvija u dva koraka. Fluorescentna boja sadrži primarnu amino skupinu koja u prvom koraku reagira s aldehidnom skupinom glikana dajući imin tj. nestabilnu Schiffovu bazu. U drugom koraku se Schiffova baza reducira reducirajućim agensom te nastaje sekundarni amin. Prednost ovog obilježavanja glikana je stehiometrijski odnos u kojem se jedna molekula boje veže na jednu molekulu glikana. Taj odnos omogućava direktnu kvantifikaciju na temelju intenziteta fluorescencije. (Ruhaak i sur., 2010)



*Slika 5. Reakcija reduktivne aminacije (preuzeto i modificirano sa [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))*

Zbog potrebe za smanjenjem vremena pripreme uzorka i povećanja osjetljivosti detekcije, razvio se novi reagens za označavanje N-glikana – RapiFluor-MS. RapiFluor-MS se sastoji od N-hidroksisukcinimidne karbamatne reaktivne skupine, koja omogućava bržu kemijsku reakciju vezanja za glikan, vrlo efikasnog kinolinskog fluorofora te tercijarnog amina, koji povećava efikasnost elektrosprej ionizacije u pozitivnom modu masene spektrometrije. (Lauber i sur., 2015)



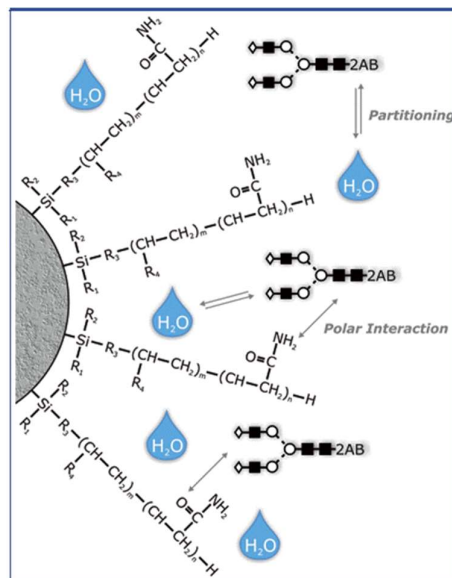
RFMS derivatization of an *N*-glycosylamine. The pathway on the left shows the derivatization of an *N*-glycosylamine, which produces an *N*-glycan with a urea (NH–CO–NH) linked RFMS label. Hydrolysis of RFMS is shown in the pathway on the right.

**Slika 6.** Derivatizacija *N*-glikana RapiFluor-MS-om (preuzeto i modificirano iz Lauber i sur., 2015)

#### 1.4.1. HILIC-UPLC

Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama („hydrophilic interaction ultra performance liquid chromatography“ tj. HILIC-UPLC) je separacijska tehnika koja se može smatrati varijacijom normalno-fazne kromatografije. Stacionarna faza je polarna. Za razliku od kromatografije normalnih faza u kojoj je mobilna faza potpuno nevodena i nepolarna, kod HILIC se upotrebljava organsko otapalo s različitim udjelom hidrofilnog otapala npr. vode. Kromatografija ugljikohidrata na HILIC stacionarnim fazama odvija se mehanizmom razdjeljivanja za razliku od tradicionalne adsorpcijske kromatografije normalnih faza. (Zauner i sur., 2011) Dakle, zadržavanje je uzrokovano razdjeljivanjem polarnih analita između vodom-bogatog sloja koji je adsorbiran iz mobilne na hidrofilnu stacionarnu fazu i mobilne faze bogate organskim otapalom. Također,

pritom su vodikove veze i dipol-dipol interakcije dominantni retencijski mehanizmi. (Darsow i sur., 2010.) Što je analit hidrofilniji, ravnoteža razdvajanja se pomiče prema imobiliziranom vodenom sloju na stacionarnoj fazi te se više analita zadržava. (Buszewski i Noga, 2011)



**Slika 6.** Retencijski mehanizmi u HILIC (modificirano i preuzeto iz Darsow i sur., 2010)

HILIC omogućuje analitu interakciju s izrazito polarnim i hidrofilnim stacionarnim fazama, poput čistih silika čestica ili onih modificiranih s amino, hidroksi ili amidnim skupinama, pri primjeni polarne mobilne faze s visokim udjelom organskog otapala. Često se koristi binarni gradijent mobilne faze koji se sastoji od vodenog dijela i manje polarnog organskog otapala, najčešće acetonitrila, s rastućim vodenim udjelom potičući eluciju hidrofilnijih molekula. Minimalno 3 % vode bi trebalo biti prisutno u mobilnoj fazi kako bi stacionarna faza ostala dovoljno hidratizirana i kako bi rezultati bili što reproducibilniji. (Zauner i sur., 2011) Zbog njihove hlapljivosti i dobre topljivosti u organskim otapalima, preporučuju se puferi amonij acetat ili amonij formijat u svrhu regulacije ionske jakosti i pH mobilne faze. (Buszewski i Noga, 2011) Najčešće, vodena frakcija mobilne faze se postupno povećava do 50% udjela kako bi se eluirali glikani iz HILIC kolone (Zauner i sur., 2011).

Općenito, retencijsko vrijeme glikana ili glikopeptida na HILIC materijalu ovisi o hidrofilnom potencijalu analita na koji utječu strukturalne osobine, poput veličine, naboja, kompozicije, veza te razgranatosti oligosaharida. Unatoč tome, razdvajanje glikanskih jedinica

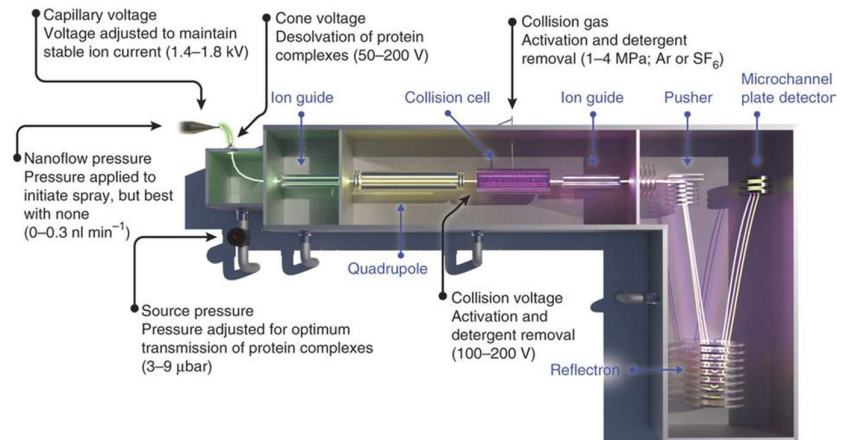
većinom se temelji na broju polarnih skupina, što omogućava uočavanje prilično predvidljivih obrazaca razdvajanja. Napreci u razvijanju tehnika za razdvajanje kompleksnih smjesa glikana ili glikopeptida ključni su za daljnja detaljnija istraživanja individualnih glikanskih struktura pomoću spektrometrije masa. (Zauner i sur., 2011)

#### 1.4.2. ESI-QToF-MS

Spektrometrija masa (MS) je visoko specifična metoda za određivanje ili potvrđivanje identiteta i strukturnu karakterizaciju različitih molekula. Molekule se ioniziraju u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska uzorka u visoki vakuum. Ioni se stvaraju u plinovitoj fazi raznim metodama te se primjenom magnetnog ili električnog polja razdvajaju prema njihovoj masi. Dakle, određuje se molekulska masa ionizirane molekule ili nekog fragmenta molekule nastalog njenim cijepanjem. Kao rezultat dobije se spektar masa koji pokazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta kao funkciju omjera mase i pozitivnog ili negativnog naboja iona („m/z ratio“). Sam uređaj se sastoji od ionizacijske komore, ubrzavajuće pločice, analizatora (vakuum  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  Pa) i detektora. (Watson, 2012; Ahuja i Scypinski, 2010)

Jedan od najčešćih načina ionizacije je ESI tj. elektrosprej ionizacija, a ujedno je i najčešći način povezivanja tekućinske kromatografije i masenog spektrometra. Uzorak iz kromatografske kolone prolazi kroz usku kapilaru čiji se kraj nalazi na visokom električnom potencijalu (1-4kV), a tamo se uzorak rasprši pri atmosferskom tlaku i visokoj temperaturi. Otapalo se uklanja strujom dušika te ioni analita ulaze u vakuum masenog spektrometra. (Watson, 2012) Općenito, učinkovitost ionizacije ESI metode se smanjuje kako raste masa glikana koje analiziramo. (Han i Costello, 2013)

Q-ToF instrument kombinira kvadrupolni analizator masa s analizatorom vremena leta („time of flight“) omogućavajući visoku rezoluciju i točnost analize. Kvadrupolni analizator masa (Q) predstavlja oscilirajuće električno polje u evakuiranom prostoru. Kroz električno polje prolazi samo ion određene m/z koji ima frekvenciju koja rezonira sa frekvencijom polja. Kod analizatora vremena leta (ToF) ioni se ubrzavaju u električnom polju do velikih brzina, a zatim se puste da slobodno putuju u dugoj cijevi (25cm-1,5m). Promatra se vrijeme potrebno da ioni dođu do detektora. Vrijeme korelira s molekulskom masom, odnosno ioni manje mase, ali i ioni većeg naboja, će putovati kraće vrijeme. (Watson, 2012; Ahuja i Scypinski, 2010)



*Slika 7. Q-ToF maseni spektrometar (preuzeto iz Reading i sur., 2013.)*

Karakterizacija glikana zasniva se na informacijama o strukturi dobivenih iz spektra masa. Zbog malih varijacija u strukturi, poput npr. različitih izomera ili razlika zbog kiralnosti, glikani slične ili identične mase mogu imati potpuno različitu biološku funkciju što čini kompletnu stukturu analizu još zahtjevnijom. Potreba za sve naprednijim metodama u analizi glikana služi kao poticaj za daljnja istraživanja na području masene spektrometrije. (Kailemia i sur., 2013)



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikani, kao strukturni dio glikoproteina, od iznimne su važnosti za njihovu funkciju i pravilnu strukturu te se danas sve više i više istražuju, pogotovo zbog njihove umiješanosti u patofiziologiju nekih bolesti kao što je, na primjer, dijabetes. Saznanja o povezanosti glikana i bolesti sve su veća, a time raste i potreba za novim istraživanjima.

Jedna od tehnika u analizi glikana koja se često koristi je tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim reakcijama. S obzirom da sami glikani nisu vidljivi u UV-VIS području, njihova analiza zahtijeva fluorescentno obilježavanje kako bi se mogli detektirati. Zato je njihovo obilježavanje važan dio razvoja metode za analizu glikana. Iz prijašnjih istraživanja dostupni su podaci o obilježavanju N-glikana IgG-a fluorescentnim bojama 2-aminobenzamidom, prokainamidom i RapiFluor-MS-om, a svaka od njih je pokazala različiti intenzitet fluorescencije. Poznato je također da tijekom ESI-MS analize glikani obilježeni RapiFluor-MS-om daju veći intenzitet od glikana obilježenih prokainamidom, dok glikani obilježeni 2-AB-om daju najniži intenzitet (Lauber i sur., 2015). Zbog toga se nameće pitanje je li razlika u intenzitetima različitih boja proizlazi iz njihove različite fluorescencije i efikasnosti ionizacije ili iz različite efikasnosti kemijske reakcije obilježavanja glikana.

U ovom radu se ispituje koliki utjecaj na rezultate analize ima sama uspješnost vezanja fluorescentne boje na N-glikane bez obzira na njenu sposobnost ionizacije. Efikasnost vezanja boja se provjerava i uspoređuje preko omjera apsolutnih intenziteta pikova neobilježenih glikana u uzorcima dobivenih analizom masenim spektrometrom (ESI-QToF-MS). Također, gleda se koje su optimalne koncentracije uzoraka za najefikasnije vezanje pojedine boje na glikane.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. UZORAK

Kao uzorak za ovu analizu koristio se komercijalni standard Sigma-Aldrich IgG,  $\geq 95\%$  liofilizirani prašak i izolirani IgG. Količina IgG-a u otopljenom prašku dodatno je potvrđena UV-Vis spektrometrijom. Otapanjem praška u vodi priređuje se ishodna otopina, koja se potom koristi za daljnje priređivanje otopina IgG-a različitih koncentracija (5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 i 500  $\mu\text{g}$  za označavanje s 2-aminobenzamidom; 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 i 500  $\mu\text{g}$  za označavanje prokainamidom; 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 7.5, 15, 30  $\mu\text{g}$  za označavanje s Rapifluorom). Ove se otopine različitih koncentracija izrađuju u triplikatu. Iz otopina koje su izrađene u triplikatu se odpipetira volumen u kojem se nalazi potrebna masa IgG-a u mikrotitarsku pločicu, a voda se ukloni sušenjem.

#### 3.2. MATERIJALI

##### 3.2.1. Anorganske kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
Dinatrij hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Sigma-Aldrich
Kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma-Aldrich
Kalijev klorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Klorovodična kiselina (HCl)	Kemika
Natrijev klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Amonijev bikarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )	Sigma-Aldrich

*Tablica 1. Anorganske kemikalije*

### 3.2.2. Organske kemikalije

Kemikalija	Proizvodač
Acetonitril (ACN)	Fluka
2-aminobenzamid (2-AB)	Sigma-Aldrich
Prokainamid (ProA)	Sigma-Aldrich
RapiFluor-MS	Waters, Milford
2-pikolin boran (2-PB)	Sigma-Aldrich
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Sigma-Aldrich
Ledena octena kiselina (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck
DMSO (dimetilsulfoksid)	Fluka
SDS (natrijev dodecil-sulfat) detergent	Sigma
NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol) detergent	Sigma

*Tablica 2. Organske kemikalije*

### 3.2.3. Biološke kemikalije

Kemikalija	Proizvodač
PNGazaF (peptid-N-glikozidaza)	Prozyme

*Tablica 3. Biološke kemikalije*

### 3.2.4. Otopine i puferi

Kemikalija	Proizvođač
1.33% SDS	1,33 g SDS-a (natrijevog dodecil-sulfata) otopiti u 100 ml vode
30% octena kiselina u DMSO	Za 10 ml otopine: u 3 ml octene kiseline dodati 7 ml dimetilsulfoksida (DMSO)
96% acetonitril	Za 250 ml otopine: dodaje se 240 ml ACN-a i 10 ml H <sub>2</sub> O (voda se dodaje zbog hidrofilnosti kolone u daljnjoj analizi glikana (HILIC))
otopina za označavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 µl 30% octene kiseline u DMSO dodaje se 0,48 mg 2-aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana
5xPBS	Za 200 ml pufera: 8,00 g NaCl, 1,38 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,29 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,19 g KCl → sve otopiti u 200 ml ultra čiste vode (miliQ H <sub>2</sub> O) (nakon miješanja otopinu filtrirati i podesiti pH s NaOH)
otopina za kalibraciju MS	Waters, Milford ( 2 µg/µL otopine natrijevog jodida u 50:50 izopropilnog alkohola i vode)

*Tablica 4. Otopine i puferi*

### 3.2.5. Laboratorijska oprema i pribor

Oprema i pribor	Proizvođač
pločice za skupljanje uzoraka; polipropilen; 2 ml zapremnine; za 96 uzoraka	Waters, Milford
pločice za pročišćavanje glikana	Orochem
AcroPrep 96 GHP 0.2 µm filter pločica od 1 ml	Pall
PCR pločice	Frame Star
mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Ranin
Vacuum manifold – vakuumska pumpa	Pall Corporation
tresilica	IKA – Schüttler MTS 4
Bio Vortex V1	Biosan
centrifuga	Centifuge 5804 Eppendorf
vaga	Mettler Toledo
Waters Acquity UPLC kromatograf	Waters, Milford
NanoAcquity UPLC analizator	Waters, Milford
Synapt G2-Si MS system	Waters, Milford
Glycoworks RapiFluor-MS N-Glycan kit	Waters, Milford

**Tablica 5.** Laboratorijska oprema i pribor

### 3.3. PROTOKOL PRIPREME UZORKA

Deglikozilacija imunoglobulina G je prvi korak u analizi N-glikana. Kako bi izolirali N-glikane od IgG-a, prvo je potrebno denaturirati protein. Tako se uklanjaju steričke smetnje koje bi mogle otežavati pristup PNGazi F, enzimu koji specifično kida vezu između proteina i N-glikana. S obzirom na to da uzorak nije bio serum niti plazma, uzorak nije bilo potrebno

prethodno posebno obrađivati, nego je pločicu s već nanesenim uzorcima IgG-a samo trebalo izvaditi iz zamrzivača.

### **3.3.1. Protokol za označavanje N-glikana 2-aminobenzamidom i prokainamidom**

Uzorak se priprema za analizu tako da se deglikozilirani N-glikani označe fluorescentnim bojama te pročiste od proteina i drugih molekula. Vežanje 2-aminobenzamida i prokainamida se odvija reakcijom reduktivne aminacije u kiselim uvjetima s reducirajućim agensom 2-pikolinboran uz DMSO.

#### **3.3.1.1. Denaturacija proteina**

Dodaje se 30  $\mu\text{L}$  1,33% SDS-a u svaku jažicu s uzorkom koristeći pipete s nastavkom od 250  $\mu\text{L}$ . Uzorak se promiješa uvlačenjem u nastavak pipete nekoliko puta, te potom slijedi inkubacija. Pločice se zatvore adhezivnom folijom i ostave inkubirati pri 65 °C tijekom 10 minuta. Nakon isteka vremena, pločice se izvade te ostave hladiti 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Kada su se uzorci ohladili, dodaje se 10  $\mu\text{L}$  4% Igepal-a, koji će spriječiti denaturaciju PNGaze F vežući SDS. Uzorak se ponovno miješa uvlačenjem u nastavak pipete od 250  $\mu\text{L}$  nekoliko puta. Potom se pločice stavljaju na tresilicu 15 minuta dok ne budu spremne za dodavanje enzima.

#### **3.3.1.2. Deglikozilacija**

Prije dodavanja enzima uzorku, treba se pripremiti enzimska smjesa miješanjem 10  $\mu\text{L}$  5xPBS s 0,12  $\mu\text{L}$  PNGaze F za svaki uzorak. Da bi se osigurala točnost mjerenja, prije pipetiranja enzim se centrifugira te se u smjesu enzima dodaje dodatnih 30  $\mu\text{L}$  5xPBS-a. U svaki se uzorak dodaje 10  $\mu\text{L}$  prethodno pripravljene smjese enzima te resuspendira uvlačenjem u nastavak pipete. Pločice se prekriju adhezivnom folijom i inkubiraju na 37 °C tijekom 18 sati.

#### **3.3.1.3. Priprema otopine 2-AB i ProA za označavanje**

Otopina 2-aminobenzamida za fluorescentno označavanje priprema se u digestoru dodavanjem 25  $\mu\text{L}$  30%-tne octene kiseline u DMSO, 0,48 mg 2-aminobenzamida te 1,12 mg 2-pikolinborana po uzorku. Prije vaganja važno je ostaviti 2-pikolinboran na sobnoj temperaturi. Prilikom dodavanja sastojaka, važno je smjesu miješati na Vortexu kako bi osigurali njihovo otapanje.

Otopina prokainamida za fluorescentno označavanje priprema se na jednak način kao i otopina 2-aminobenzamida. Masa prokainamida dodana octenoj kiselini u DMSO i 2-pikolinboranu iznosi 1,08 mg po uzorku.

#### **3.3.1.4. Označavanje N-glikana**

Koristeći pipete s nastavcima od 250  $\mu\text{L}$  dodaje se 25  $\mu\text{L}$  otopine za označavanje u svaki uzorak te se promiješa uvlačenjem u nastavak pipete. Ako se uzorak zapjeni, nakratko se centrifugira. Pločice se prekriju adhezivnom folijom i na treskalici ostave 10 minuta, a zatim se stave na zagrijavanje u pećnicu na 65 °C tijekom 2 sata. Nakon zagrijavanja, pločice se hlade 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi bile spremne za nanošenje na prethodno pripremljene GHP pločice koje sadrže 96 jažica s hidrofilnom polipropilenskom membranom na koju se vežu glikani, veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  (1 ml AcroPrep GHP 0,2  $\mu\text{L}$  filtarske pločice).

#### **3.3.1.5. Prekondicioniranje GHP pločica**

Prekondicioniranje GHP pločica obuhvaća njihovo ispiranje pomoću vakuumske pumpe, pri tom pazeći da tlak pumpe ne prijeđe 2 inHg kako se ne bi oštetila hidrofilna polipropilenska membrana. Koristeći nastavke od 300  $\mu\text{L}$ , prvo se pipetira te propušta kroz svaku jažicu, 200  $\mu\text{L}$  svježe pripremljenog 70%-tnog etanola, zatim 200  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode te 200  $\mu\text{L}$  svježe pripremljenog 96%-tnog acetonitrila prethodno ohlađenog na 4 °C. Bitno je da acetonitril bude posljednji na redu jer će se kasnije koristiti kao otapalo. Pri pipetiranju pojedinih otopina mogu se koristiti isti nastavci za pipetiranje za cijelu pločicu, što nije slučaj kada se pipetiraju uzorci jer se tada treba izbjeći križna kontaminacija. Nakon pripreme GHP pločica, nanose se uzorci.

#### **3.3.1.6. Nanošenje i pročišćavanje označenih N-glikana**

Svatom se uzorku označenih N-glikana dodaje 700  $\mu\text{L}$  hladnog 100%-tnog acetonitrila pomoću multikanalne pipete s nastavcima od 1 ml. Sljedeći korak je miješanje uzoraka pipetiranjem, a zatim se, koristeći iste nastavke za pipetiranje, pažljivo prenose ukupni volumeni uzoraka od cca 800  $\mu\text{L}$  (75  $\mu\text{L}$  uzorka + 700  $\mu\text{L}$  ACN) u odgovarajuće jažice na GHP pločici. Slijedi inkubacija koja traje 2 minute te uklanjanje preostale tekućine pomoću vakuumske pumpe.

Pročišćavanje se provodi uzastopnim dodavanjem 200  $\mu$ L svježe pripremljenog 96%-tnog acetonitrila prethodno ohlađenog na 4 °C u svaku jažicu pločice pri čemu je pločica priključena na vakuumsku pumpu kako bi se ubrzalo uklanjanje agensa. Koriste se nastavci za pipetiranje od 300  $\mu$ L i moguće je upotrijebiti isti set nastavaka za cijelu GHP pločicu pod uvjetom da se izbjegne kontakt nastavaka s pločicom. Postupak se ponavlja 4 puta, a nakon zadnjeg ispiranja pločica se postavi na pločicu za sakupljanje uzoraka od 2 mL, koja će spriječiti da otpad prođe u centrifugu pri kasnijem centrifugiranju, te se ponovno nanese 200  $\mu$ L 96%-tnog acetonitrila u svaku jažicu. Kako bi se uklonio 96%-tni acetonitril, GHP pločica se stavi na centrifugiranje na 1000 okretaja/min tijekom 5 minuta.

### **3.3.1.7. Eluiranje N-glikana**

GHP pločica se postavi na čistu ABgene PCR pločicu za sakupljanje uzoraka. Koristeći nastavke za pipetiranje od 300  $\mu$ L, doda se 90  $\mu$ L ultra čiste vode u svaki uzorak te se miješa na tresilici 15 minuta. Nakon toga se GHP pločica, zajedno s PCR pločicom za sakupljanje uzoraka, centrifugira 5 minuta na 1000 okretaja/min kako bi se sakupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Isti postupak se ponovi još jednom, nakon čega se provjeri je li sav sadržaj eluirao, odnosno da nema zaostalih kapljica na GHP pločici i da je ukupni sakupljeni volumen eluata jednak 180  $\mu$ L u svakoj jažici. Nakon provjere, zatvorimo jažice na PCR pločici sa PCR čepovima te pločicu pohranimo u zamrzivač.

### **3.3.2. Protokol za označavanje N-glikana RapiFluor-MS-om**

Uzorak se za analizu priprema koristeći Glycoworks RapiFluor-MS N-glycan kit (Waters Corporation, Milford, MA, USA) u tri koraka: deglikozilacija N-glikana kojoj prethodi denaturacija, fluorescentno označavanje i pročišćavanje, omogućavajući tako jednostavnu i brzu pripremu uzorka koja minimalizira utrošak vremena i reagensa. Postupak deglikozilacije traje manje od 15 minuta, označavanja 5 minuta, a postupak pročišćavanja 10 minuta nakon čega je uzorak spreman za analizu. Ovaj kit se sastoji od standarda intaktnog mAb, enzima Rapid PNGase F i pufera (250 mM HEPES, pH 7.9), RapiGest anionskog surfaktanta koji osigurava denaturaciju glikoproteina i sprječava njihovo taloženje te potpomaže reakciju deglikozilacije, fluorescentne boje RapiFluor-MS reagensa i otopine dimetilformamida u kojoj se reagens otapa i one koja služi za razrijeđivanje eluata, elucijskog pufera (200 mM amonijev acetat u 5% acetonitrilu), HILIC mikroelucijske pločice za pročišćavanje te pribora potrebnog za izvođenje postupka (epruvete, čepove i pločice).



### 3.3.2.1. Ubrzana deglikozilacija

Prije početka, s obzirom na to da koristimo grijaće blokove, preporuča se postaviti temperaturu, tako da otopine budu mogle biti zagrijane na temperature od 50 °C do 90 °C. Potrebno je koristiti kontrolni standard kojeg jednu vijalu (1mg/vial) rekonstituiramo u 500 µL 18,2 MΩ vode kako bi dobili 2 mg/mL IgG otopinu. Otopina se alikvotira i nakon solubilizacije pohranjuje na -80 °C. Priprema se puferirana otopina 5%-tnog RapiGest surfaktanta tako da se otopi 3 mg RapiGest-a u 60 µL 5x GlycoWorks Rapid pufera te se zatim miješa na vorteksu. U epruvetu od 1 mL se prvo dodaje 15,3 µL 18,2 MΩ vode, zatim 7,5 µL otopine glikoproteina koncentracije 2 mg/mL, nakon čega se pipetira 6 µL puferirane otopine 5%-tnog RapiGest surfaktanta. Uvlačenjem u nastavak pipete nekoliko puta se uzorak miješa. Smjesa se potom zagrijava 3 minute na barem 90 °C na grijaćem bloku kako bi se proteini denaturirali, nakon čega se hladi još 3 minute. Dodatkom 1,2 µL enzima Rapid PNGase F, dovodi se koncentracija IgG-a do 0,5 mg/mL, nakon čega se opet miješa uvlačenjem u nastavak pipete. Slijedi inkubacija u trajanju od 5 minuta tako da se temperatura otopine održava na 50 °C. Pri isteku vremena, epruveta se miče sa grijaćeg bloka i ostavlja 3 minute na sobnoj temperaturi da se deglikozilirana smjesa ohladi.

### 3.3.2.2. Označavanje N-glikana

Za vrijeme trajanja posljednje inkubacije, započinje se s izradom otopine reagensa za označavanje N-glikana. Otapa se jedna vijala od 9 mg RapiFluor-MS reagensa u 131 µL bezvodnog dimetilformamida (DMF) koje je polarno i aprotično otapalo. Važno je da budu bezvodni uvjeti jer sam reagens brzo hidrolizira u vodi. Uvlačenjem u nastavak pipete 5-10 puta otopina se miješa i tako osigurava da je reagens u potpunosti otopljen. U slučaju da se ne otopi u potpunosti, miješa se kratko vrijeme na vorteksu. U ohlađenu smjesu deglikoziliranih glikoproteina u kojoj se sad nalaze glikani u obliku glikozilamina, dodaje se 12 µL otopine reagensa za označavanje N-glikana te se miješa uvlačenjem u nastavak pipete 5 puta. Reakcija se odvija na sobnoj temperaturi. Nakon 5 minuta, reakcija se razrijedi sa 358 µL acetonitrila kao pripremu za HILIC SPE („hydrophilic interaction chromatography solid phase extraction“) pročišćavanje označenih N-glikana.

### 3.3.2.3. HILIC SPE pročišćavanje označenih N-glikana

Potrebno je postaviti GlycoWorks HILIC  $\mu$ Elution ploču, koja ispod sebe ima ploču za otpadne tvari, na vakuumsku pumpu postavljenu na tlak 2,5-4 inHg te kondicionirati jažice koje ćemo koristiti s 200  $\mu$ L 18,2 M $\Omega$  vode. Zatim se jažice uravnoteže pomoću 200  $\mu$ L smjese vode i acetonitrila u omjeru 15:85 (v/v). Na ploču se potom nanose acetonitriplom razrijeđeni uzorci označenih N-glikana čiji je volumen ukupno oko 400  $\mu$ L. Jažice se isperu dva puta sa 600  $\mu$ L smjese mravlje kiseline, vode i acetonitrila u omjeru 1:9:90 (v/v/v). Ploča za otpad se zamijeni sa pločom za sakupljanje uzoraka koja sadrži 96 jažica opremljenih umetcima sa suženim dnom od 600  $\mu$ L. Glikani se eluiraju tri puta, svaki put sa 30  $\mu$ L GlycoWorks SPE elucijskog pufera koji omogućuje optimalno pročišćavanje kako malih, neutralnih, tako i jako sijaliniziranih glikana velike molekulske mase.

Kao pripremu za daljnju analizu, 90  $\mu$ L eluata se razrijedi sa 100  $\mu$ L dimetilformamida i 210  $\mu$ L acetonitrila te miješa uvlačeći u nastavak pipete 5 puta.

### 3.4. ANALIZA UZORAKA

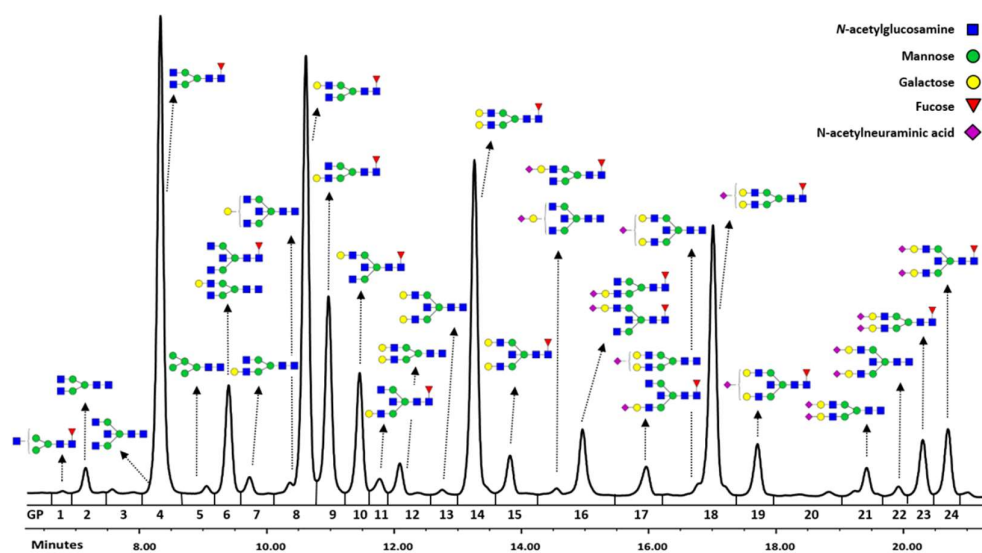
Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvajaju se kromatografijom hidrofilnih interakcija na Waters Acquity UPLC instrumentu (Milford, MA, USA), koji se sastoji od kvaternarne jedinice za pripremu mobilne faze, automatskog injektora uzoraka i fluorescentnog detektora. UPLC instrument je bio spregnut sa Synapt G2-Si MS sistemom (Waters, Milford, MA, USA). Maseni spektrometar je pod kontrolom programa MassLynx v. 4.1 (softver za kontrolu i prikupljanje podataka) (Waters, Milford, MA, USA). Uvjeti su bili sljedeći: pozitivni ionski mod, napon kapilare 3 kV, napon stošca za uzorkovanje 30 V, temperatura izvora 120 °C, temperatura desolvatacije 350 °C, a protok plina 800 L/sat. Maseni spektar je sniman na frekvenciji od 1 Hz u rasponu m/z od 500 do 3000.

Pri kromatografiji N-glikana obilježenih 2-aminobenzamidom fluorescentni detektor je namješten na valnu duljinu od 250 nm za ekscitaciju i valnu duljinu od 428 nm za emisiju, dok je za N-glikane obilježene prokainamidom postavljen na 310 nm za ekscitaciju i valnu duljinu od 370 nm za emisiju, a za N-glikane obilježene RapiFluor-MS-om postavljen je na valnu duljinu od 265 nm za ekscitaciju i 425 nm za emisiju. UPLC uređaj je kontroliran programom Empower 2, 2145 verzija (Waters, Milford, MA, USA), a uzorci su razdvajani na Waters BEH koloni za kromatografiju glikana, dimenzija 100 x 2,1 mm, punjenoj česticama veličine 1,7  $\mu$ m

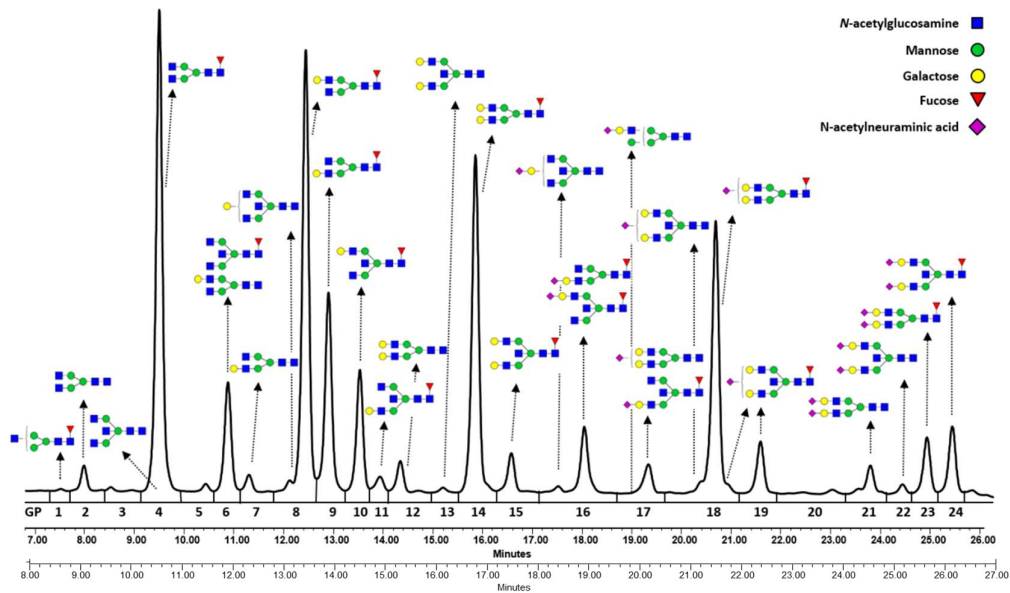
što je karakteristično za UPLC analizu. Na kolonu se injektira 4,17% uzorka glikana obilježenih 2-aminobenzamidom ili prokainamidom te 7,50% uzorka glikana obilježenih RapiFluor\_MS-om. Kao otapalo A koristi se 50 mM otopina amonijevog formijata čiji je pH 4.4, a kao otapalo B koristi se acetonitril. Uvjeti analize su takvi da je, kroz 25 minuta s brzinom protoka 0,4 mL/min, linearni gradijent acetonitrila od 75 do 62%. Analiza se odvija pri temperaturi od 60 °C, a uzorci se prije injektiranja drže na 10 °C.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

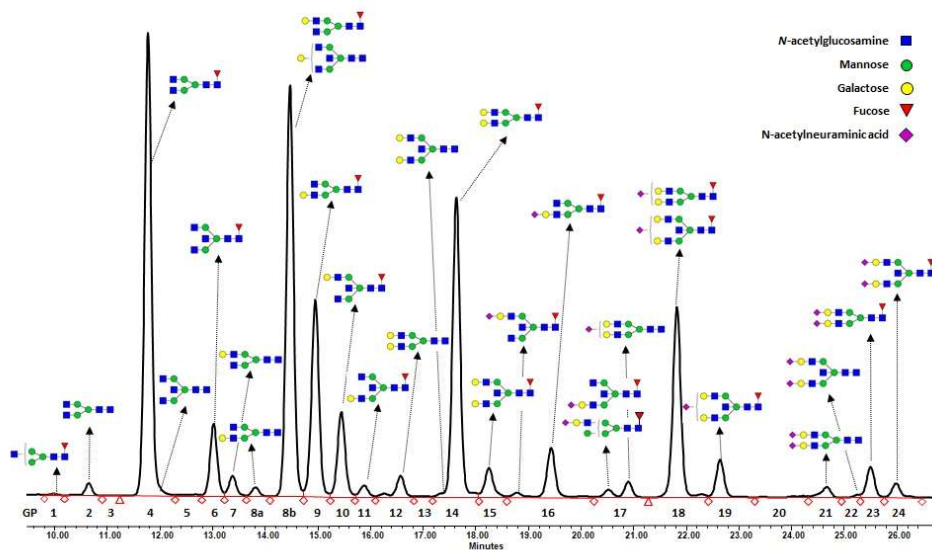
Cilj ovog diplomskog rada bila je usporedba uspješnosti vezanja tri različite fluorescentne boje na N-glikane, neovisno o njihovoj sposobnosti ionizacije, i kakav utjecaj efikasnost vezanja ima na rezultate analize. Uzorci IgG-a različitih koncentracija su izrađeni u triplicatu, a iz njih su izolirani N-glikani koji su potom obilježeni fluorescentnim bojama te razdvojeni HILIC-UPLC metodom. Dobiveni kromatogrami su podijeljeni na 24 glikanska kromatografska vrška (GP1-GP24), pri čemu svaki vršak predstavlja jedan ili više glikana. (Slika 8., 9., 10.)



**Slika 8.** BPI („base peak intensity“) kromatogram 2-aminobenzamidom obilježenih N-glikana oslobođenih s imunoglobulina G



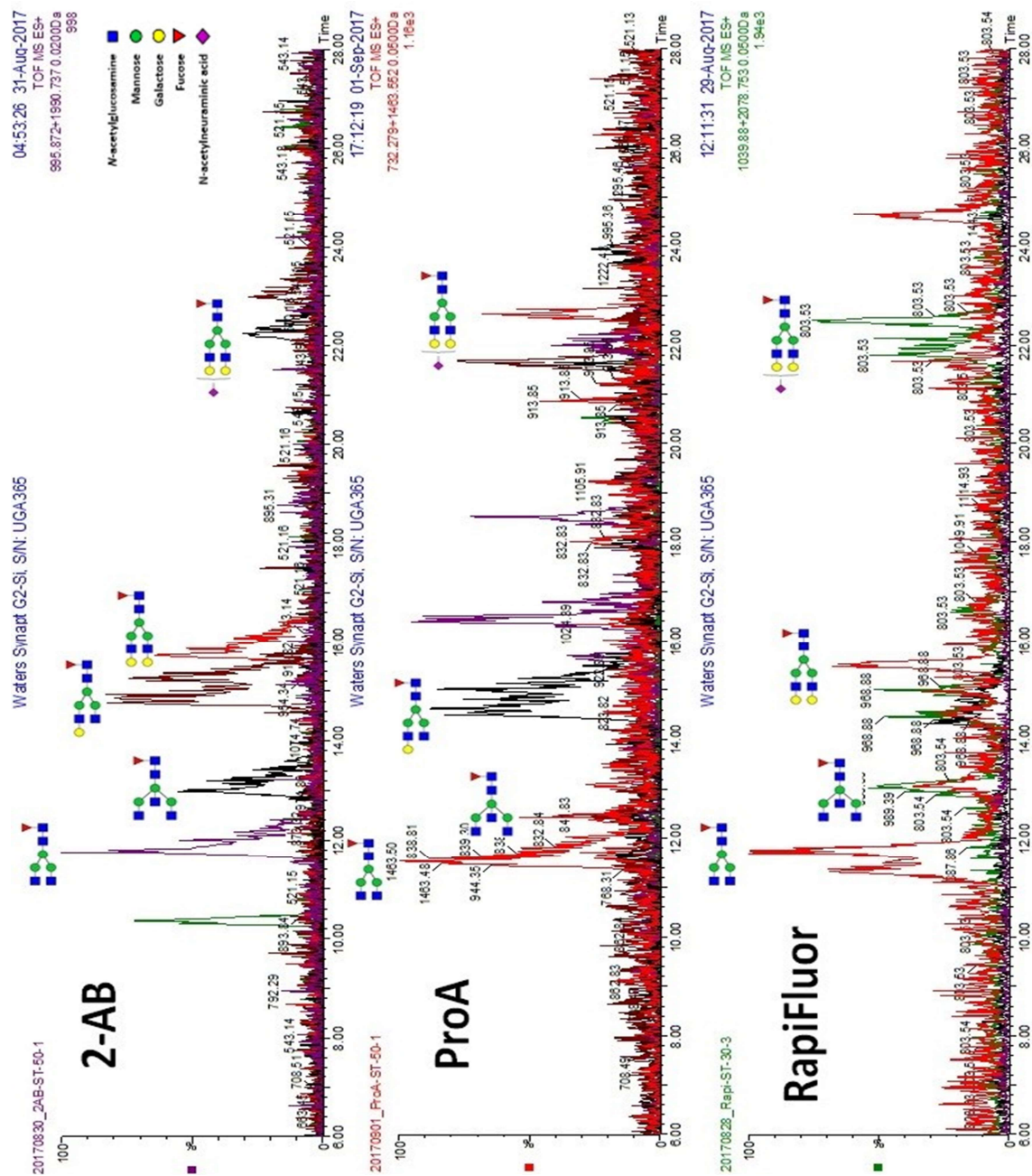
*Slika 9. BPI („base peak intensity“) kromatogram prokainamidom obilježenih N-glikana oslobođenih s imunoglobulina G*



*Slika 10. BPI („base peak intensity“) kromatogram RapiFluor-MS-om obilježenih N-glikana oslobođenih s imunoglobulina G*

Sve tri boje daju vrlo slično razdvajanje glikana, odnosno 24 pika čija se vremena elucije malo razlikuju, što pokazuje dosljednost glikanskog profila uz prisutnost malih razlika. Ovisno o polarosti strukture, glikani eluiraju u različitim vremenima. Hidrofilnije molekule eluiraju kasnije od manje hidrofilnih te glikani koji sadrže sialinsku kiselinu eluiraju posljednji

jer su nabijeni. Razdvojeni glikani su analizirani ESI-QToF-MS-om. Iako je intenzitet obilježenih glikana puno veći, vide se i slobodni, neobilježeni glikani što ukazuje na to da obilježavanje nije 100% efikasno (Slika 11.).



**Slika 11.** XIC („extracted-ion chromatogram“)  $m/z$  svih najzastupljenijih slobodnih, neobilježenih N-glikana u uzorcima N-glikana obilježenih 2-aminobenzamidom (gore), prokainamidom (sredina) i RapiFluor-MS-om (dolje)

Postavlja se pitanje je li razlika u intenzitetima kod različitih boja uzrokovana različitom fluorescencijom i efikasnošću ionizacije ili pak različitom uspješnosti kemijske reakcije označavanja glikana. Kako bi se kvantificirala efikasnost obilježavanja za svaku fluorescentnu boju, treba usporediti količinu obilježenih naspram količine slobodnih, neobilježenih glikana, odnosno količina slobodnih glikana se podijeli sa zbrojem količine slobodnih i obilježenih glikana. S obzirom na to da se uzorak radio u triplikatu, izračunaju se srednje vrijednosti postotaka efikasnosti za svaku masu u mikrogramima IgG-a s kojom se krenulo u metodu (Tablica 6., 7., 8.). Simboli u tablici za ime glikana zapravo daju uvid u strukturu glikana. Naime, svi N-glikani imaju sržnu ugljikohidratnu sekvencu koja se sastoji od dva N-acetilglukozamina (GlcNAc) i tri manozna ostatka. „F“ označava sržnu fukozu vezanu za unutarnji GlcNAc  $\alpha$ 1–6 vezom; „Ax“ označava broj antena N-acetilglukozamina na trimanoznoj srži, odnosno „A2“ predstavlja dvoantennarni glikan u kojem su oba GlcNAc vezana  $\beta$ 1–2 vezom. „B“ označava račvujući GlcNAc povezan  $\beta$ 1–4 vezom za  $\beta$ 1–4 manozu. „Gx“ označava broj na antene  $\beta$ 1–4 vezanih galaktoza (G), dok „Sx“ predstavlja broj sijalinskih kiselina povezanih na galaktozu.

ime glikana	količina ( $\mu\text{g}$ )	5	10	25	50	75	100	250	500
A2	2-AB-IS	43,9%	49,5%	37,4%	35,9%	37,1%	42,0%	47,5%	64,9%
	2-AB-ST	58,4%	54,1%	40,1%	30,0%	29,8%	26,9%	25,7%	29,1%
FA2	2-AB-IS	18,6%	16,1%	14,5%	15,1%	17,0%	19,3%	24,5%	29,5%
	2-AB-ST	16,8%	15,4%	13,8%	11,8%	12,2%	12,4%	11,3%	13,6%
FA2B	2-AB-IS	26,2%	28,1%	26,3%	22,5%	23,5%	23,5%	26,5%	47,1%
	2-AB-ST	26,1%	20,1%	17,4%	15,0%	43,2%	15,4%	13,8%	17,0%
FA2G1	2-AB-IS	10,9%	9,1%	9,1%	9,5%	11,5%	12,7%	15,8%	20,4%
	2-AB-ST	10,8%	9,4%	9,2%	7,8%	8,3%	8,7%	7,9%	10,2%
FA2G1	2-AB-IS	18,9%	17,8%	16,5%	17,0%	19,2%	22,1%	27,7%	32,8%
	2-AB-ST	19,1%	17,2%	16,1%	14,1%	14,6%	15,4%	13,9%	17,3%
FA2BG1	2-AB-IS	24,7%	21,8%	16,2%	17,4%	20,5%	23,7%	28,2%	35,8%
	2-AB-ST	21,4%	18,7%	18,1%	15,4%	16,4%	17,1%	15,1%	19,6%
FA2G2	2-AB-IS	14,0%	15,2%	13,9%	13,2%	14,9%	16,6%	19,5%	29,7%
	2-AB-ST	14,4%	12,7%	11,6%	10,2%	10,5%	11,4%	10,0%	13,0%
FA2G2S1	2-AB-IS	16,0%	16,8%	15,3%	15,0%	16,3%	18,3%	21,8%	32,0%
	2-AB-ST	17,5%	15,1%	13,5%	11,7%	11,6%	12,4%	11,2%	14,1%
FA2G2S2	2-AB-IS	14,3%	9,9%	10,1%	11,7%	14,0%	17,2%	22,9%	11,3%
	2-AB-ST	12,0%	10,9%	13,9%	12,1%	12,7%	13,8%	11,7%	15,1%
FA2BG2S2	2-AB-IS	23,2%	15,7%	15,3%	16,5%	18,8%	23,3%	27,3%	18,9%
	2-AB-ST	19,5%	15,6%	16,1%	14,8%	15,7%	16,8%	14,6%	18,9%

**Tablica 6.** Efikasnost obilježavanja prikazana u postotcima za N-glikane obilježavane 2-aminobenzamidom. Za svaku količinu izoliranog (IS) i standardnog (ST) IgG-a ( $\mu\text{g}$ ) s kojom se ušlo u metodu, izračunata je srednja vrijednost triplikata i prikazana na jednu decimalu.

ime glikana	količina (µg)	0,5	1	5	10	25	50	75	100	250	500
A2	ProA-IS	15,4%	14,3%	2,1%	1,0%	0,7%	0,6%	0,7%	0,6%	0,7%	1,1%
	ProA-ST	11,1%	10,2%	2,4%	1,4%	0,7%	0,5%	0,4%	0,4%	0,4%	0,5%
FA2	ProA-IS	1,6%	1,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,6%	0,8%	1,0%	1,1%	1,2%
	ProA-ST	1,5%	1,7%	0,4%	0,4%	0,5%	0,5%	0,6%	0,6%	0,7%	1,2%
FA2B	ProA-IS	1,7%	1,3%	0,5%	0,4%	0,4%	0,4%	0,6%	0,7%	0,8%	0,9%
	ProA-ST	1,1%	1,8%	0,4%	0,3%	0,4%	0,4%	0,5%	0,5%	0,6%	0,8%
FA2G1	ProA-IS	0,9%	0,7%	0,3%	0,3%	0,4%	0,4%	0,6%	0,7%	0,8%	0,8%
	ProA-ST	0,7%	0,9%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,4%	0,5%	0,5%	0,9%
FA2G1	ProA-IS	1,3%	1,4%	0,6%	0,6%	0,7%	0,7%	1,0%	1,2%	1,3%	1,5%
	ProA-ST	1,1%	1,6%	0,5%	0,5%	0,6%	0,6%	0,7%	0,7%	0,8%	1,3%
FA2BG1	ProA-IS	1,9%	2,2%	0,9%	0,8%	0,8%	0,8%	1,1%	1,3%	1,4%	1,7%
	ProA-ST	1,4%	1,9%	0,7%	0,6%	0,7%	0,7%	0,9%	0,9%	1,0%	1,5%
FA2G2	ProA-IS	1,2%	1,3%	0,6%	0,5%	0,6%	0,7%	0,9%	1,1%	1,2%	1,3%
	ProA-ST	1,1%	1,3%	0,5%	0,5%	0,6%	0,6%	0,7%	0,8%	0,8%	1,3%
FA2G2S1	ProA-IS	1,8%	2,2%	0,7%	0,7%	0,7%	0,8%	1,1%	1,3%	1,5%	1,6%
	ProA-ST	1,6%	2,5%	0,8%	0,7%	0,7%	0,6%	0,7%	0,8%	0,9%	1,3%
FA2G2S2	ProA-IS	4,8%	3,4%	1,0%	0,7%	0,9%	0,9%	1,3%	1,4%	1,6%	2,0%
	ProA-ST	6,1%	5,0%	1,0%	0,9%	0,9%	0,7%	0,8%	0,7%	0,8%	1,2%
FA2BG2S2	ProA-IS	6,6%	5,6%	1,3%	1,0%	1,0%	1,1%	1,5%	1,6%	1,8%	2,3%
	ProA-ST	6,7%	6,0%	1,4%	1,4%	1,0%	0,9%	1,0%	0,9%	1,0%	1,5%

**Tablica 7.** Efikasnost obilježavanja prikazana u postotcima za N-glikane obilježavane prokainamidom. Za svaku količinu izoliranog (IS) i standardnog (ST) IgG-a (µg) s kojom se ušlo u metodu, izračunata je srednja vrijednost triplikata i prikazana na jednu decimalu.



ime glikana	količina (µg)	0,5	1	2	4	7,5	15	30
FA2	RFMS-IS	1,9%	0,3%	0,2%	0,1%	0,2%	0,2%	0,3%
	RFMS-ST	2,1%	0,5%	0,5%	0,3%	0,2%	0,1%	0,2%
FA2G1	RFMS-IS	0,5%	0,3%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,4%
	RFMS-ST	0,4%	0,3%	0,2%	0,2%	0,2%	0,1%	0,2%
FA2G1	RFMS-IS	0,8%	0,3%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,4%
	RFMS-ST	0,8%	0,4%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
FA2G2	RFMS-IS	1,5%	0,4%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,3%
	RFMS-ST	1,3%	0,6%	0,3%	0,2%	0,2%	0,1%	0,2%
FA2G2S1	RFMS-IS	1,3%	0,6%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,4%
	RFMS-ST	1,7%	0,7%	0,5%	0,3%	0,3%	0,2%	0,3%
FA2G2S2	RFMS-IS	0,7%	0,3%	0,2%	0,2%	0,1%	0,1%	0,4%
	RFMS-ST	0,6%	0,6%	0,2%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
FA2BG2S2	RFMS-IS	1,1%	0,3%	0,2%	0,1%	0,2%	0,3%	0,6%
	RFMS-ST	0,9%	0,4%	0,3%	0,2%	0,2%	0,2%	0,3%

**Tablica 8.** Efikasnost obilježavanja prikazana u postotcima za N-glikane obilježavane RapiFluor-MS-om. Za svaku količinu izoliranog (IS) i standardnog (ST) IgG-a (µg) s kojom se ušlo u metodu, izračunata je srednja vrijednost triplikata i prikazana na jednu decimalu.

Iz prikazanih podataka izračunate su prosječne vrijednosti efikasnosti obilježavanja za svaku boju, odnosno postotak svih neobilježenih glikana koje smo analizirali koji redom iznosi za 2-aminobenzamid 19,4%, za prokainamid 1,4% te za RapiFluor-MS iznosi 0,4%. Najlošije se pokazuje obilježavanje 2-aminobenzamidom, ali efikasnost ionizacije pri analizi masenim spektrometrom je kod njega daleko najlošija, dok je za RapiFlour-MS efikasnost ionizacije i osjetljivost detekcije glikana, najbolja (Lauber i sur., 2015.), zbog čega objektivno uspoređivanje nije moguće. S obzirom na to da su faktori odaziva intenziteta različiti za svaku boju i glikane, uspoređivali su se samo apsolutni intenziteti slobodnih, neobilježenih glikana jer je njihov faktor odaziva jednak. (Tablica 9. i 10.)

2AB vs ProA									
ime glikana	količina (µg)	5	10	25	50	75	100	250	500
A2	IS	1,1	1,9	1,3	1,2	0,9	1,4	1,0	0,7
	ST	1,0	1,7	1,1	0,8	1,0	0,9	0,9	0,9
FA2	IS	0,9	0,8	1,0	1,1	1,0	1,4	0,9	0,3
	ST	1,1	1,3	1,1	0,9	1,0	1,0	0,8	0,8
FA2B	IS	2,1	2,6	2,6	2,3	1,8	2,2	1,2	0,9
	ST	2,2	2,3	1,6	1,5	1,4	1,5	1,2	1,1
FA2G1	IS	1,1	0,8	1,1	1,2	1,1	1,6	0,9	0,3
	ST	1,2	1,4	1,2	1,1	1,1	1,1	0,9	0,9
FA2G1	IS	1,0	0,8	1,0	1,0	0,9	1,3	0,9	0,3
	ST	1,1	1,4	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	0,8
FA2BG1	IS	1,1	0,8	0,8	0,9	0,8	1,3	0,9	0,3
	ST	1,1	1,1	1,0	0,8	0,9	1,0	0,8	0,9
FA2G2	IS	0,9	0,9	1,1	1,1	0,9	1,4	0,8	0,3
	ST	1,1	1,2	0,9	0,8	0,9	1,0	0,8	0,8
FA2G2S1	IS	1,1	1,0	1,2	1,2	0,9	1,4	0,8	0,3
	ST	1,3	1,5	1,0	1,0	1,0	1,2	0,8	0,9
FA2G2S2	IS	1,2	1,0	1,0	1,1	0,8	1,3	0,8	0,2
	ST	1,5	1,3	1,1	1,1	1,1	1,4	0,7	1,0
FA2BG2S2	IS	1,4	0,8	0,9	0,9	0,8	1,4	0,7	0,2
	ST	1,3	1,1	0,9	0,9	1,0	1,2	0,7	0,8

**Tablica 9.** Omjeri apsolutnih intenziteta slobodnih N-glikana koji se nisu obilježili 2-aminobenzamidom i onih neobilježenih prokainamidom. „IS“ označava izolirani, a „ST“ standardni IgG.

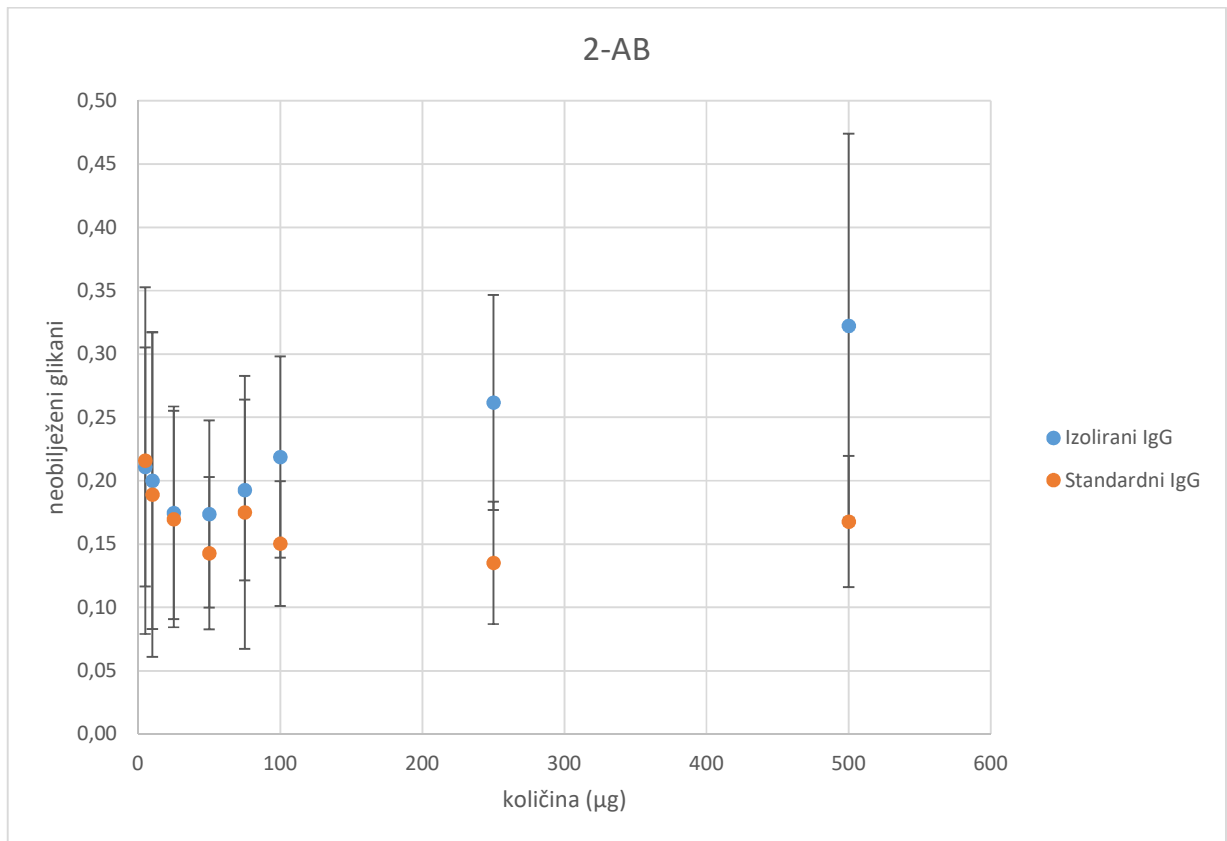
Prilikom uspoređivanja efikasnosti obilježavanja glikana prokainamidom i RapiFluor-MS-om, u obzir je bilo potrebno uzeti činjenicu da se na kolonu nije injektirala ista količina uzorka tj. kod prokainamida je injektirano 4,17% uzorka, a kod RapiFluor-MS-a 7,50%. Zbog toga je bilo potrebno izračunati korekcijski faktor kako bi mogli izraziti početne mase glikana s kojima se ušlo u analizu s RapiFluor-MS-om preko početnih masa onih u analizi s prokainamidom. Korekcijski faktor se izračuna tako da se, za svaki glikan pri svakoj koncentraciji, podijeli udio početne mase IgG-a čiji su glikani injektirani na kolonu u analizi s RapiFluor-MS-om s udjelom početne mase IgG-a čiji su glikani injektirani na kolonu u analizi s prokainamidom. Količina tj. odgovarajuće izražen intenzitet neobilježenih glikana se dobije dijeljenjem apsolutnog intenziteta neobilježenih glikana u analizi s RapiFluor-MS-om s korekcijskim faktorom.

ProA vs Rapi								
ime glikana	količina (µg)	0,5	1	5	10	25	50	75
FA2	IS	1,1	1,9	1,4	1,6	1,8	1,5	1,5
	ST	1,2	1,7	0,7	0,8	1,5	1,6	1,6
FA2G1	IS	1,7	1,1	0,7	0,7	0,9	0,6	0,8
	ST	2,7	1,2	0,9	0,5	0,8	0,7	0,8
FA2G1	IS	1,8	1,9	1,0	1,2	1,9	1,4	1,5
	ST	2,0	1,8	1,6	1,1	1,9	1,4	1,6
FA2G2	IS	0,7	0,9	0,7	1,0	1,4	1,3	1,5
	ST	0,9	0,7	0,8	0,9	1,6	1,6	1,7
FA2G2S1	IS	0,5	0,6	0,5	0,6	0,8	0,8	1,0
	ST	0,5	0,6	0,5	0,4	0,8	0,8	0,9
FA2G2S2	IS	2,0	1,1	1,0	0,6	1,4	1,0	1,0
	ST	1,3	0,9	2,1	0,9	2,0	1,5	1,3
FA2BG2S2	IS	2,6	2,9	1,4	1,4	1,2	0,9	0,9
	ST	3,9	2,5	1,0	0,9	2,1	1,3	1,0

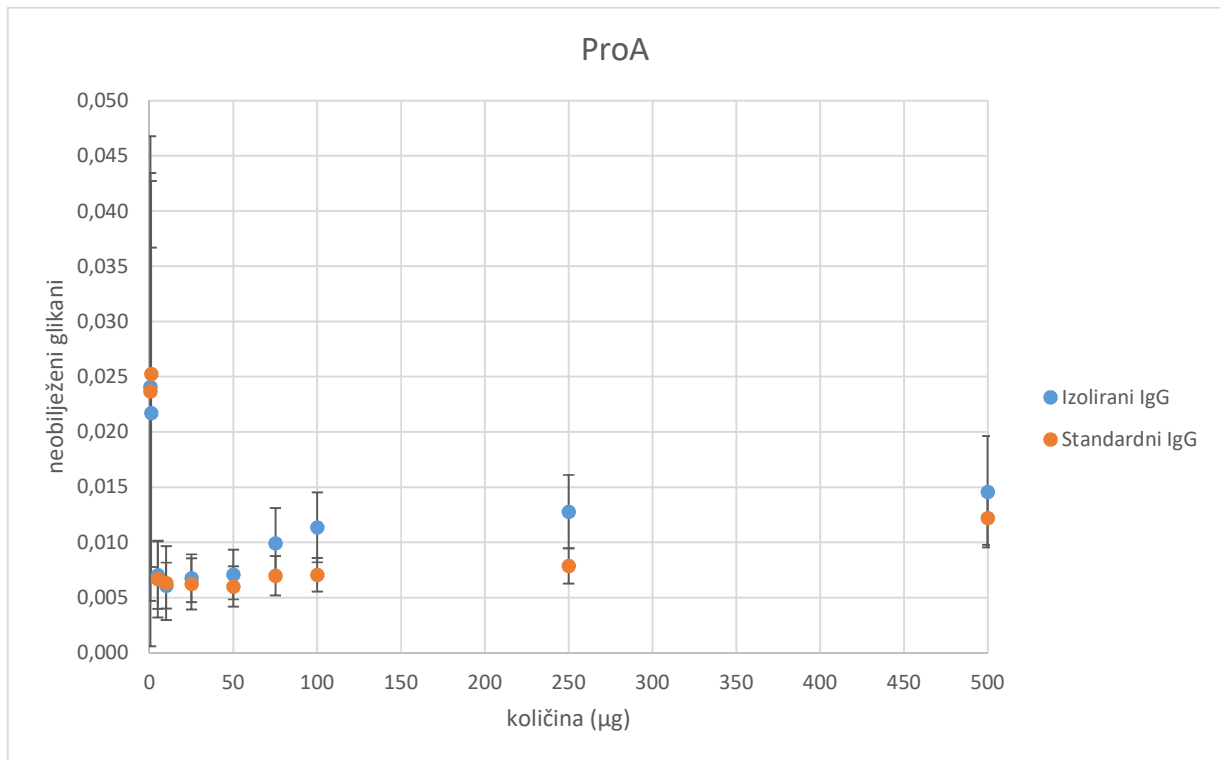
**Tablica 10.** Omjeri apsolutnih intenziteta slobodnih N-glikana koji se nisu obilježili prokainamidom i onih neobilježenih RapiFluor-MS-om. „IS“ označava izolirani, a „ST“ standardni IgG.

Usporedbom intenziteta neobilježenih glikana kod 2-aminobenzamida i prokainamida dobivaju se omjeri u prosjeku 1,1 za uzorke standardnog i izoliranog IgG-a, a usporedbom intenziteta kod prokainamida i RapiFluor-MS-a 1,2 za izolirani te 1,3 za standardni uzorak IgG-a. Dakle, efikasnost vezanja fluorescentnih boja za N-glikane je praktički jednaka jer su svi omjeri približno jednaki 1, što znači da na rezultate analize, odnosno različite intenzitete pikova, efikasnost vezanja nema značajan utjecaj.

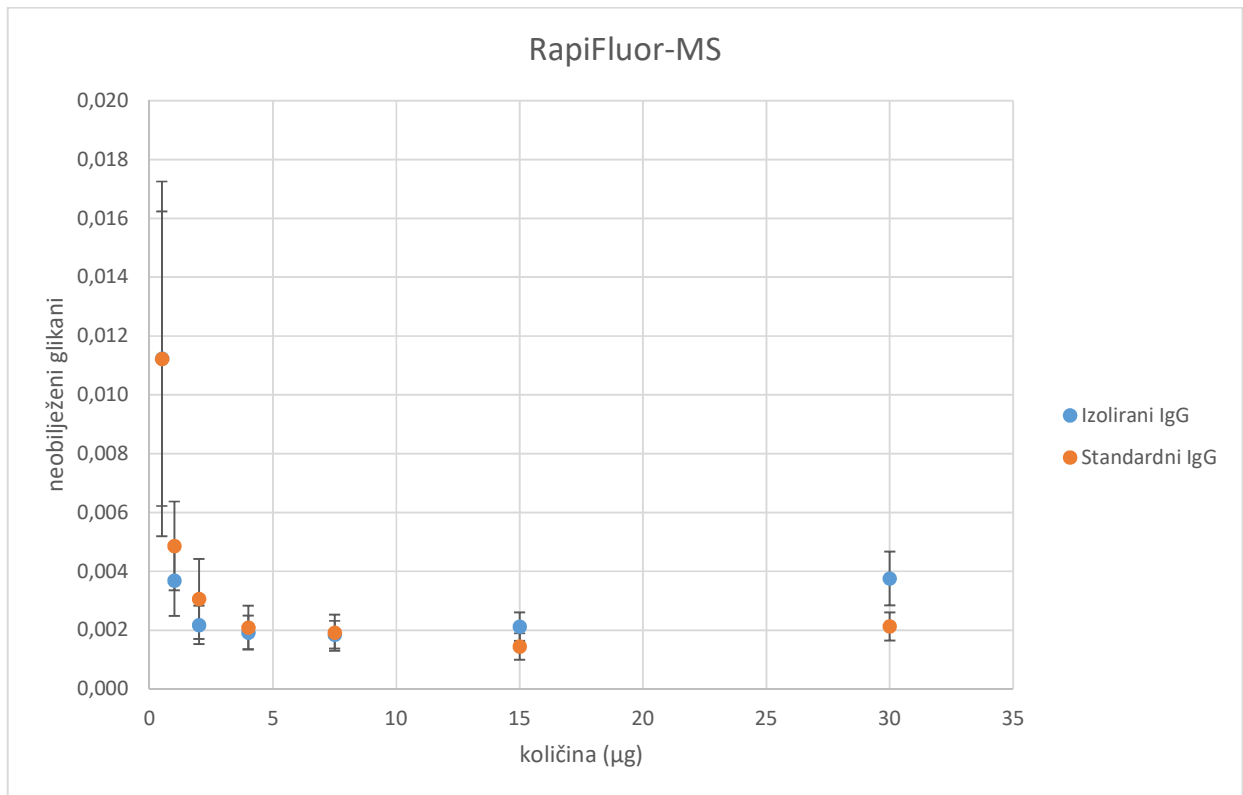
Također, za svaku boju posebno je nađen raspon količina IgG-a gdje je obilježavanje bilo najbolje, odnosno gdje se najveći postotak svih glikana obilježio, odnosno gdje imamo najmanji postotak neobilježenih glikana. Rezultati su prikazani grafički za svaku boju, istovremeno za uzorak izoliranog i standardnog IgG-a (Graf 1., 2. i 3.). Kod 2-aminobenzamida efikasnost obilježavanja je najveća u rasponu početnih količina IgG-a 25-50 µg, kod prokainamida 5-50 µg te za RapiFluor-MS u rasponu od 2-15 µg. Na najvećim količinama, efikasnost obilježavanja je malo slabija, dok je na najmanjim ta slabija efikasnost vrlo vjerojatno samo prividna jer su intenziteti preniski pa je preciznost jako loša što se može vidjeti i po velikim standardnim devijacijama za ProA i RFMS.



**Graf 1.** Grafički prikaz udjela neobilježenih glikana u ovisnosti o količini IgG-a u uzorku pri analizi efikasnosti obilježavanja N-glikana 2-aminobenzamidom



**Graf 2.** Grafički prikaz udjela neobilježenih glikana u ovisnosti o količini IgG-a u uzorku pri analizi efikasnosti obilježavanja N-glikana prokainamidom. Glikan A2 nije uzet u obzir zbog prevelikog odstupanja.



**Graf 3.** Grafički prikaz udjela neobilježenih glikana u ovisnosti o količini IgG-a u uzorku pri analizi efikasnosti obilježavanja N-glikana RFMS-om

## 5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da različiti faktor odaziva intenziteta N-glikana obilježenih fluorescentnim bojama 2-aminobenzamidom, prokainamidom i RapiFluor-MS-om ne ovisi toliko o efikasnosti kemijskog vezanja boje za glikane, koliko o ostalim čimbenicima poput efikasnosti ionizacije i fluorescenciji. Efikasnost kemijskog vezanja boje za glikane se procjenjivala usporedbom apsolutnih intenziteta neobilježenih glikana, a svi omjeri su približni vrijednosti 1, što znači da je efikasnost vezanja otprilike ista za sve tri ispitivane fluorescentne boje. Također, raspon količina u mikrogramima polaznog IgG-a u uzorku pri kojima je obilježavanje N-glikana najefikasnije, odnosno pri kojima je postotak neobilježenih glikana najmanji iznosi 25-50 µg za 2-aminobenzamid, kod prokainamida je 5-50 µg te za RapiFluor-MS se kreće u rasponu od 2-15 µg. Rezultatima je potvrđeno da je s obzirom na osjetljivost 2-aminobenzamid najlošiji, a RapiFluor-MS najbolji izbor za obilježavanje N-glikana u njihovoj analizi masenim spektrometrom.

## 6. LITERATURA

1. Ahuja Satinder, Scypinski Stephen, Handbook of modern pharmaceutical analysis, Academic Press, San Diego, 2010.
2. Buszewski B. and Noga S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 402
3. Cooper G, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup, treće izdanje, Medicinska naklada Zagreb, 2004, 305-307
4. Darsow Kai, Bartel Sebastian, Yves Muller, Harald Lange. Glycosylation Analysis by Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)-N-Glyco Mapping of The ZP-Domain of Murine TGFR-3, 2010, <http://www.chromatographyonline.com>, pristupljeno 12.2.2018.
5. GlycoProfile™ Labeling Kits: Useful Fluorescent Dyes for Enhanced Glycan Analysis, *BioFiles* 2007, 2.1, 14, <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 05.02.2018.
6. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25, 267–78
7. Han Liang and Catherine E. Costello. Mass Spectrometry of Glycans. *Biochemistry (Mosc)*. 2013 Jul; 78(7): 710–720
8. Huffman, JE et al. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research, *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13
9. Kailemia Muchena J., Ruhaak L. Renee, Carlito B. Lebrilla, I. Jonathan Amster. Oligosaccharide Analysis By Mass Spectrometry: A Review Of Recent Developments. *Anal Chem*. 2014 Jan 7; 86(1): 196–212
10. Lauber Matthew A., Ying-Qing Yu, Darryl W. Brousmiche, Zhengmao Hua, Stephan M. Koza, Paula Magnelli, Ellen Guthrie, Christopher H. Taron, and Kenneth J. Fountain. Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent that Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection. *Analytical Chemistry* 2015, 87 (10), 5401-5409

11. Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans – the third revolution in evolution, *Frontiers in genetics*, 2014, 5, 1-5
12. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I., *Immunology*, 7th edition, Elsevier, 2009., 59-86
13. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126, 855-867
14. Reading Eamonn, Hopper Jonathan T.S., Robinson Carol V.. *Mass Spectrometry of Intact Membrane Protein Complexes*. *Nature Protocol*, March 2013., Vol.8., No.4., 640
15. Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397
16. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of Biological Chemistry* July 26,2002, 277, 26733-26740
17. Structure, function and importance of carbohydrates, <https://www.neb.com/>, pristupljeno 02.02.2018.
18. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2009. At <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>
19. Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T., IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Frontiers in Immunology*, 2014, 5
20. Watson, David G.: *Pharmaceutical analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, Elsevier, Oxford, 2012. 9.poglavlje
21. Zauner G, Deelder A M, Wuhrer M. Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*, 2011, 32, 3456–3466



## 7. SAŽETAK / SUMMARY

### 7.1. SAŽETAK

Glikozilacija je složena kotranslacijska i postranslacijska reakcija modifikacije posredovana enzimima u kojoj se šećerne strukture kovalentno vežu na proteine i lipide, a glikani su, kao strukturni dio glikoproteina, od iznimne su važnosti za njihovu funkciju i pravilnu strukturu te se danas sve više i više istražuju. Jedna od tehnika u analizi glikana koja se često koristi je tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim reakcijama (HILIC-UPLC) spregnuta s masenom spektrometrijom. Kako bi se glikani mogli pouzdano detektirati, njihova analiza zahtijeva fluorescentno obilježavanje.

U ovom radu se uspoređuju efikasnosti obilježavanja N-glikana imunoglobulina G trima fluorescentnim bojama - 2-aminobenzamidom, prokainamidom i RapiFluor-MS-om. Ispituje se koliki utjecaj na rezultate analize ima sama uspješnost vezanja fluorescentne boje na N-glikane bez obzira na njenu sposobnost ionizacije. Uspoređujući omjere apsolutnih intenziteta neobilježenih glikana u uzorcima dobivenih analizom masenim spektrometrom (ESI-QToF-MS), zaključuje se da je efikasnost vezanja fluorescentnih boja za N-glikane praktički jednaka jer su svi omjeri približno jednaki 1, što znači da na rezultate analize, odnosno različite intenzitete pikova, efikasnost vezanja nema značajan utjecaj. Također, raspon količina u mikrogramima polaznog IgG-a u uzorku pri kojima je obilježavanje N-glikana najefikasnije iznosi 25-50  $\mu\text{g}$  za 2-aminobenzamid, kod prokainamida je 5-50  $\mu\text{g}$  te za RapiFluor-MS se kreće u rasponu od 2-15  $\mu\text{g}$ . Rezultatima je potvrđeno da je s obzirom na osjetljivost 2-aminobenzamid najlošiji, a RapiFluor-MS najbolji izbor za obilježavanje N-glikana u njihovoj analizi masenim spektrometrom.

## 7.2. SUMMARY

Glycosylation is a complex cotranslational and posttranslational reaction of enzyme-mediated modification, in which the sugar structures covalently bind to proteins and lipids, and glycans, as a structural part of glycoproteins, are of utmost importance for their function and proper structure and are being investigated more and more today. One of the most frequently used glycan analytical techniques is ultra performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions (HILIC-UPLC) coupled with mass spectrometry. In order for the glycans to be detected, their analysis requires fluorescence labeling.

This Master thesis compares the efficacy of labeling immunoglobulin G's N-glycans with three fluorescent dyes- 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS. It examines how much impact on the results of the analysis has the success of binding fluorescent dye to N-glycans, irrespective of its ability to ionize. Comparing the absolute intensity ratios of unlabeled glycans in samples obtained by mass spectrometry (ESI-QToF-MS), it is concluded that the efficacy of fluorescent dye binding for N-glycans is practically identical, since all ratios are approximately equal to 1, meaning that there is no significant influence of binding efficacy on the results of analysis regarding different peak intensities. Also, the range of the amount of starting IgG in the sample, in which the N-glycan labeling is the most efficient, is 25-50 µg for 2-aminobenzamide, in procainamide is 5-50 µg and for RapiFluor-MS is ranging from 2 to 15 g. These results confirm that, considering sensitivity, 2-aminobenzamide is the worst and RapiFluor-MS is the best choice for labeling N-glycans in their mass spectrometric analysis.

## 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

### USPOREDBA EFIKASNOSTI OBILJEŽAVANJA N-GLIKANA IMUNOGLOBULINA G 2-AMINOBENZAMIDOM, PROKAINAMIDOM I RAPIFLUOR-MS-OM

Mirna Brkušić

#### SAŽETAK

Glikozilacija je složena kotranslacijska i postranslacijska reakcija modifikacije posredovana enzimima u kojoj se šećerne strukture kovalentno vežu na proteine i lipide, a glikani su, kao strukturni dio glikoproteina, od iznimne su važnosti za njihovu funkciju i pravilnu strukturu te se danas sve više i više istražuju. Jedna od tehnika u analizi glikana koja se često koristi je tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim reakcijama (HILIC-UPLC) spregnuta sa masenim spektrometrom. Kako bi se glikani mogli detektirati, njihova analiza zahtijeva fluorescentno obilježavanje. U ovom radu se uspoređuju efikasnosti obilježavanja N-glikana imunoglobulina G trima fluorescentnim bojama- 2-aminobenzamidom, prokainamidom i RapiFluor-MS-om. Ispituje se koliki utjecaj na rezultate analize ima sama uspješnost vezanja fluorescentne boje na N-glikane bez obzira na njenu sposobnost ionizacije. Uspoređujući omjere apsolutnih intenziteta neobilježenih glikana u uzorcima dobivenih analizom masenim spektrometrom (ESI-QToF-MS), zaključuje se da je efikasnost vezanja fluorescentnih boja za N-glikane praktički jednaka jer su svi omjeri približno jednaki 1, što znači da na rezultate analize, odnosno različite intenzitete pikova, efikasnost vezanja nema značajan utjecaj. Također, raspon količina u mikrogramima polaznog IgG-a u uzorku pri kojima je obilježavanje N-glikana najefikasnije iznosi 25-50 µg za 2-aminobenzamid, kod prokainamida je 5-50 µg te za RapiFluor-MS se kreće u rasponu od 2-15 µg. Rezultatima je potvrđeno da je s obzirom na osjetljivost 2-aminobenzamid najlošiji, a RapiFluor-MS najbolji izbor za obilježavanje N-glikana u njihovoj analizi masenim spektrometrom.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 14 grafičkih prikaza, 10 tablica i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: glikozilacija, N-glikani, 2-aminobenzamid, prokainamid, RapiFluor-MS, HILIC-UPLC, MS

Mentor: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj, 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Study: Pharmacy

Department of Biochemistry and Molecular biology

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

### COMPARISON OF THE IMMUNOGLOBULIN G'S N-GLYCANS LABELLING EFFICACY WITH 2-AMINOBENZAMIDE, PROCAINAMIDE AND RAPIFLUOR-MS

**Mirna Brkušić**

#### SUMMARY

Glycosylation is a complex cotranslational and posttranslational reaction of enzyme-mediated modification, in which the sugar structures covalently bind to proteins and lipids, and glycans, as a structural part of glycoproteins, are of utmost importance for their function and proper structure and are being investigated more and more today. One of the most frequently used glycan analytical techniques is ultra performance liquid chromatography based on hydrophilic reactions (HILIC-UPLC) coupled with mass spectrometry. In order for the glycans to be detected, their analysis requires fluorescence labeling. This Master thesis compares the efficacy of labeling immunoglobulin G's N-glycans with three fluorescent dyes- 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS. It examines how much impact on the results of the analysis has the success of binding fluorescent dye to N-glycans, irrespective of its ability to ionize. Comparing the absolute intensity ratios of unlabeled glycans in samples obtained by mass spectrometry (ESI-QToF-MS), it is concluded that the efficacy of fluorescent dye binding for N-glycans is practically identical, since all ratios are approximately equal to 1, meaning that there is no significant influence of binding efficacy on the results of analysis regarding different peak intensities. Also, the range of the amount of starting IgG in the sample, in which the N-glycan labeling is the most efficient, is 25-50 µg for 2-aminobenzamide, in procainamide is 5-50 µg and for RapiFluor-MS is ranging from 2 to 15 g. These results confirm that, considering sensitivity, 2-aminobenzamide is the worst and RapiFluor-MS is the best choice for labeling N-glycans in their mass spectrometric analysis.

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

Thesis includes: 37 pages, 14 figures, 10 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: glycosylation, N-glycans, 2-aminobenzamide, procainamide, RapiFluor-MS, HILIC-UPLC, MS

Mentor: **Olga Gornik, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Olga Gornik, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ana Mornar Turk Ph.D.**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2018.