

Razvojne promjene N-glikana neuroglikoma korteksa mozga štakora

Salopek, Matija

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:163:181727>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Matija Salopek

**Razvojne promjene N-glikana neuroglikoma
korteksa mozga štakora**

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 u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom prof.dr.sc Gordana Lauca.

Posebnu zahvalu upućujem prof. dr. sc. Gordanu Laucu na svesrdnoj podršci i voditeljstvu tokom izvođenja i pisanja ovog projekta.

Zahvaljujem se ostalim djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju na pomoći i ugodnom društvu, posebice dr.sc. Tomi Keseru.

Od srca hvala dr.sc Thomasu S. Klariću na svesrdnoj pomoći i uloženom vremenu, bez kojeg bi kvaliteta ovog rada i količina usvojenog znanja bila znatno niža.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 GLIKOKONJUGATI	2
1.2 ULOGE GLIKANA	2
1.2.1 Stanične interakcije	2
1.2.2 Kontrola kvalitete i poluvremena cirkulirajućih i membranskih proteina	3
1.2.3 Modulacija funkcije glikoproteina.....	3
1.2.4 Glikani u bolesti	3
1.3 IZVORI RAZNOLIKOSTI GLIKANA	4
1.3.1 Monosaharidi	4
1.3.2 Ključni čimbenici raznolikosti.....	5
1.4 N-GLIKOZILACIJA PROTEINA	6
1.4.1 Kratki pregled.....	6
1.4.2 Početna sinteza oligosaharida i aktivnost oligosahariltransferaze.....	7
1.4.3 Obrada i sazrijevanje glikoproteina.....	8
1.4.4 Mikroheterogenost glikoproteina	9
1.5 POSEBNOSTI N-GLIKOZILACIJE PROTEINA MOZGA	10
1.5.1 Uloge N-glikana u živčanom sustavu	10
1.5.2 Selekcija N-acetilneuraminske kiseline	11
1.6 STRUKTURNA ANALIZA N-GLIKANA	12
1.6.1 Metode deglikozilacije.....	13
1.6.2 Derivatizacija	13
1.6.3 Pročišćavanje i ukoncentriravanje.....	13
1.6.4 Separacijske tehnike	14
1.6.5 Masena spektrometrija	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1 MATERIJALI	18
3.2 UZORCI	21
3.3 PRIPREMA N-GLIKANA MOZGA ZA UPLC-ESI-MS ANALIZU	21
3.3.1 Homogenizacija tkiva.....	22
3.3.2 Izolacija i pročišćavanje proteina	22
3.3.3 Enzimsko oslobađanje N-glikana PNGazom F i pročišćavanje slobodnih N-glikana.....	23
3.3.4 Fluorescentno obilježavanje reducirajućih krajeva slobodnih N-glikana i pročišćavanje	24
3.4. HILIC-UPLC-FLR ANALIZA PROKAINAMIDOM OBILJEŽENIH N-GLIKANA	26
3.5 PGC PROČIŠĆAVANJE I KONCENTRIRANJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA	27

3.6 HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS/MS ANALIZA PROKAINAMIDOM OBILJEŽENIH N-GLIKANA.....	27
3.7 ODREĐIVANJE PRETPOSTAVLJENIH STRUKTURA N-GLIKANA.....	28
3.8 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA, PRIKAZI REZULTATA.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1 REZULTATI KROMATOGRFSKE ANALIZE I MASENE SPEKTROMETRIJE.....	29
4.2 ODREĐIVANJE <i>N-GLIKOPROFILA</i>	30
4.3 UDIO OLIGOMANOZNIH STRUKTURA	41
4.4 SPECIFIČNOSTI FOSFORILIRANIH N-GLIKANA PRI SUDAROM IZAZVANOJ DISOCIJACIJI (CID)	42
4.5 REZULTATI ANALIZE GLAVNE KOMPONENTE	45
4.6 STATISTIČKI ZNAČAJNE RAZLIKE IZMEĐU SKUPINA.....	46
4.7 BIOLOŠKO TUMAČENJE STATISTIČKI ZNAČAJNIH RAZLIKA	54
4.8 KVALITATIVNE RAZLIKE IZMEĐU SKUPINA.....	56
4.9 OSVRT NA KORIŠTENE METODE.....	58
5. ZAKLJUČCI.....	59
6. LITERATURA.....	61
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	66
7.1 SAŽETAK.....	66
7.2 SUMMARY	67
8. PRILOZI	68
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. Uvod

Ovo poglavlje daje kratki pregled do sada stečenih znanja i eksperimentalno utvrđenih činjenica, uz poseban osvrt na najznačajnije metode korištene u području glikobiologije. Prije svega, važno je naglasiti što je to glikobiologija i koja je svrha ove relativno mlade moderne znanosti.

Glikobiologija je znanost koja proučava strukturu, biosintezu, biološku ulogu i evoluciju molekula ugljikohidrata (saharida, šećernih lanaca, glikana) i proteine koji služe njihovom prepoznavanju. Proces enzimskog vezanja šećernog lanca za molekulu proteina, proces glikozilacije, danas se smatra jednom od najčešćih post-translacijskih modifikacija proteina (Varki i Kornfeld, 2017). U prilog ovoj tvrdnji ide činjenica da je samo u miša otkriveno više od 2300 različitih N-glikoproteina, sa više od 5000 ukupno dostupnih potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta (Zielinska i sur., 2010). Budući da ugljikohidrati imaju ulogu u svim procesima koji uključuju više od jedne stanice, prema nekim teorijama evolucijska pojava glikoziliranih proteina mogla je biti okidač razvoja višestaničnih organizama, (Lauc i sur., 2014).

Posebna zanimljivost ovog područja proizlazi iz činjenice da relativno mali broj gena (u tipičnom genomu) sudjeluje u sintezi i doradi ovih kompleksnih struktura inherentno važnih za rast, razvoj i normalnu funkciju svih dosad poznatih organizama. Glikani su sekundarni produkti gena, što znači da za razliku od slijeda aminokiselina koje sačinjavaju protein, slijed monosaharidnih jedinica koje sačinjavaju strukturu glikana nije izravno zapisan u genomu. Usto, profil glikozilacije pojedinog organizma, pa čak i svakog tkiva i stanice danog organizma, nije nepromjenjiv već je izrazito dinamičan -- čak i male promjene okolišnih čimbenika dovode do značajnih strukturnih raznolikosti (prema Varki i Kornfeld, 2017).

1.1 Glikokonjugati

O glikanima se obično raspravlja u kontekstu glikokonjugata - makromolekula koje se sastoje od aglikona (protein ili lipid) i glikana koji je za tu strukturu vezan glikozidnom vezom pri čemu glikan može biti mono- ili oligosaharid (Seeberger, 2017).

Glikoprotein je molekula sačinjena od proteinske osnovice za koju je N- ili O-glikozidnom vezom kovalentno vezan šećerni lanac. U slučaju N-glikozilacije enzimskim djelovanjem nastaje kovalentna veza između N-acetilglukozamina (GlcNAc) šećernog lanca i bočnog ogranka aminokiseline asparagina (Asn) unutar konsenzusne peptidne sekvence **Asn-X-Ser/Thr** gdje je *X* bilo koja aminokiselina osim prolina. U slučaju O-vezanih šećerinih lanaca (O-glikani) enzimskim djelovanjem nastaje veza između bočnih ograna serina (Ser) ili treonina (Thr) proteinske osnovice i N-acetilgalaktozamina (GalNAc) šećernog lanca (Varki i Kornfeld, 2017).

Od ostalih često proučavanih skupina glikokonjugata važno je spomenuti glikozilfosfatidilinozitolna sidra (GPI-sidra), glikosfingolipide (šećerni lanac vezan za molekulu ceramida) i gangliozide (anionski glikolipid koji sadrži jednu ili više vezanih sijalinskih kiselina) (Varki i Kornfeld, 2017).

1.2 Uloge glikana

Dosad nije poznat nijedan organizam koji može funkcionirati bez glikana. Jednako tako, zna se da je potpuni izostanak sposobnosti glikozilacije embrioletalan (Lauc i sur., 2014). Točnu ulogu pojedine glikanske strukture nemoguće je sa sigurnošću odrediti, stoga što se specifična glikanska struktura u proučavanom organizmu može pojavljivati u različitim razdobljima ili na različitim lokacijama. U širem smislu, uloge glikana uključuju procese specifičnog prepoznavanja i posredovanja bioloških procesa od kojih su neki ključni za razvoj, rast, funkciju i sposobnost preživljavanja danog organizma (Varki, 1993).

1.2.1 Stanične interakcije

Većina međustaničnih interakcija i interakcija stanica sa vanstaničnim matriksom ovisna je o glikanima. O ovome svjedoči pojava glikokaliksa - sloja ugljikohidrata vezanih za membranske glikoproteine, proteoglikane i glikolipide koji obavija vanjsku površinu svake stanice. Glikokaliks je bitno većeg obujma od same stanične membrane. Glikani stanične površine služe kao ligandi proteinima koji ih prepoznaju i vežu, a najbolji primjer ove skupine proteina predstavljaju lektini koje karakterizira visoka specifičnost za određene glikanske strukture. Interakcije lektina i glikana igraju ključnu ulogu u staničnoj adheziji, migraciji,

prijenosu signala, prepoznavanju vlastitih tkiva, oplodnji jajne stanice, upalnom odgovoru i imunom odgovoru naspram patogena (Krištić i Lauc, 2017).

1.2.2 Kontrola kvalitete i poluvremena cirkulirajućih i membranskih proteina

Prvi koraci obrade N-glikoproteina glikozidazama endoplazmatskog retikuluma (ER) (uklanjanje 3 glukoze i specifičnih manoza) mogu igrati važnu ulogu u pravilnom smatanju glikoproteina. Postoje naznake da određene strukture N-glikana mogu promicati pravilno smatanje glikoproteina, dok se drugim tipovima struktura nepravilno smotani glikoproteini mogu označavati za degradaciju (Roth i sur., 2010). Različitost terminalnih šećernih ostataka i različit stupanj grananja N-glikana vezanih za glikoprotein može utjecati na vrijeme poluživota cirkulirajućih i membranskih proteina. U slučaju membranskih proteina ova pojava vidljiva je kod citokina, receptora za faktore rasta i receptora za neuroprijenosnike. (Krištić i Lauc, 2017). Izlučivanje proteina iz organizma može biti bitno promijenjeno, što je pokazano u slučaju folikul stimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Smatra se da cirkulirajući proteini kod kojih je sijalinizacija terminalnih šećera obimnija od sulfatacije pokazuju dulje vrijeme poluživota u plazmi (Krištić i Lauc, 2017).

1.2.3 Modulacija funkcije glikoproteina

U literaturi su najbolje opisani slučajevi modulacije efektorske uloge imunoglobulina G (IgG). IgG posjeduje dva evolucijski očuvana mjesta glikozilacije unutar Fc-regije. Pokazano je da modifikacija N-glikozilacije IgG mijenja konformaciju molekule IgG čime se mijenja afinitet vezanja IgG za različite tipove receptora za Fc-regiju (FcR) djelovanjem na koje IgG izvršava svoju efektorsku ulogu. Smatra se da fukozilacija sržne strukture vezane na Asn297 Fc-regije dovodi do smanjenog vezanja IgG na Fc γ RIIIa što za posljedicu ima smanjenje razine stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC). Također, ovisno o profilu glikozilacije IgG može djelovati kao pro- ili protuupalna molekula. U slučaju O-glikozilacije važno je spomenuti reverzibilnu reakciju kojom se na Ser ili Thr proteina veže GlcNAc (O-GlcNAc). Ova modifikacija je u kompeticiji s reakcijom fosforilacije te se njome može mijenjati razina aktivnosti proteina (Krištić i Lauc, 2017).

1.2.4 Glikani u bolestima

Promjene profila glikozilacije zabilježene su u mnogim fiziološkim stanjima, kao što je primjerice trudnoća (Ruhaak i sur., 2014), ali i u mnogim kroničnim bolestima. Najviše istraživanja postoji na području raka, neurodegenerativnih bolesti, metaboličkih bolesti (dijabetes), upalnih te autoimunih i infektivnih bolesti. Zbog uključenosti glikana u ova stanja smatra se da je opravdana uporaba glikana kao markera tijekom bolesti ili odgovora na terapiju,

ili kao markera podložnosti određenim kroničnim bolestima (Krištić i sur, 2017). Također, smatra se da postoji povezanost između plazmatskog profila N-glikozilacije i dobi, dugovječnosti i općeg zdravlja pojedinca (Ruhaak i sur., 2011).

1.3 Izvori raznolikosti glikana

1.3.1 Monosaharidi

Monosaharidi su jednostavni ugljikohidrati (polihidroksialdehidi, polihidroksiketoni) opće formule $C_x(H_2O)_n$, gdje je n cijeli broj između 3 i 9, koje je nemoguće hidrolizirati u jednostavniji oblik. Ove kiralne molekule (ukupni broj stereoizomera iznosi 2^k , gdje je k broj asimetričnih ugljikovih atoma) karakterizira lanac hidroksimetilenskih skupina koji na jednom kraju završava hidroksimetilnom skupinom, a na drugom aldehidnom skupinom (C-1 ugljikov atom) ili α -hidroksi ketonskom skupinom (C-2 ugljikov atom). Prema ovim svojstvima monosaharidi se dijele na u aldoze i ketoze. (Varki i Kornfeld, 2017; Seeberger, 2017). Ukupna konfiguracija molekule može biti D ili L, ovisno o apsolutnoj konfiguraciji asimetričnog C-atoma najudaljenijeg od karbonilne skupine. Većina prirodnih monosaharida kralježnjaka javlja se u D-konfiguraciji, s izuzetkom L-fukoze (Fuc) i iduronske kiseline (IdoA) (Seeberger, 2017). U otopini monosaharidi postoje u ravnoteži cikličkog i acikličkog oblika. Formiranjem prstena, monosaharidi dobivaju dodatni asimetrični centar koji se naziva anomerni centar. Prema konfiguraciji anomernog centra mogu se prepoznati α ili β anomeri. (Seeberger, 2017).

Monosaharidi se povezuju glikozidnom vezom (reakcija poluacetala s alkoholnom skupinom), koja nastaje između anomernog C-atoma jednog od monosaharida i neke od hidroksilnih skupina drugog monosaharida, budući da bilo koja slobodna -OH skupina monosaharida može sudjelovati u nastanku veze s anomernim centrom drugog monosaharida znači da jedan monosaharid može biti povezan s više drugih monosaharida što daje obrasce grananja koji nisu prisutni kod proteina ili DNA. Osim toga, glikozidna veza može nastati između monosaharida i aminokiselina ili lipida koji posjeduju slobodnu hidroksilnu skupinu formirajući time O-glikozidnu vezu (Seeberger, 2017). Reakcijom monosaharida i aminokiselina ili lipida koji posjeduju slobodnu amino skupinu, kao što je to kod amidne skupine bočnog ogranka asparagina dolazi do formiranja N-glikozidne veze (Varki i Kornfeld, 2017). Povezivanjem monosaharida glikozidnom vezom nastaju oligosaharidi (< 20 monosaharida) ili polisaharidi (>20 monosaharida). Oligosaharide karakterizira polarnost strukture: kraj oligosaharida koji nosi slobodni anomerni centar i zadržava reaktivnost

aldehida naziva se reducirajući kraj, dok se drugi kraj naziva nereducirajućim (Seeberger, 2017).

Usprkos postojanju više stotina različitih prirodnih monosaharida, samo mali broj skupina monosaharida pojavljuje se u stanicama kralježnjaka. Pronađene skupine uključuju neutralne šećere s 5 ili 6 C-atoma (pentoze, heksoze), heksozamine (heksoze s amino skupinom koja može biti N-acetilirana, npr GlcNAc), 6-deoksiheksoze (L-fukoza), uronske kiseline (heksoze s karboksilnom skupinom na C-6 atomu), nonulosonske kiseline (kiselni šećeri s 9 C-atoma, npr N-acetilneuraminska kiselina - Neu5Ac, NeuAc) (Varki i Kornfeld, 2017). Često prisutne monosaharidne jedinice s njihovim kraticama i simboličnim prikazima prikazuje **Slika 1.1**.

● Galaktoza (Gal)	■ N-acetilglukozamin (GlcNAc)
● Glukoza (Glc)	■ N-acetilgalaktozamin (GalNAc)
● Manoza (Man)	◇ Glukuronska kiselina (GlcA)
▲ Fukoza (Fuc)	◆ Sialinska kiselina (Sia, Neu5Ac, NeuAc)

Slika 1.1 Simbolični prikazi često prisutnih monosaharida. Ovdje navedena notacija kotištena je u daljnjem tekstu.

1.3.2 Ključni čimbenici raznolikosti

Strukturnu raznolikost glikana uvjetuje više različitih čimbenika od kojih većina proizlazi iz kemijskih svojstava monosaharida. Važni čimbenici raznolikosti su: kvantitativni i kvalitativni sastav monosaharida koji sačinjavaju šećerni lanac, kombinacije niza monosaharida unutar šećernog lanca, položaj veze između susjednih monosaharida - mogućnost grananja strukture, modifikacije strukture monosaharida (oksidacija, sulfatacija, fosforilacija, N-acetilacija, metilacija, laktonizacija) i tip glikozidne veze s aglikonom - formiranje N- ili O-glikozidne veze. Strukturna različitost glikokonjugata može biti dodatno uvjetovana diferencijalnom glikozilacijom - u vidu izostanka glikozilacije dostupnog veznog mjesta ili prisutnosti različitih glikanskih struktura na istom veznom mjestu pri čemu mogu nastati različite glikoforme glikoproteina. (Varki i Kornfeld, 2017; Seeberger, 2017; Prestegard i sur. 2017).

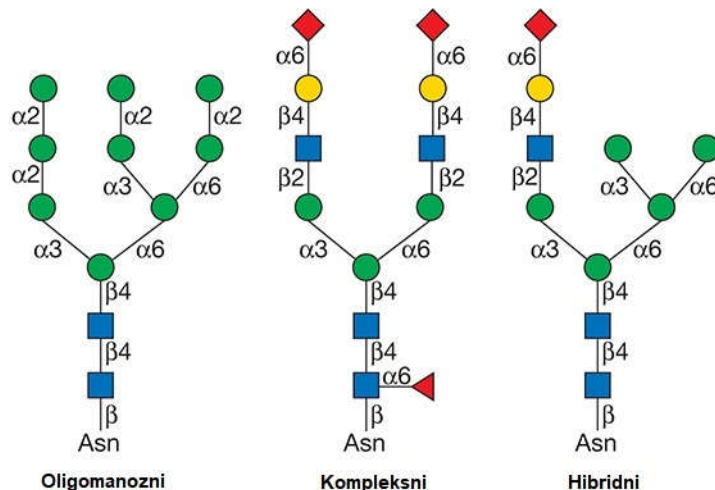
1.4 N-glikozilacija proteina

1.4.1 Kratki pregled

N-glikozilacija proteina enzimski je proces formiranja kovalentne veze između N-acetilglukozamina (GlcNAc) šećernog lanca i bočnog ogranka aminokiseline asparagina unutar konsenzusne peptidne sekvence Asn-X-Ser/Thr gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Ukoliko je aminokiselina "X" kiselina (asparaginska ili glutaminska kiselina) efikasnost vezanja može biti niža, a u slučaju fenilalanina efikasnost vezanja obično je povećana (Stanley i sur., 2017). U nekim slučajevima N-glikozilacija se događa na mjestima Asn-X-Cys (Takeshi i sur., 2011), dok su druge aminokiseline na položaju 3 konsenzusne sekvence rijetke s udjelom 1-3% (Sun i Zhang, 2015; Zielinska i sur., 2012). Glikozilacija može biti spriječena zbog konformacijskih promjena prilikom smatanja proteina, što će reći da je prisutnost konsenzusne sekvence nužan, ali ne i dovoljan uvjet za uspješnu glikozilaciju. Danas se smatra da oko 70% proteina sadrži N-X-S/T konsenzusnu sekvencu te da je oko 70% dostupnih konsenzusnih sekvenci zapravo glikozilirano (Stanley i sur., 2017). Većina potencijalnih glikozilacijskih mjesta nalazi se unutar regija proteina bogatih β -naboranim pločama (Zielinska i sur., 2012).

Svi eukariotski N-glikani sadrže zajedničku sržnu strukturu, **Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr**, te se mogu podijeliti u tri različite skupine. Prvu skupinu čine *oligomanozni* N-glikani gdje su na sržnu strukturu dodane isključivo manoze. Sljedeću skupinu čine *kompleksni* N-glikani kod kojih je grananje, stvaranje tzv. *antena*, započeto produljivanjem sržne strukture jednim GlcNAc ostatkom. Posljednju skupinu čine *hibridni* N-glikani, gdje se na Man α 1-6 ogranak sržne strukture dodaju isključivo manoze, dok se Man α 1-3 ogranak sržne strukture započinje jednom ili dvije molekule GlcNAc (**Slika 1.2**) (Stanley i sur., 2017).

Sinteza N-glikana odvija se u endoplazmatskoj mrežici (ER) i Golgijevom aparatu i može se podijeliti u dvije etape. Prva etapa sinteze konzervirana je u svih eukariota, a ključni događaj predstavlja prijenos cjelovitog oligosaharida od 14 jedinica (Glc₃Man₉GlcNAc₂) s dolikol-fosfata (Dol-P) na nascentne sekretorne ili transmembranske proteine na luminalnoj strani ER. Druga etapa uključuje enzime, glikozidaze i glikoziltransferaze, koji sudjeluju doradi nereducirajućih krajeva glikana vezanih za protein. Ova faza započinje u lumenu ER i nastavlja se u Golgijevom aparatu na način ovisan o vrsti, staničnom tipu i supstratnom proteinu (Stanley i sur., 2017).



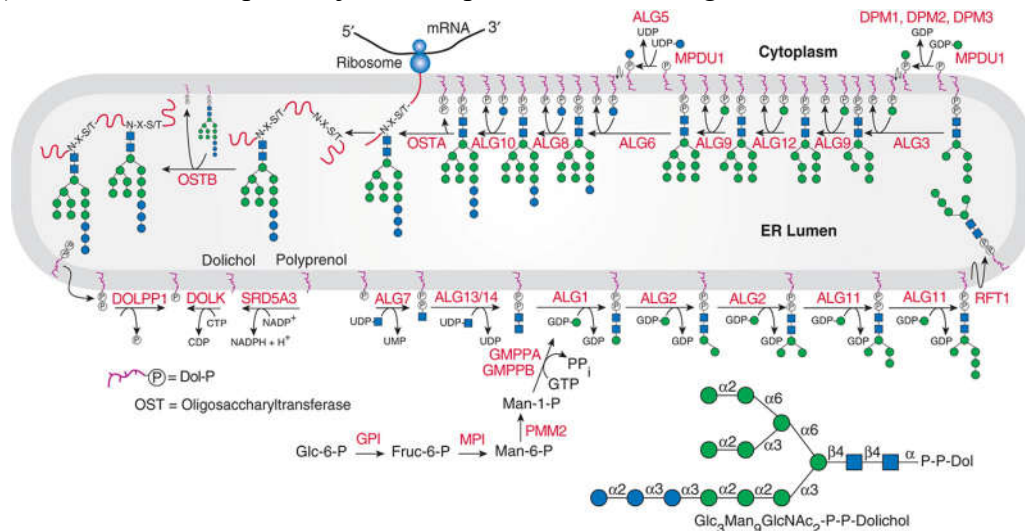
Slika 1.2 Tipovi N-glikana. Slika prikazuje poznate tipove N-glikana. Korištene simbole opsuje **Slika 1.1**. Preuzeto i modificirano prema: (Stanley i sur., 2017).

1.4.2 Početna sinteza oligosaharida i aktivnost oligosahariltransferaze

Sinteza oligosaharidne $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ jedinice započinje na citosolnoj strani ER. Za sintetske korake koji se odvijaju na citostolnoj strani kao izvor monosaharida koriste se aktivtani, nukleotidni šećeri. Geni koji kodiraju konzervirane biosintetske proteine uključene u N-glikozilaciju nalaze se na ALG (Asn-linked glycosylation) lokusu u *Saccharomyces cerevisiae* i imaju homologe u mnogim vrstama. Prvi korak kataliziran je GlcNAc-1-fosfotransferazom (ALG7, DPAGT1 u sisavaca) koja prenosi GlcNAc-1-P s molekule uridil-difosfo aktiviranog šećera (UDP-GlcNAc) na Dol-P, formirajući time molekulu N-acetilglukozamino dolikol-pirofosfata (Dol-PP-GlcNAc). Zatim se na nastala molekula Dol-PP-GlcNAc produljuje dodatkom još jednog GlcNAc i 5 Man u enzimski kataliziranom procesu pri čemu nastaje $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Ovaj prekursor biva prebačen djelovanjem enzima kodiranog genom na RFT1 lokusu u kvasca, tzv *flipazom*, na luminalnu stranu ER, gdje kao izvor aktiviranih monosaharida u daljnjim reakcijama sudjeluju Dol-P-Man i Dol-P-Glc vezani za membranu ER. Enzim MPDU1, vezan za membranu ER, nužan je za nadograđivanje oligosaharidnog prekursora do završne strukture **$\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$** (Stanley i sur., 2017).

Ključni enzim ovog dijela procesa je oligosahariltransferaza, heteropolimerni membranski protein ER sastavljen od 8 podjedinica koji prenosi oligosaharidni prekursor s 14 jedinica s Dol-P na Asn-X-Ser/Thr sekvon proteina u jednom koraku i to u cijelosti ("en bloc") (Aebi, 2013). Ovu reakciju pokreće cijepanje visokoenergetske veze između Dol-P i GlcNAc-P

oligosaharidnog prekurosra u molekuli **Glc3Man9GlcNAc2-P-P-Dol** (Stanley i sur., 2017). **Slika 1.3** Sažeto prikazuje korake početne sinteze N-glikana u ER.



Slika 1.3 Sinteza Dolikol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Dolikol (crveno-ljubičasta zavijena linija) fofat (Dol-P) lociran na citoplazmatskoj strani ER membrane prima GlcNAc-1-P sa UDP-GlcNAc iz citoplazme čime nastaje Dol-P-P-GlcNAc koji biva produljen enzimskim djelovanjem do Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ prije okretanja prema luminalnoj strani (tzv „flip“). Nakon okretanja molekula se produljuje s 4 manoze primljene s Dol-P-Man i 3 glukoze primljene s Dol-P-Glc. Dol-P-Man/Glc sintetiziraju se s citoplazmatske strane ER i također okreću na luminalnu stranu ER membrane. Enzim oligosahariltransferaza (OST) prebacuje GlcNAc₂Man₉Glc₃ s Dol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃ na protein sa konsenzusnom sekvencom N-X-S/T. Enzimi su imenovani prema Human Genome Nomenclature Committee (HGNC) nomenklaturi. Preuzeto iz (Stanley i sur., 2017)

1.4.3 Obrada i sazrijevanje glikoproteina

Nakon "en bloc" prijenosa oligosaharidnog prekurosora Glc3Man9GlcNAc2 na protein započinje faza rane obrade N-glikana u ER-u. Enzim α -glukozidaza I (MOGS) uklanja α 1-2 Glc s oligosaharidnog prekursora, a α -glukozidaza II (GANAB) uklanja dvije α 1-3 Glc. Ovi koraci mogu igrati ulogu u pravilnom smatanju proteina, a ukoliko se na prekursor ponovno doda jedna molekula Glc povećava se vrijeme zadržavanja glikoproteina u ER. Inhibicija ovih enzima *in vitro* kemijskim agensima rezultira pojavom Glc₃Man₇₋₉GlcNAc₂ oligosaharida na zrelih glikoproteinima. Većina glikoproteina koji napuštaju ER ima na sebi vezan Man₈₋₉GlcNAc₂ N-glikan. Man₈GlcNAc₂ struktura nastaje djelovanjem α -manozidaze MAN1B1 koja uklanja α 1-2 Man ostatak s centralne grane Man₈₋₉GlcNAc₂ oligosaharida. U *cis*-Golgi odjeklju α 1-2 manozidaze MAN1A1 i MAN1A2 uklanjaju 3 Man ostatka čime nastaje Man₅GlcNAc₂ struktura. Ova struktura služi kao osnovica za sintezu hibridnih i

kompleksnih N-glikana. U slučaju da glikoprotein stigne do *cis*-Golgijevog odjeljka, enzim endo- α -manozidaza kida glikansku strukturu do $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ - ova struktura se razlikuje od $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ koja nastaje prilikom normalne obrade i transporta glikoproteina kroz ER/Golgi sustav odjeljaka. (Stanley i sur., 2017)

Biosinteza hibridnih i kompleksnih N-glikana započinje u *medijalnom*-Golgijevom odjeljku djelovanjem N-acetilglukozaminil transferaze GlcNAcTI (MGAT1) koja postavlja 1 GlcNAc na C-2 atom α 1-3 Man ostatka u $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ oligosaharidu čime nastaje $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ struktura. Ukoliko se dodatno ne modificira, ova struktura služi kao polazište biosinteze hibridnih oligosaharida. Aktivnošću dvije α -manozidaze tipa II (MAN2A1, MAN2A2) dolazi do uklanjanja α 1-3 i α 1-6 manoznih ostataka sa $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ i formiranja $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ strukture. Djelovanjem enzima MGAT2 na navedenu strukturu se na C-2 položaj α 1-6 manoze postavlja još jedna molekula GlcNAc čime nastaje osnovica *bi-antenarnih* kompleksnih N-glikana. Osnovica *tri-* ili *tetra-antenarnih* kompleksnih N-glikana nastaje djelovanjem enzima GlcNAc-TIV (MGAT4A, MGAT4B) C-4 atom sržne α 1-3Man i djelovanjem GlcNAc-TV (MGAT5) na C-6 atom sržne α 1-6Man GlcNAc-TV (MGAT5). (Stanley i sur., 2017)

Dodatne modifikacije kompleksnih i hibridnih N-glikana sastoje se od dodavanja monosaharida na srž N-glikana - u kralježnjaka, najčešće se događa α 1-6 fukozilacija GlcNAc reducirajućeg kraja djelovanjem α 1-6-fukoziltransferaze (FUT8). Produljenje antena postiže se opetovanim dodavanjem monosaharida. Česti motiv predstavlja $\text{Gal}\beta$ 1-4GlcNAc („LacNAc“) čijim ponavljanjem nastaju poli-LacNAc slijedovi. Modifikacija samih krajeva grana N-glikana naziva se dekoracija ili postavljanje kape (engl. „capping“), a najčešće reakcije uključuju dodavanje sijalinske kiseline (sijalinizacija), fukoze, galaktoze ili GlcNAc u α -položaju. Ove modifikacije obično imaju ulogu u prezentaciji glikana lektinima ili antitijelima, budući da monosaharidi dodani u α -položaju izlaze iz ravnine koju tvore β -vezane poli-LacNAc strukture (Stanley i sur., 2017).

1.4.4 Mikroheterogenost glikoproteina

Pojam mikroheterogenosti glikoproteina odnosi se na postojanje više različitih glikoformi glikoproteina (molekule s identičnom proteinskom osnovicom koje nose različite glikanske strukture) unutar populacije čija pojavnost ovisi o kompleksnoj mreži međudjelovanja različitih čimbenika glikozilacije (Stanley i sur., 2017). Iz ovoga postaje jasno da glikozilacija značajno doprinosi strukturnoj heterogenosti proteoma organizma (Krištić i Lauc, 2017). U istraživanju (Zielinska i sur., 2012) utvrđeno je da većina

glikoproteina ima vezan samo jedan šećerni lanac (oko 50%), dok 20% posjeduje po dva dokazana mjesta glikozilacije, a 25% proteina čak 3 dokazana mjesta glikozilacije. Mikroheterogenost može biti uzrokovana promjenama u konformaciji proteina koje utječu na dostupnost vezanih glikana enzimima ER i Golgijevog aparata, dostupnosti nukleotidnih šećera, brzini transporta glikoproteina kroz ER/Golgi sustav i blizinom potencijalnog glikozilacijskog mjesta transmembranskoj domeni proteina. Također, glikoziltransferaze i glikozidaze ER/Golgi sustava konstantno su u konkurenciji za modifikaciju iste akceptorske (glikanske) strukture, a važno je naglasiti da aktivnost pojedinih glikoziltransferaza zahtjeva prethodnu modifikaciju akceptorske strukture djelovanjem drugih glikoziltransferaza ili glikozidaza (Stanley i sur., 2017).

1.5 Posebnosti N-glikozilacije proteina mozga

1.5.1 Uloge N-glikana u živčanom sustavu

Uključenost N-glikozilacije u razvoj živčanih struktura vidljiva je iz studija prirođenih poremećaja glikozilacije, ova skupina podražaja gotovo uvijek uključuje ozbiljne neurološke abnormalnosti (Freeze i sur., 2012). Proučavanjem sadržaja N-glikana mozga štakora utvrđena je jedinstvenost profila N-glikozilacije tkiva mozga. Prema dostupnim podacima, tkivo mozga pokazuje veću zastupljenost oligomanoznih struktura u usporedbi s drugim tipovima tkiva, pa tako udio $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ iznosi oko 15% ukupnog sadržaja N-glikana što može implicirati postojanje funkcionalne uloge ovih struktura (Chen i sur., 1998). Osim toga, zastupljenost struktura koje posjeduju sijalinsku kiselinu kao jedinu nabijenu komponentu iznosi oko 40% ukupnih N-glikana, s udjelima od 12% za mono-, 10% za di-, 7% za tri- i 7% za tetrasijalinizirane strukture. Smatra se da raznolikost terminalno sijaliniziranih struktura ima ulogu u lektin-ovisnim interakcijama (Zamze i sur., 1998). Važnost kompleksnih i hibridnih struktura N-glikana demonstrirana je eksperimentima koji su uključivali inaktivaciju konzerviranih proteina MGAT1 (N-acetilglukozaminil transferaze GlcNAcTI) i MGAT2 (GlcNAcTII) u mišjim embrijima te ciljanu inaktivaciju ovih enzima u stanicama živčanog sustava. Ovime je utvrđeno da nedostatak MGAT1 (katalizira početni korak sinteze hibridnih N-glikana) u vrijeme embrionalnog razvoja ima letalan ishod, što svjedoči uključenosti hibridnih N-glikana u embriogenezi. Neuralni gubitak MGAT1 rezultira normalnom embriogenezom, međutim, živorođeni organizmi pokazivali su značajne razvojne teškoće koje uključuju smanjenje lokomotorne sposobnosti, pojavu tremora i paralizu. Također, pri neuronalnoj deleciji MGAT1 primijećena je povećana apoptoza živčanih stanica uslijed povećane aktivnosti kaspaze 3, što sugerira uključenost N-glikana u regulaciji procesa

apoptoze. Gubitak MGAT2 za vrijeme embrionalnog razvoja nije letalan, ali živorođeni organizmi pokazuju značajne patološke promjene, što upućuje da razina hibridnih glikana ne može kompenzirati gubitak kompleksnih struktura (MGAT2 katalizira početni korak sinteze kompleksnih N-glikana). Organizmi s neuronalnom delecijom gena koji kodira MGAT2 nisu pokazivali značajne abnormalnosti (Ye i Marth, 2004).

Uloga terminalno modificiranih N-glikana pokazana je studijama (Weinhold i sur., 2005) i (Angata i sur., 2007). Uloga poli- α 2-8-sijalinizacije (poliSia) terminalnih ostataka N-glikana proučavana je u kontekstu neuralne plastičnosti i razvoja. Istaživanjima je utvrđeno da poliSia modifikacija neuronalne stanične adhezijske molekule (NCAM) ima važnu ulogu u regulaciji i koordinaciji ove molekule u vrijeme razvoja živčanog sustava miša. Molekule NCAM kojima nedostaje poliSia modifikacija pokazuju povećanu aktivnost, što rezultira defektima aksonalnog razvoja, progresivnim hidrocefalusom i ranom postnatalnom smrtnosti organizma.

Osim uloge u neuronalnom razvoju, pokazano je da N-glikani imaju svoje mjesto i u funkciji zdravih neuronalnih tkiva. Ovdje je važno spomenuti uključenost u sinaptički prijenos signala, regulaciju aktivnosti ionskih kanala neurona kralježnjaka i modulaciju membranske ekscitabilnosti (Scott i Panin 2014). Zbog opsežnosti ovog područja, uloge pojedinih glikanskih struktura ne mogu biti detaljno obrađene u ovome radu.

1.5.2 Selekcija N-acetilneuraminske kiseline

Pojam sijalinske kiseline može se odnositi na više različitih nonulosonskih kiselina: N-acetilneuraminsku (Neu5Ac, NeuAc), N-glikolilneuraminsku (Neu5Gc, NeuGc) i 2-keto-3-deoksinonsku kiselinu (Kdn). U životinja koje mogu sintetizirati NeuAc i NeuGc (sinteza iz NeuAc) pokazana je velika varijabilnost omjera NeuAc : NeuGc u različitim tkivima, međutim - ono što je zajedničko svim kralježnjacima je izostanak prisutnosti NeuGc u tkivu mozga, odnosno očita selekcija NeuAc u ovoj vrsti tkiva. U tkivu mozga NeuAc nalazi se uglavnom vezana na glangliozide (65%), glikoproteine (32%) dok se samo 3% nalazi nevezano. Eksperimentalnim radom utvrđeno je da je vjerojatni uzrok ovoj pojavi represija ekspresije hidrosilaze citidin-N-acetilneuraminske kiseline (CMAH, *katalizira pretvorbu CMP-NeuAc u CMP-NeuGc*) u živčanom sustavu životinja koje u drugim tkivima sintetiziraju NeuGc, dok u čovjeka postoji defekt gena za CMAH koji onemogućava endogenu sintezu NeuGc u svim tkivima. Dodatno, nije moguće isključiti postojanje mehanizama represije CMAH na razini mRNA, transkripcije ili posttranslacijskih modifikacija. Osim toga, nije moguće sa sigurnošću isključiti postojanje mehanizma eliminacije NeuGc iz moždanog tkiva, što potkrepljuje dokaz da se čak i pri ishrani uz prisutnost NeuGc ova molekula i dalje ne

pojavljuje u tkivu mozga. (Davies i Varki, 2015). Radom (Naito-Matsui i sur., 2017) zaključeno je da prisilna ekspresija CMAH u mozgu miša rezultira abnormalnim lokomotornim sposobnostima, smanjenjem pamćenja i promjenama mijelinizacije. Usto, ovi organizmi pokazali su veću letalnu osjetljivost na subtilizin citotoksin (SubAB toksin). Osim ranije navedenih činjenica, smatra se da zamjena NeuAc za NeuGc zbog velikog udjela NeuAc na staničnim površinama dovodi do povećanja hidrofilnosti i nepoželjnih promjena naboja staničnih membrana. (Davies i Varki, 2015).

Naposljetku, vjeruje se da je prisutnost NeuGc opasna na razini mozga kao tipa tkiva, a ne za same živčane stanice. Ovome svjedoči činjenica da se primarne kulture neurona *in vitro* obično uzgajaju u prisustvu goveđeg fetalnog seruma koji sadrži značajnu količinu NeuGc (Davies i Varki, 2015).

1.6 Strukturna analiza N-glikana

Glikobiološke analize, u užem smislu, mogu se svrstati u područje *glikomike* - određuje se potpuni repertoar stanično ili tkivno eksprimiranih glikana pri definiranim vremenskim ili okolišnim čimbenicima. Suprotno, *glikoproteomičkim* analizama utvrđuje se odnos glikanske i proteinske komponente pojedinog glikoproteina, odnosno udio pojedine glikoforme u skupu glikoproteina proučavanog uzorka. (Rudd i sur., 2017).

Tipičan primjer *glikomičke* analize N-glikana obično uključuje paralelnu obradu uzoraka velikih populacija (kohorti), s naglaskom na visoku protočnost primijenjenih metoda. Nakon izolacije proteina, analiza se obično sastoji od sljedećih koraka (Ruhaak i sur., 2008):

- 1. deglikozilacija** - uporabom peptidne N-glikozidaze F (PNGaza F)
- 2. obilježavanje**- reducirajući kraj N-glikana obilježava se fluoroforom
- 3. pročišćavanje/koncentriranje**- ekstrakcija na čvrstoj fazi, često ekstrakcija na čvrstoj fazi potpomognuta hidrofilnim interakcijama (HILIC-SPE)
- 4. razdvajanje obilježenih N-glikana** - tekućinska kromatografija visoke (ili ultravisoke) učinkovitosti (HILIC-UPLC/HPLC) uz fluorescencijsku detekciju (FLR); analiza dobivenih podataka
- 5. masena spektrometrija** - *online* ili *offline* elektrosprej ionizacijska spektrometrija masa (ESI-MS) ili matriksom potpomognuta lasersko desorpcijska ionizacija spregnuta s detekcijom vremena preleta (MALDI-TOF); analiza masenih spektara.

1.6.1 Metode deglikozilacije

Uklanjanje vezanih N-glikana s glikoproteina može se provoditi enzimskim ili kemijskim reakcijama. Enzimске metode koriste PNGazu F koja uklanja oligomanozne, hibridne i kompleksne N-glikane s Asn veznog mjesta u proteinu, uz konverziju Asn u Asp, osim u slučaju prisutnosti α 1-3 vezane sržne fukoze (tada se koristi PNGaza A), dok endoglikozidaza H (endo H) uklanja hibridne i oligomanozne N-glikane (Stanley i sur., 2017; Ruhaak i sur., 2010). Hidrazinom je moguće ukloniti O- i N-vezane glikane, ali uporaba ovog kemijskog agensa relativno je rijetka zbog težine rukovanja uslijed visoke potencijalne toksičnosti i eksplozivnosti (Ruhaak i sur., 2010).

1.6.2 Derivatizacija

Uporaba reakcije reduktivne aminacije za obilježavanje reducirajućih krajeva N-glikana fluorescentnom sondom uz prisustvo reducirajućeg agensa (natrijev cijanoborhidrid ili pikolin boran) široko je rasprostranjena, a kao otapalo za reakciju obično se koristi octena kiselina u dimetil sulfoksidu. Prednost ove reakcije je stehiometrijski omjer 1:1 za glikan i fluorofor, što olakšava izravnu kvantifikaciju FLR-metodom. Kao fluorescentne sonde koriste se različiti aromatski spojevi kao što su 2-aminobenzamid (2-AB), 2-aminobenzojeva kiselina (2-AA), 2-aminopiridin (PA) i mnoge druge (Ruhaak i sur., 2010). Pri odabiru sonde važno je imati na umu energiju ekscitacije i emisije pri FLR detekciji kao i ionizacijska svojstva sonde pri uvjetima ESI-MS (Kozak i sur., 2015). Permetilacija je još jedna česta modifikacija kojom se postiže povećanje hidrofobnosti N-glikana što može povoljno utjecati na osjetljivost detekcije neutralnih i nabijenih N-glikana pri ESI-MS ili MALDI-MS analizi u pozitivnom načinu rada. Ova reakcija metilira slobodne hidroksi, amino i karboksilne skupine molekule N-glikana. (Ruhaak i sur., 2010).

1.6.3 Pročišćavanje i ukoncentriravanje

Neposredno prije uporabe separacijskih tehnika, iz uzorka glikana potrebno je ukloniti suvišak reagensa za derivatizaciju i ostale moguće nečistoće iz postupka pripreme. Dostupne su različite metode: ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE) u slučaju permetiliranih N-glikana, gel filtracija, papirna kromatografija, ionsko izmjenjivačka kromatografija (uporaba ionsko izmjenjivačkih kolona omogućava separaciju neutralnih i nabijenih frakcija N-glikana; IEC), a najčešće ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE). Prednost SPE ove metode dobro skaliranje, dakle omogućava visoku protočnost, a dostupan je i različitih čvrstih faza kao što su HILIC ili porozni grafitni ugljik (PGC). Pri uporabi HILIC-SPE, hidrofilni N-glikani bivaju zadržani

dok hidrofobne nečistoće slobodno eluiraju. Nakon uklanjanja nečistoća zadržani N-glikani mogu se eluirati mobilnom fazom s visokim udjelom vode (Ruhaak i sur., 2010).

1.6.4 Separacijske tehnike

Često korištene separacijske metode uključuju uporabu kapilarno elektroforetskih tehnika, kao i širok spektar kromatografskih tehnika. U literaturi postoje navodi uporabe HILIC, PGC, IEC i različitih obrnutofaznih (RP) stacionarnih faza (Ruhaak i sur., 2010).

HILIC-tekućinska kromatografija u širokoj je uporabi za separaciju oligosaharida. Ova metoda srodna je kromatografiji normalne faze (NP), ali važnu razliku među njima čini mehanizam separacije - u slučaju NP dominira adsorpcija, dok se separacija na HILIC kolonama odvija uz razdiobu (Ruhaak i sur., 2010). Komercijalno su dostupne aminske, amidne, *zwitterionske* (ZIC) i diolne HILIC kolone. Uporabom amidnih ili diolnih kolona smanjuje se utjecaj ionskih interakcija, dominantne postaju interakcije vezanja vodikovim vezama (Ruhaak i sur., 2010; Zauner i sur., 2011). Tipični uvjeti mobilne faze uključuju uporabu 50-100mM amonijeva formijata (pH 4.4; moguć dodatak kiseline) kao vodene faze i manje polarnog otapala kao što je acetonitril (ACN), dok se ravnotežno stanje za mono- i oligosaharide postže se pri 10-25% vode u acetonitrilu (ACN) s malim udjelom soli ili kiseline. Elucija s kolone postiže se povećanjem udjela vode u mobilnoj fazi. (Zauner i sur., 2011; Ruhaak i sur., 2010).

Zadržavanje molekula na HILIC stacionarnoj fazi ovisi o **hidrofilnom potencijalu molekule**. U slučaju glikana čimbenici koji utječu na zadržavanje su veličina, naboj, monosaharidni sastav, međusobno vezanje monosaharida i grananje. Međutim, separacija oligosaharida primarno je uvjetovanja brojem polarnih skupina (Zauner i sur., 2011). Zbog korelacije vremena zadržavanja s veličinom molekule glikana, ova tehnika može se svrstati u tehnike razdvajanja po veličini (engl. *size separation*) (Ruhaak i sur., 2010). Ova pojava omogućava normalizaciju vremenske osi primjenom vanjskog standarda koji sadržava parcijalni hidrolizat dekstrana (engl. *dextran ladder*) koji je obično 2-AB obilježen - ovim postupkom vrijeme retencije transformira se u broj glukoznih jedinica (GU) (Royle i sur., 2008). Važno je napomenuti da fluorescentno obilježeni N-glikani obično pokazuju niža vremena retencije nego neobilježene molekule istog sastava. (Ruhaak i sur., 2010).

Smanjenje čestica stacionarne faze sa 3-5 μ m (HILIC-HPLC) na sub-2 μ m veličinu (1,7 μ m, UPLC uvjeti) za posljedicu ima povećanje kapaciteta pika i bolje razdvajanje, što može rezultirati povećanom rezolucijom (Ahn i sur., 2009). Ostali važni parametri za optimizaciju

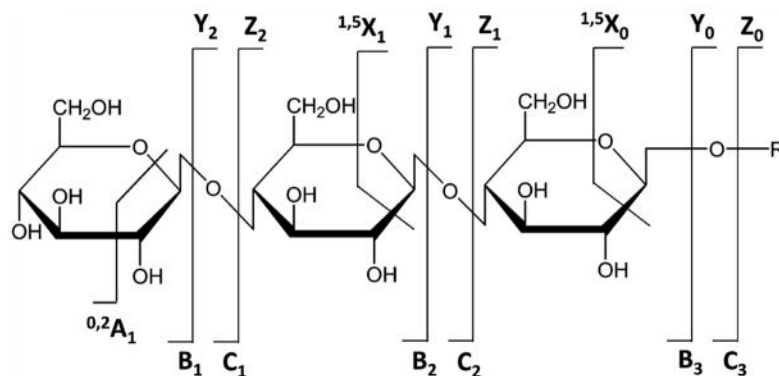
analize uključuju temperaturu kolone, brzinu protoka (0.3-0.5 mL/min) i nagib gradijenta. Posljednja dva uvjeta od posebne su važnosti zbog ovisnosti separacije oligosaharida o uvjetima gradijenta (Ahn i sur., 2009).

1.6.5 Masena spektrometrija

Masena spektrometrija tehnika je proizvodnje i detekcije iona razdijeljenih prema omjeru njihove mase i naboja (m/z). Detekcija iona rezultira zapisom relativne zastupljenosti iona kao funkcije njegove m/z vrijednosti, što daje karakterističan *maseni spektar* (Han i Costello, 2014). Ranije glikobiološke studije koristile su metodu bombardiranja brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*; FAB), ali u novije vrijeme ovu metodu naslijedile su MALDI i ESI tehnologije koje omogućavaju znatno veću osjetljivost i brzinu analize. Poboljšanu osjetljivost (uslijed povećanja hidrofobnosti i učinkovitosti ionizacije) moguće je postići derivatizacijom glikana reduktivnom aminacijom ili permetilacijom (Haslam i sur., 2006). Obje metode su tzv. *mekane* metode ionizacije, što znači da pri ionizaciji ne postoji dovoljan suvišak energije koji bi doveo do fragmentacije molekuskog iona što može predstavljati problem za detaljne strukturalne analize (Han i Costello, 2014). Svojstvo MALDI je da spektar sadrži niz jednostruko nabijenih molekuskih iona, pri čemu učinkovitost ionizacije raste s povećanjem molekule. U slučaju ESI ionizacijska učinkovitost opada s povećanjem veličine molekule. Međutim jedna od osnovnih prednosti ESI je smanjenje gubitka sijalinskih skupina nabijenih glikana. Osim toga, ESI obično generira višestruko nabijene specije (koje mogu komplicirati analizu spektara ukoliko se ne uklone računalnim metodama) te može generirati spektre u pozitivnom ili negativnom načinu rada (Han i Costello, 2014).

Tandemska masena spektrometrija (MS^n) koristi metode nisko- i visokoenergetske sudarom izazvane disocijacije (CID), infracrvene multifotonske disocijacije i nešto novije elektronima izazvane disocijacijske metode za detaljnu strukturu analizu oligosaharida. (Han i Costello, 2014). Pri uvjetima CID mogu se dogoditi dva glavna tipa cijepanja strukture glikana: cijepanje glikozidnih veza između susjednih monomera i cijepanja unutar prstena monomera (**Slika 1.4**) (Han i Costello, 2014; Domon i Costello, 1988). Cijepanje glikozidnih veza (često kod protoniranih oligosaharida) daje informaciju o sekvenci glikana, ali ne o položaju veza (Han i Costello, 2014). Cijepanja unutar prstena u pozitivnom modu češća su pri upotrebi oligosaharida s metalnim aduktima ili permetiliranih derivata (Han i Costello, 2014) i daju

dovoljno informacija za detaljnu strukturnu analizu. CID analiza u negativnom načinu rada vrlo je korisna za analizu glikana koji u strukturi sadrže kisele skupine (Han i Costello, 2014).



Slika 1.4 Obrasci fragmentacije ugljikohidrata s navedenim imenima pojedinih fragmenata. *A, X – pucanje prstena monosaharida, B, C, Y, Z – pucanje glikozidne veze. Reproducirano prema Domon i Costello, 1988)*

Potpuno ručno anotiranje masenih spektara glikana predstavlja vrlo vremenski zahtjevan zadatak zbog čega se obično pri rutinskim analizama upotrebljavaju računalni alati kao što je *Glycomod* (poglavlje 3.6. *Određivanje pretpostavljenih struktura N-glikana*) čime se vrijeme anotacije uvelike skraćuje. Svaki proizvođač opreme obično uz uređaj distribuira i komercijalno dostupne alate koji osim što omogućavaju upravljanje uređajem mogu služiti za vizualizaciju i anotaciju masenih spektara (op.a).

2. Obrazloženje teme

Usprkos tehnološkom napretku na svim područjima glikobiologije, a posebice razvojem *visokoprotocnih* metoda i povećanjem mogućnosti računalne analize podataka, tkivo mozga još uvijek predstavlja značajan istraživački izazov. Prvo, trenutno ne postoje *visokoprotocne* metode za učinkovitu izolaciju, pročišćavanje i odjeljivanje N-glikana tkiva mozga. Metoda korištena u ovom radu omogućava pripremu i analizu do 48 uzoraka tjedno uz optimalan raspored koraka po danima rada i paralelnu obradu više skupina (Klarić i Gudelj, 2017). Zbog ove činjenice rad s ovom vrstom uzorka vrlo je vremenski zahtjevan i mukotrpan proces. Drugo, tkivo mozga odlikuje specifičnost prisutnih struktura i njihovih relativnih omjera u ukupnom N-glikomu tkiva. Poznato je da N-glikom mozga odlikuje relativno veliki udio oligomanoznih struktura u neutralnoj frakciji - oko 15% ukupnih neutralnih N-glikana te česta antenarna $\alpha(1-3)$ -fukozilacija čime se formira *Lewis^x* antigena determinanta. Sržna $\alpha(1-6)$ -fukozilacija također je česta, kao i prisutnost raspolavljajućeg GlcNAc (eng. *Bisecting*) na srži molekule N-glikana (Chen i sur., 1998). Također, tkivo mozga karakterizira poseban profil antenarno sijaliniziranih i specifično razgranatih struktura čiji se relativni omjeri, čini se, mijenjaju tijekom razvoja mozga (Torii i sur., 2014). Osim toga, u literaturi je naglašeno postojanje očite selekcije Neu5Ac naspram Neu5Gc u tkivu mozga što može implicirati evolucijsku prednost u vidu zaštite od patogena ili štetnost prisutnosti Neu5Gc za razvoj i funkciju tkiva mozga. Intrigantna je činjenica da čak i u sisavaca koji posjeduju enzimske sustave za sintezu Neu5Gc, aktivnost tih sustava u tkivu mozga biva suprimirana višestrukim mehanizmima djelovanja (Naito-Matsui i sur., 2016; Davies i Varki, 2015).

Cilj ovog rada je utvrditi postojanje i značaj razlika N-glikoprofila tkiva mozga (posebice korteksa mozga) između odraslih jedinki i mladih jedinki starih 24h i 48h (postnatalna starost) upotrebom HILIC-UPLC metode (Klarić i Gudelj, 2017) za odjeljivanje izoliranih N-glikana koja je upotpunjena analizom masenih spektara istih uzoraka za dobivanje informacije o kvalitativnom sastavu N-glikana (monosaharidni sastav N-glikana - *kompozicija*). Statistički značajne razlike između profila mladih i odraslih jedinki, ukoliko budu utvrđene, mogle bi upućivati na postojanje razvojne uloge određenih struktura N-glikana pri sazrijevanju mozga sisavca. Ovaj rad može doprinijeti znanstvenoj literaturi kao podloga za kompleksnija istraživanja koja bi mogla obuhvaćati *glikoproteomičke* analize i *funkcionalne studije*, čime bi se upotpunila znanja o ulozi i utjecaju određenih N-glikoproteina na normalan razvoj i funkciju mozga sisavaca.

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

Tablica 3.1 Korištene kemijske tvari, enzimi, otopine i oprema.

KEMIJSKA TVAR	PROIZVOĐAČ
2-merkaptoetanol (β ME)	Acros Organics
Dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	Acros Organics
Etanol (EtOH)	Carlo Erba
Natrijev klorid (NaCl)	Carlo Erba
Kalijev klorid (KCl)	EMD Milipore
Acetonitril - LC-MS kvalitete (ACN)	J.T.Baker
Acetonitril - HPLC kvalitete (ACN)	J.T.Baker
Metanol (MeOH)	J.T.Baker
Natrijev hidroksid (NaOH)	Kemika
Mravlja kiselina 98-100% (HCOOH)	Merck
Octena kiselina (HAc)	Merck
Amonijev formijat - LC-MS kvalitete	Sigma-Aldrich
2-pikolinboran (2-PB)	Sigma-Aldrich
Dimetil sulfoksid	Sigma-Aldrich
Hidroksibenzotriazol monohidrat (HOBt)	Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Kloroform (CHCl_3)	Sigma-Aldrich
Natrijev azid (NaN_3)	Sigma-Aldrich
Natrijev dodecil-sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Prokainamid hidroklorid	Sigma-Aldrich
Trifluorooctena kiselina (TFA)	Sigma-Aldrich

ENZIMI	PROIZVOĐAČ
Peptidna N-glikozidaza F (PNGase F) 10U/ μL	Promega

Tablica 3.1 (*Nastavak, otopine i puferi*)

OTOPINE I PUFERI	PRIPRAVA
amonijev formijat, 50mM, pH 4.4 (UPLC kvalitete)	3.153 g krutog amonijeva formijata otopi se u 1L ultra-čiste vode, pH otopine podese se dodavanjem HCOOH (98-100%) do postizanja pH 4.4.
amonijev formijat, 2M, pH 4,4	300 ml hladne (ledene) ultra-čiste vode prenese se u bocu od 500 ml uz dodatak 37,75 ml HCOOH. Otopini se uz miješanje polako dodaje 75 ml NH ₄ OH do postizanja pH 4,2. Smjesa se ostavi preko noći na sobnoj temperaturi te se doda ostatak NH ₄ OH do pH 4,4. Ukupni volumen pufera iznosi 500 ml. Otopina se filtrira kroz 0.2 µm PES membranu i puni u tamnu bocu koja se čuva pri sobnoj temperaturi
amonijev formijat, 100mM, pH 4,4	50 mL pripremljene 2M otopine amonijeva formijata (pH 4.4) prenese se u volumetrijsku posudu volumena 1L i dopuni do konačnog volumena 1L ultra-čistom vodom
50% metanol 4°C (V/V)	100 ml MeOH pomiješa se s 100ml ultra-čiste vode. Otopina se čuva u hladnjaku na 4°C.
70% etanol (V/V)	70 ml EtOH pomiješa se s 30 ml ultra-čiste vode
96 % acetonitril (V/V)	96 ml ACN pomiješa se s 4 ml ultra-čiste vode, otopina se čuva u hladnjaku na 4°C.
85 % acetonitril (V/V)	85 ml ACN pomiješa se s 15 ml ultra-čiste vode.
85 % acetonitril (V/V) 1% trifluoroctena kiselina, TFA (m/V)	1 mL trifluoroctene kiseline doda se u 100 mL 85% otopine ACN i miješa do potpunog otapanja.
10% natrijev dodecil-sulfat (m/V)	1g SDS otopi se u 10 ml ultračiste vode, nakon vorteksiranja i potpunog otapanja otopina se čuva na 37 °C.
10 % Igepal CA-630 (V/V)	1ml Igepal-630 pomiješa se s 9 ml ultra-čiste vode. Otopina se čuva u hladnjaku na 4°C.

Tablica 3.1 (*Nastavak, otopine i puferi*)

10 % Natrijev azid (m/V)	1g natrijeva azida otopi se u 10ml ultra-čiste vode.
30 % octena kiselina u dimetil-sulfoksidu, DMSO (V/V)	750 μ L octene kiseline pomiješa se s 1750 μ L DMSO za ukupni volumen 2500 μ L
otopina prokainamida s pikolin boranom (ProA)	0,83 mg prokainamid hidroklorida doda se 50 μ L otopini 30% octene kiseline u DMSO, smjesa se miješa do potpunog otapanja. U homogenu mjesu doda se 2,24 mg pikolin borana - smjesa se miješa do potpunog otapanja. Volumen odgovara količini potrebnoj za jedan uzorak.
PBS 10x otopina	Priprema 1L otopine započinje dodavanjem NaCl (80,028 g), Na ₂ HPO ₄ (13,832 g), KH ₂ PO ₄ (2,964 g) i KCl (1,976 g) u 800 ml destilirane vode u staklenoj čaši koju se nakon dodavanja kemikalija stavlja magnetski mješač, čaša se pokriva Parafilmom, stavlja na magnetski mješač i miješa do potpunog otapanja. Nakon otapanja smjesa se prebacuje u menzuru, nadopunjava vodom do ukupnog volumena od 1L i dobro promiješa protresanjem. Dobivena smjesa filtrira se kroz 0.2 μ m filter u čistu staklenu bocu. Po potrebi podesiti pH 6.6-6.8. Otopina se čuva u hladnjaku na 4°C.
PBS 1x otopina	100 ml PBS 10x otopine prenese se u staklenu čašu od 1L, čaša se dopuni vodom do volumena 0.9L. Podešavanje pH vrijednosti na 7.4 vrši se otopinom 1M NaOH. Pufer se prenese u menzuru i dopuni vodom do konačnog volumena od 1L. Otopina se filtrira kroz 0.2 μ m filter u čistu bocu i čuva u hladnjaku na 4 °C.
suspenzija poroznog grafita 50mg/mL	500 mg grafita uzetog s Extract-Clean™ SPE Carbograph kolone pomiješati s 10 ml vode (suspenzija je koncentracije 50 mg/mL)

Tablica 3.1 (*Nastavak, oprema*)

OPREMA	PROIZDOĐAČ
Lysing matrix D - 1.4 mm keramičke kuglice (Vickers čvrstoće 800)	MP Biomedicals
FastPrep® - 24 - Homogenizator	MP Biomedicals
Savant™ SC210 SpeedVac™ + RVT400-230 vakuu koncentrator	Thermo Scientific
Pipet-Lite XLS - mikropipete	Rainin
RSLab - 6PRO - vorteks mješač	RSLab
MiniSpin® Pro	Eppendorf
Centrifuge 5804 - centrifuga	Eppendorf
Themomixer® comfort - mješač s grijačem	Eppendorf

3.2 Uzorci

Uzorci mozga štakora (Wistar) primljeni su od Jedinice za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada gdje su životinje žrtvovane na human način prema važećim smjernicama (anestetik Xylapan 12mg/kg i.p., Narketan 80 mg/kg i.p.) Istraživanje obuhvaća 5 odraslih jedinki štakora, 3 jedinke postnatalne starosti 48 sati i 4 jedinke postnatalne starosti 24 sata. Mlade jedinke različite starosti potječu iz različitih legla.

3.3 Priprema N-glikana mozga za UPLC-ESI-MS analizu

Metoda pripreme N-glikana mozga za analizu, uz izmjene, preuzeta je iz (Klarić i Gudelj, 2017), a sastoji se od metanolno-kloroformne izolacije ukupnih proteina iz homogenata tkiva (cijelokupna kortikalna regija mozga u slučaju novorođenih mladih mužjaka i ženki štakora starosti 24 ili 48 sati - zbog male ukupne količine tkiva; lijeva kortikalna regija mozga u slučaju odraslih ženki štakora) nakon čega slijede uzastopni koraci pročišćavanja proteina. Pročišćeni proteini podvrgavaju se denaturaciji u prisustvu natrijeva dodecil-sulfata i 2-merkaptotetanolu (uz povišenu temperaturu) nakon koje slijedi enzimska deglikozilacija PNGazom F kroz sljedećih 48 sati. Nakon pročišćavanja reducirajući krajevi reakcijom reduktivne aminacije (Ruhaak i sur., 2010) označavaju se fluorescentnom sondom te dodatno pročišćavaju da se ukloni suvišak reagensa. Ovako pripremljeni uzorci analiziraju se niže opisanom kromatografijom hidrofilnih interakcija ultra-visoke učinkovitosti uparenom s fluorescencijskom detekcijom i "on-line" elektrosprej ionizacijskom spektrometrijom masa u tandemskom načinu rada (HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS/MS). **Slika 3.1** sažeto prikazuje tijek rada.



Slika 3.1 Sažeti vizualni prikaz koraka prilikom izvođenja modificirane metode preuzete iz (Klarić i Gudelj, 2017).

3.3.1 Homogenizacija tkiva

Postupak koristi ultra-čistu vodu (18.2 MΩ cm pri 25°C), 50% vodenu otopinu metanola (MeOH 50%) i kloroform (CHCl₃) ohlađene na 4 °C. U tubicu od 2mL umetne se uzorak tkiva i doda Lysing Matrix D - da bi se postigla potpuna homogenizacija potrebno je 5 do 6 kuglica na 25 mg tkiva. U isu tubicu doda se ohlađena ultra-čista voda (4 °C), tubica se zatvori i čep se obloži slojem parafilma da se spriječi gubitak uzorka. Ovako pripremljene tubice premjeste se u FastPrep®-24 homogenizator tkiva. Homogenizacija se vrši na sljedećim postavkama: brzina: 6; trajanje: 40s; dok se ne postigne mliječna boja uzorka. Supernatant (bez kuglica) premjesti se u 15 mL (tzv. "Falcon") tubicu. Tubica u kojoj je vršena homogenizacija ispere se s 1mL MeOH 100% (4 °C), a sadržaj (bez kuglica) prenese se u prethodno spomenutu 15 mL tubicu. Ovaj korak ponovi se još jednom s 0.75 mL MeOH 50% (4 °C) nakon čega je 15mL tubicu potrebno vorteksirati (Klarić i Gudelj, 2017).

3.3.2. Izolacija i pročišćavanje proteina

U 15mL tubicu doda se 3.25mL kloroforma (CHCl₃) ohlađenog na 4 °C. Tubica se vorteksira i centrifugira na 4500 x g kroz 30 minuta. Nakon centrifugiranja vidljive su dvije

faze: gornja faza - metanol, voda, hidrofilne nečistoće; i donja hidrofobna faza. Na njihovoj interfazi vidljiv je **disk koji sadržava ukupne proteine uzorka**.

Gornja faza oprezno se ukloni iz 15mL tubice, a zatim se u istu tubicu doda volumen MeOH 50% jednak preostalom volumenu donje faze. Smjesa se vorteksira i centrifugira na 4500 x g kroz 30 minuta. Prethodne korake ponoviti još 2 puta (ukupno 3 ciklusa dodavanja MeOH 50%, vorteksiranja i centrifugiranja).

U sljedećoj fazi postupka, nakon centrifugiranja, potrebno je ukloniti gornju fazu - kao i u prethodnom koraku - te dodati volumen čistog metanola (MeOH 100%) ohlađenog na 4 °C u volumenu jednakom volumenu preostale donje faze. Smjesa se vorteksira i centrifugira pri 4500 x g kroz 30 minuta da se dobije **talog proteina na dnu** 15 mL tubice. Nakon centrifugiranja supernatant se odstrani, a talog se resuspendira u 500 µL MeOH 100% (4 °C) i pomoću širokog nastavka pipete (koji može biti dodatno obrezan) premjesti se u čistu 2mL tubicu. 15mL tubica dodatno se ispere s 500 µL MeOH 100% (4 °C) i sadržaj se prenese u 2mL tubicu. 2mL tubica centrifugira se na 13000 okretaja (rpm) kroz 15 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant se ukloni, a talogu se doda 1 mL MeOH 100 (4 °C). Tubica se vorteksira, a nakon toga centrifugira na 13000 rpm kroz 15 minuta. Koraci uklanjanja supernatanta nakon centrifugiranja, dodavanje novog volumena MeOH 100% (4 °C), centrifugiranja na 13000 rpm kroz 15 min i ponovnog uklanjanja supernatanta ponove se još 2 puta. Naposljetku, tubice s talogom proteina suše se u vakuum koncentratoru kroz 10 minuta s poklopcem u otvorenom položaju (Klarić i Gudelj, 2017).

3.3.3. Enzimsko oslobađanje N-glikana PNGazom F i pročišćavanje slobodnih N-glikana

Osušeni talog proteina lagano se zdrobi suhim nastavkom za pipetu. U istu tubicu doda se 1mL PBS da se talog resuspendira. U tubicu s resuspendiranim talogom doda se 2-merkaptoetanol (βME, 6 µL) do konačne koncentracije 0.5% (V/V) i 10% otopina natrijeva dodecil-sulfat do konačne koncentracije 0.57% (m/V, 37 µL). Smjesa se vorteksira i inkubira 10 minuta pri 95 °C uz treskanje u Themomixer®-u. Nakon inkubacije, tubicu s uzorkom potrebno je ostaviti na ledu ili u zamrzivaču na 5 minuta. Potom, u tubicu se dodaje 130 µL 10% otopine Igepal CA - 630 do konačne koncentracije 1% i 15 µL 10% otopine natrijeva azida do konačne koncentracije 0.12%. Enzim PNGaza F dodaje se volumenu 0.5 µL (5 U), tubica se vorteksira, čep obloži parafilmom i smjesa se inkubira na 37 °C preko noći. Sljedeći dan u smjesu se doda još 0.5 µL PNGaze F, tubica se vorteksira, čep omota parafilmom i smjesa se inkubira preko noći na 37 °C.

Oslobođeni N-glikani pročišćavaju se Amicon® Ultra-2 centrifugalnim filterima koji ograničavaju prolazak česticama većim od 30kDa (NMWL: 30 000 Da). Centrifugalni filter priprema se dodavanjem 1mL ultra-čiste vode i centrifugiranjem pri 2450 x g kroz 5 minuta. Nakon centrifugiranja eluat se ukloni, a centrifugalni filter napuni se s još 1mL ultra-čiste vode i centrifugira pri 2450 x g kroz 5 minuta. Nakon ovog koraka centrifugalni filter spreman je za uporabu.

Ukupni volumen smjese prenese se iz tubice u kojoj je vršena reakcija deglikozilacije u za to predviđeni otvor centrifugalnog filtra i centrifugira pri 4000 x g kroz 20 minuta. Nakon centrifugiranja, tubica u kojoj se vršila reakcija dodatno se ispere s 500 µL ultra-čiste vode. Sadržaj se prenese u centrifugalni filter koji se centrifugira pri 4000 x g kroz 15 minuta. Prethodna dva koraka ispiranja i centrifugiranja još jednom se ponove. Nakon posljednjeg centrifugiranja, spremnik za sakupljanje eluata odvoji se od ostatka centrifugalnog filtra i suši se kroz 2-4 sata u vakuum koncentratoru. Nakon toga, sadržaj donjeg dijela spremnika za sakupljanje eluata premjesti se u 2mL tubicu, spremnik se ispere 2 puta s 200 µL ultra-čiste vode, a sadržaj se nakon svakog ispiranja prenese u 2mL tubicu u koju je premješten prvobitni eluat. Sadržaj tubice uparava se do suha preko noći u vakuum koncentratoru (Klarić i Gudelj, 2017).

3.3.4. *Fluorescentno obilježavanje reducirajućih krajeva slobodnih N-glikana i pročišćavanje*

U tubice s preko noći sušenim slobodnim N-glikanima doda se 100 µL ultra-čiste vode i sadržaj se resuspendira. Ovako resuspendirani slobodni N-glikani prenese se na pločicu s 96 jažica da se ubrza postupak obilježavanja i uklanjanja viška reagensa, uzorci se stavljaju pojedinačno - stavlja se po 1 uzorak u 1 jažicu. U svaku jažicu s uzorkom stavlja se 50 µL unaprijed pripremljene otopine prokainamida (ProA) s pikolin boranom za derivatizaciju reducirajućih krajeva slobodnih N-glikana reakcijom reduktivne aminacije (Ruhaak i sur., 2010) (**Slika 3.2**). Prokainamid služi kao fluorescentna sonda, a pikolin boran kao reducens. Nakon dodatka 50 µL ProA sadržaj jažice oprezno se promiješa pipetiranjem. Pločica s jažicama zapečati se adhezivnom trakom i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano treskanje, a potom inkubira 2 sata pri 65 °C. Po završetku inkubacije pločice se ostave hladiti 30 minuta na sobnoj temperaturi (Klarić i Gudelj, 2016).

AcroPrep™ GHP hidrofilne membranske filter pločice s 96 jažica s 0.2 µm membranom (GHP-pločica) pripremaju se za uporabu dodavanjem 200 µL 70% otopine etanola u svaku korištenu jažicu i provlačenjem sadržaja jažice pod sniženim tlakom kroz filter pomoću uređaja za filtiranje pod sniženim tlakom (engl. *Vacuum manifold*). Korišten je

podtlak oko 25 mm Hg. Filtrat se baca u otpad. Zatim se u jažicu doda 200 ultra-čiste vode i sadržaj jažice provuče kroz filter na isti način kao u prethodnom koraku. Priprema pločice završava dodavanjem 200 μL 96% otopine ACN u jažicu i provlačenjem kroz filter kao u prethodna 2 koraka.

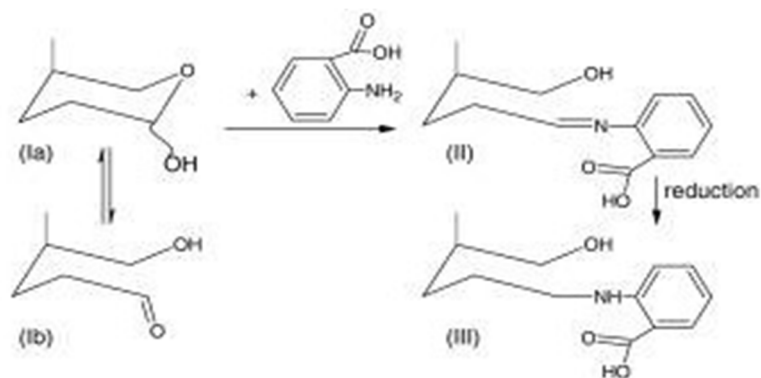
Uzorcima N-glikana doda se po 800 μL 100% ACN (4°C), smjesa se promiješa pipetiranjem, a ukupni volumen svakog uzorka prenese se na ranije pripremljenu GHP-pločicu. Pločica se inkubira 2 minute na sobnoj temperaturi. Sadržaj jažice provlači se kroz filter pri sniženom tlaku, filtrat se baca. Nakon filtriranja svakom uzorku dodaje se 200 μL 96% ACN (4°C), sadržaj jažice se filtrira, a filtrat baca. Ova dva koraka ponove se još 3 puta.

Zatim, GHP-pločica postavi se na stalak s jažicama volumena 2 mL, a uzorcima na GHP-pločici doda se 200 μL 96% ACN (4°C). Sve se centrifugira pri 165 x g kroz 5 minuta. Filtrat se odbacuje.

Nakon centrifugiranja GHP-pločica stavlja se na pločicu za sakupljanje uzoraka s 96 jažica, svakom uzorku na GHP-pločici doda se 90 μL ultra-čiste vode i ostavi 15 minuta pri sobnoj temperaturi uz lagano treskanje.

Nakon 15 minuta, GHP-pločica i pločica za sakupljanje uzoraka centrifugiraju se pri 165 x g kroz 5 minuta. Glikani u filtratu sakupljaju se u jažice pločice za sakupljanje uzoraka. Ovi koraci ponove se još dva puta. Po završetku postupka, jažice pločice za sakupljanje uzoraka zapečate se plastičnim čepovima. Ovako pripremljeni uzorci obilježenih N-glikana mogu se čuvati na -20 °C do uporabe (Klarić i Gudelj, 2017).

Korištenje prokainamida opravdano je činjenicom da N-glikani obilježeni ovom sondom zadržavaju sposobnost dobrog razdvajanja pri uvjetima tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti uparene s fluorescencijskom detekcijom (UPLC-FLR) usporedivu s češće korištenom metodom obilježavanja 2-aminobenzamidom (2-AB) uz veći intenzitet kromatografskih pikova, što omogućava učinkovitiju integraciju pikova nižeg intenziteta (Kozak i sur., 2015). Osim toga, N-glikani obilježeni prokainamidom pokazuju 30 puta veći intenzitet signala pri uvjetima elektrosprej ionizacijske masene spektrometrije (ESI-MS) u usporedbi s 2-AB. Ova činjenica može se objasniti većim afinitetom za proton (H^+) zbog prisustva 2-(dietilamino)etilne skupine u molekuli prokainamida (Kozak i sur., 2015).



Slika 3.2 Prikaz reakcije reduktivne aminacije. Obilježavanje reducirajućeg kraja N-glikana. Reakcijom -NH₂ skupine fluorescentne boje (prikazan 2-aminobenzamid) s alhidnom skupnom molekule N-glikana (reducirajući kraj) nastaje imid. U sljedećem stupnju reakcije nastali imid se reducira (pikolin boranom) čime se stabilizira veza između reducirajućeg kraja N-glikana i fluorescentne boje. (preuzeto iz i modificirano prema Ruhaak i sur., 2010).

3.4. HILIC-UPLC-FLR analiza prokainamidom obilježenih N-glikana

15 μ L uzorka N-glikana obilježenih fluorescentnom sondom (ProA) resuspendira se u 35 μ L ACN. Pripremljeni uzorci razdvajaju se HILIC-UPLC metodom u Waters Acquity UPLC instrumentu H-klase s fluorescentnim detektorom na Acquity UPLC Glycan BEH-amid kromatografskoj koloni sljedećih specifikacija: veličina pore čestica čvrste faze: 130 Å; promjer čestica čvrste faze: 1.7 μ m; dimenzije kolone: 2.1 x 150 mm; početni uvjeti protoka otapala za analizu: 0.561 mL/min s omjerom 27 % 100 mM natrijeva formijata pH 4.4 (otapalo A) i 73% 100% ACN LS-MS kvalitete (otapalo B); uvjeti linearnog gradijenta postavljeni su na 27-29.5% otapala A kroz prvih 15 minuta analize, a zatim 29.5-38,7% otapala A kroz sljedećih 80 minuta; temperatura kolone: 25 °C; temperatura uzorka u uređaju za automatsko uzorkovanje: 10 °C; injektirani volumen uzorka: 40 μ L. Preuzeto i modificirano prema (Klarić i Gudelj, 2017). Detekcija razdvojenih N-glikana vrši se FLR-detektorom (određivanje retencijskog vremena pojedinačnih pikova) podešenim na valne duljine: 310 nm za ekscitaciju i 370 nm za emisiju zračenja (Kozak i sur., 2015). Integracija površine ispod krivulje kromatograma za svaki eluirani pik izvršena je pomoću Waters Empower 3 paketa za obradu kromatografskih podataka.

3.5 PGC pročišćavanje i koncentriranje obilježenih N-glikana

Grafitne čestice uklonjene s Extract-Clean™ SPE Carbograph PGC kolone koriste se za pripremu metanolne suspenzije grafita konačne koncentracije 50 mg/mL u prikladnom laboratorijskom posuđu. Pripravljena suspenzija sabija se u PGC mikrokolonu iznad C18 mikrokolone unutar ZipTip® nastavka pipete apliciranjem 50 µm (oko 5 mg grafita) pripremljene metanolne suspenzije (50 mg/mL) grafita u pripremljeni ZipTip® postavljen u mikrotubicu prikladnog volumena (1 mL) i centrifugira 30 sekundi pri 2000x g. Centrifugiranjem se formira PGC mikrokolona uz uklanjanje sitnih čestica PGC.

Pripravljena PGC mikrokolona priprema se za uporabu ispiranjem s 50 µL ACN s 0.1% TFA i centrifugiranjem 30 sekundi pri 2000x g, eluat se odbacuje. Postupak se ponovi.

Zatim se kolona ispiri s 50 µL ultra-čiste vode s 0.1% TFA i centrifugira pri 2000x g 30 sekundi, eluat se odbacuje. Korak se ponovi.

Na pripremljene PGC mikrokolone nanese se 60 µL otopine uzorka obilježenih N-glikana, centrifugira se 30 sekundi pri 2000x g, eluat se baca. Postupak nanošenja uzorka ponavlja se dok se ne aplicira sav uzorak – u ovom slučaju korišteno je 100 µL. U ovom trenutku mikrokolona sadrži vezane N-glikane koji se pročišćavaju s 60 µL ultra-čiste vode. Korak pročišćavanja može se ponoviti više puta, ovisno o potrebi.

Ovako pročišćeni i ukoncentrirani obilježeni N-glikani eluiraju se s PGC mikrokolone uz 40 µL 73 % ACN u 100mM amonijevom formijatu (pH 4.4). Eluat se prebacuje u posudice za HPLC analizu uz dodatak 10 µL 100% ACN. Ovaj postupak je vršen prema (Jensen i sur., 2012) uz manje modifikacije.

3.6 HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS/MS analiza prokainamidom obilježenih N-glikana

Priprema uzoraka za analizu i kromatografsko razdvajanje N-glikana vrši se na način opisanom u poglavlju 3.4. uz volumen injektiranja od 30 µL. Nakon razdvajanja, eluat se prosljeđuje se na priključeni ("on-line") Waters SYNAPT G2-Si maseni spektrometar u ESI(+) načinu rada. Uvjeti rada stroja su sljedeći: raspon snimljenih masa: 500-3000 Da; protok plina za desolvataciju: 800 L/h; temperatura desolvatacije 350 °C; napon kapilare: 3.0 kV; temperatura izvora: 120 °C; brzina infuzije uzorka; 5µL/min; , broj odabranih iona prekursora za fragmentaciju: 2; način rada povećane rezolucije; raspon snimljenih masa pri fragmentacijskoj analizi 100-3000 Da. Kolizijska energija – kontrola kolizijske energije: Trap CE opcija; rampa (gradijent): 7-10 V za molekule niske molekulske mase, 103-111 V za molekule visoke molekulske mase.

3.7 Određivanje pretpostavljenih struktura N-glikana

Pretpostavljene strukture N-glikana određivane su iz masenih spektara pomoću *Glycomod* bioinformatičkog sustava (dostupno na <https://web.expasy.org/glycomod/>) (Cooper i sur., 2001) na način opisan u (Cooper i sur., 2003). Ukratko, navedeni softver omogućava izračunavanje svih mogućih kompozicija glikana (mogući broj pojedinih monomera u strukturi) iz eksperimentalnih masa glikana dobivenih analizom masenih spektara (Cooper i sur., 2001). Softver omogućava definiranje mase (Da) molekule kojom su analizirani glikani derivatizirani te definiranje vrste i stanja naboja adukta koji nastaje pri uvjetima analize masenim spektrometrom. (Cooper i sur., 2003). U slučaju postojanja izračunatog glikana čija je masa približno jednaka eksperimentalno dobivenoj masi (alat omogućava definiranje veličine pogreške; korištena je maksimalna pogreška od 0.5Da) alat registrira postojanje para: [teoretska masa (Da) - eksperimentalna masa (Da)] te se korisniku prikazuje HTML-tablica kompozicija glikana koje posjeduju specifičnu izračunatu masu uz odstupanje eksperimentalne mase od teorijski izračunate mase (Cooper i sur., 2003). Koristeći opća znanja glikobiologije pri analizi iona prekursora, moguće je iz pretraživanja sustavom *Glycomod* isključiti izračunate strukture koje se ne pojavljuju u prirodi ili nisu relevantne za tkivo ispitivane vrste ograničavanjem broja pojavljivanja određenog monomera u strukturi glikana ili potpunim isključivanjem glikana koje posjeduju određeni monomer u strukturi. Tako je primjerice moguće pri analizi iona prekursora isključiti strukture koje ne posjeduju pentasaharidnu sržnu strukturu $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_2$ prisutnu kod svih N-glikana.

Koristeći podatak o retencijskom vremenu dobiven HILIC-UPLC-FLR metodom, moguće je zaključiti o svojstvima hidrofilitnosti molekule N-glikana što se može koristiti kao dodatna komponenta pri određivanju pretpostavljene strukture glikana.

Maseni spektri dobiveni fragmentacijom iona prekursora (MS/MS podaci) imaju dodatnu ulogu u određivanju strukture N-glikana, što će reći da fragmentacijski spektri omogućavaju razlučivanje između izomernih struktura N-glikana jednake molekulske mase. Za vizualizaciju molekulskih struktura N-glikana korišten je *Glycoworkbench* alat za računalnu anotaciju masenih spektara razvijen od strane (Ceroni i sur., 2008).

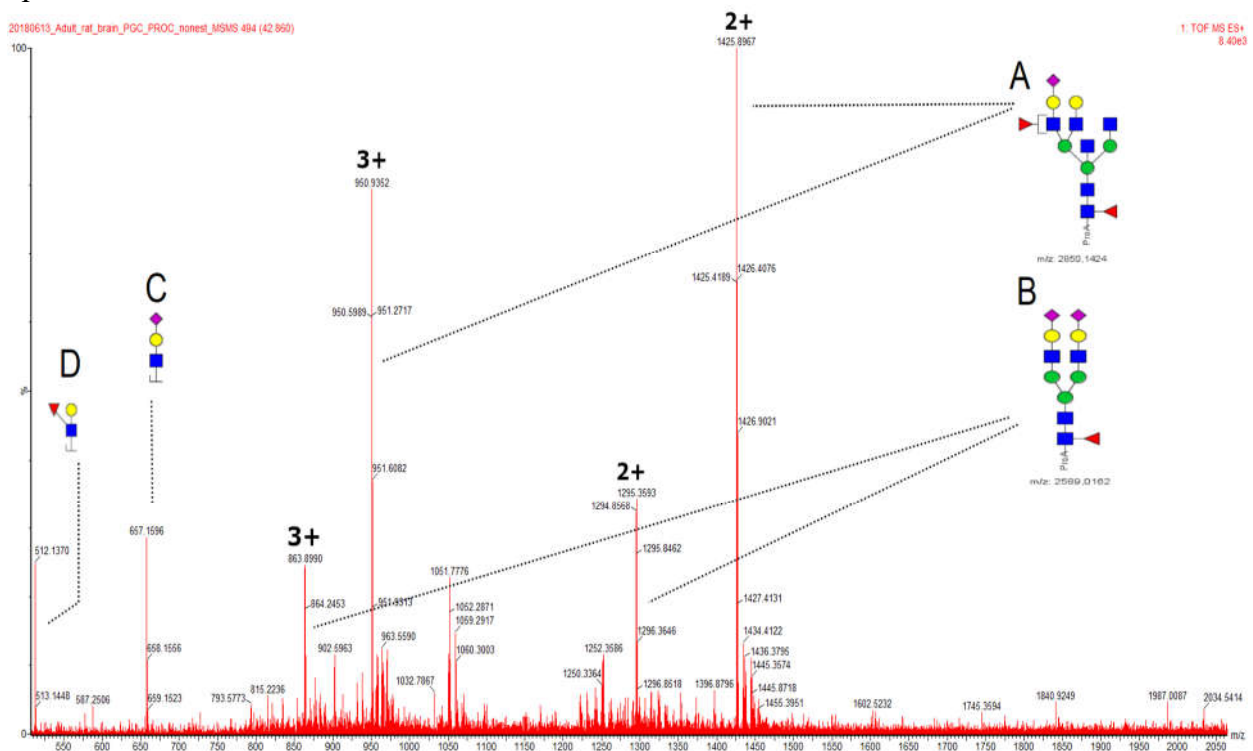
3.8 Statistička obrada podataka, prikazi rezultata

Podaci dobiveni integriranjem kromatografskih podataka sustavom Empower 3 obrađeni su i vizualizirani uz pomoć statističkog paketa R (R Core Team, 2018) uz integrirano razvojno okruženje RStudio (RStudio Team, 2015) te korištenjem SciPy (Jones i sur., 2001) i Matplotlib (Hunter, 2007) biblioteka programskog jezika Python.

4. Rezultati i rasprava

4.1 Rezultati kromatografske analize i masene spektrometrije

Nakon HILIC-UPLC-ESI-MS/MS analize uzoraka (tkivo korteksa odraslih štakora, „odrasla skupina“, $n = 5$; tkivo mozga štakora starih 24 sata, „skupina 24h“, $n = 4$; tkivo mozga štakora starih 48 sata, „skupina 48h“, $n = 3$) rezultati analize (u daljnjem tekstu kao *kromatogrami*) podijeljeni su u 46 distinktnih frakcija. Informacija o kvalitativnom sastavu N-glikana u svakoj pojedinoj frakciji dobivena je tumačenjem i anotacijom masenih spektara. Kvalitativna informacija odnosi se na različitost kompozicija identificiranih u svakoj pojedinoj frakciji. Analiza fragmentacijskih spektara (MS/MS) bila je moguća za one kompozicije čiji je intenzitet signala zadovoljio prag pri odabiru molekule za fragmentaciju definiran u postavkama analize masenim spektrometrom. Prilikom analize masenih spektara (MS1) ustanovljeno je da se molekule N-glikana pojavljuju kao jednostruko, dvostruko, trostruko i u rijetkim slučajevima kao četverostruko nabijene specije ($M(Da) > 3500$) što se odražava na pripadnu vrijednost m/z . U nekim slučajevima, osobito ukoliko se radi o kompozicijama koje sadržavaju NeuAc uočena je fragmentacija unutar izvora iona masenog spektrometra (engl. *In-source fragmentation*). **Slika 4.1** daje reprezentativan primjer masenog spektra razine MS1.



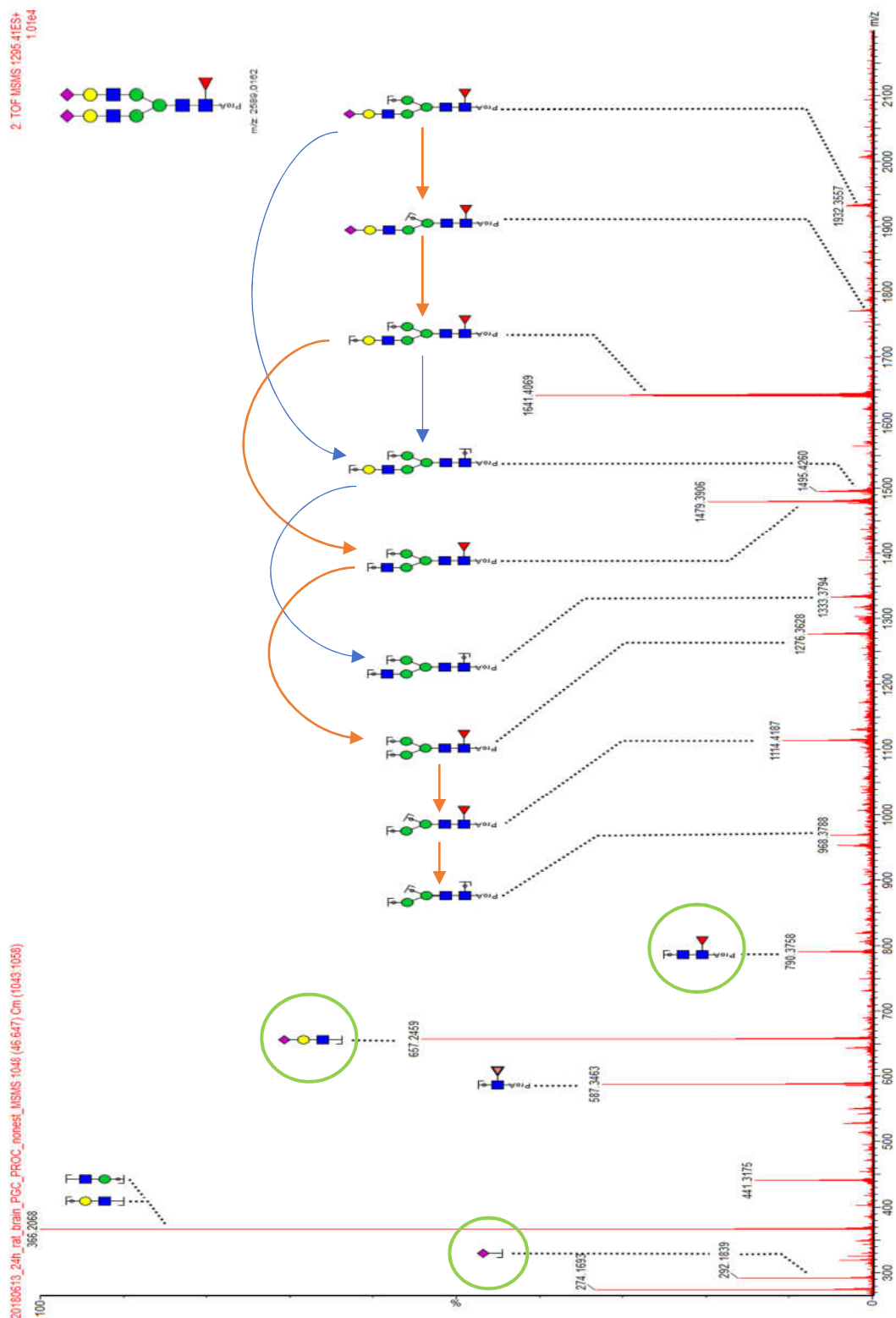
Slika 4.1 Primjer masenog spektra razine MS1. **A:** kompozicija $H5N6F2S1$ ($[MProAH]^+ = 2850.14$) – linije pokazuju na 2+ i 3+ nabijene ionske specije dane kompozicije. **B:** kompozicija $H5N4F1S2$ ($[MProAH]^+ = 2589.0162$) – linije pokazuju na 2+ i 3+ nabijene specije dane kompozicije. **C:** fragment $m/z = 657.1596$ ($H1N1S1$). **D:** fragment $m/z = 512.13770$. Fragmenti pod C i D upućuju na „in-source“ fragmentaciju kompozicija pod A i/ili B

4.2 Određivanje *N*-glikoprofila

Strukturna informacija o pojedinim kompozicijama upotpunjena je analizom fragmentacijskih (ESI-MS/MS) spektara u pozitivnom načinu rada. Važno je imati na umu da ESI(+)-MSMS spektri ne sadrže informaciju o prostornoj orijentaciji pojedinih veza unutar analiziranog *N*-glikana uslijed male vjerojatnosti fragmentacije monosaharida unutar šesteročlanog prstena. Također, prilikom anotacije važno je voditi računa o specifičnosti puteva enzimske sinteze *N*-glikana, čime je moguće eliminirati biološki nemoguće strukture i bitno pojednostaviti analizu. Opis i biološku pozadinu mogućih obrazaca grananja *N*-glikana daje kratki pregled sastavljen od strane (Taniguchi i sur., 2014). **Slika 4.2** daje primjer anotacije fragmentacijskog spektra dobivenog u ESI(+) načinu rada. U gornjem desnom kutu prikazana je moguća struktura navedene kompozicije određene vrijednosti m/z (dalje u tekstu *predložena struktura*), a svakom pojedinom vršku pripisan je mogući fragment odgovarajuće vrijednosti m/z . Svi fragmenti prikazani su kao vrijednost m/z s vrijednošću naboja (z) jednakoj +1. Odstupanja, ukoliko ih ima, posebno su naznačena. Dodatni primjeri anotiranih fragmentacijskih spektara nalaze se u poglavlju 8.*Prilozi*.

Ukupno je identificirano 87 kompozicija (jedna kompozicija može se pojaviti u više prostornih struktura, odnosno u više frakcija), od čega: 9 oligomanoznih (Man₃₋₉GlcNAc₂), 6 fosforiliranih, 2 sulfatirane, 67 fukoziliranih (antenarno i/ili sržno), 1 kompozicija s heksuronskom kiselinom te 41 kompozicija sa jednom ili više sijalinskih kiselina. Fragmentacijski spektri nisu bili dostupni za frakcije: 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 uslijed niskog intenziteta signala. **Tablice 4.1, 4.2 i 4.3** prikazuju *pretpostavljene strukture* dominantnih kompozicija u pojedinim frakcijama za svaku skupinu uzoraka. Ukoliko je u pojedinoj frakciji prisutno više kompozicija kompozicijama su uz broj dodijeljena slova abecednim redom (npr. 16a ili 27.1a ukoliko frakcija sadrži više vršaka s više različitih kompozicija). **Slike 4.3, 4.4, 4.5** prikazuju anotirane kromatograme (*N*-glikoprofile) svake skupine uzoraka – pojedinačnim frakcijama u kromatogramu dodijeljena je *pretpostavljena struktura* dominantne kompozicije.

Iscrpna lista pronađenih kompozicija u pojedinim frakcijama uz dodatne informacije nalazi se u poglavlju 8.*Prilozi*.



Slika 4.2 Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra kompozicije **H5N4F1S2** $m/z([MProAH]^+) = 2589.0162$. U prikazu crtkane linije spajaju fragment i pojedini vršak u masenom spektru, m/z fragmenta napisan je iznad vrška. Praćenjem spektra zdesna ulijevo (strelice) uviđa se postupni gubitak heksoza, heksozamina i sialinskih kiselina uslijed fragmentacije izazvane sudarima (CID). Dijagnostički fragmenti (fragmenti koji daju najviše informacija) zaokruženi su zelenom bojom.

Tablica 4.1 Odrasla skupina – pretpostavljene strukture dominantnih kompozicija po frakcijama

Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
1	1276.41000	1	1276.41000	1057.39293	H3N2F1		15	930.77730	2	1860.54733	1641.59943	H5N4	
2	1292.40200	1	1292.40200	1073.38783	H4N2		16a	995.80610	2	1990.60493	1771.66243	H4N4F2	
3	1479.46700	1	1479.46700	1260.47233	H3N3F1		16b	1003.79520	2	2006.58313	1787.65733	H5N4F1	
4	719.72800	2	1438.44873	1219.44573	H4N2F1		17	1003.77500	2	2006.54273	1787.65733	H5N4F1	
5	841.76300	2	1682.51873	1463.55173	H3N4F1		18	995.80600	2	1990.60473	1771.66243	H4N4F2	
6	1454.44700	1	1454.44700	1235.44063	H5N2		19	1097.33600	2	2193.66473	1974.74183	H4N5F2	
7	943.29400	2	1885.58073	1666.63113	H3N5F1		20.1	1097.32100	2	2193.63473	1974.74183	H4N5F2	
8	943.29400	2	1885.58073	1666.63113	H3N5F1		20.2	889.75500	2	1778.50273	1559.54623	H7N2	
9	922.78000	2	1844.55273	1625.60453	H4N4F1		21	1076.81900	2	2152.63073	1933.71523	H5N4F2	
10	922.78000	2	1844.55273	1625.60453	H4N4F1		22	1169.83300	2	2338.65873	2119.77933	H4N5F1S1	
11	922.78000	2	1844.55273	1625.60453	H4N4F1		23.1	983.28700	2	1965.56673	1746.63073	H6N3F1	
12	1024.30600	2	2047.60473	1828.68393	H4N5F1		23.2	1198.84660	2	2396.68593	2177.82123	H4N6F2	
13	808.74500	2	1616.48273	1397.49343	H6N2		24	1178.34000	2	2355.67273	2136.79463	H5N5F2	
14	808.74500	2	1614.44832	1395.37323	H5N2Phos2		25	970.77900	2	1940.55073	1721.59903	H8N2	

Tablica 4.1 (Nastavak)

Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH] ⁺ (Da)	Teorijski [MH] ⁺ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH] ⁺ (Da)	Teorijski [MH] ⁺ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
26	970.76530	2	1940.52333	1721.59903	H8N2		36	985.27200	3	2953.80146	2734.98033	H6N5F1S2	
27.1	969.75940	2	1938.51152	1719.47883	H7N2Phos2		37	936.92490	3	2808.76016	2589.94283	H6N5F2S1	
27.2	1250.84570	2	2500.68413	2281.83213	H5N5F1S1		38	1057.61650	3	3170.83496	2952.03893	H5N4F1S4	
28	1222.33500	2	2443.66273	2224.81063	H5N4F2S1		39	1053.29250	3	3157.86296	2939.08013	H6N6F3S1	
29	1149.84450	2	2298.68173	2079.77313	H5N4F3		40	1033.93700	3	3099.79646	2881.03823	H6N5F2S2	
30	1251.35510	2	2501.70293	2282.85253	H5N5F3		41	937.25890	3	2809.76216	2590.96323	H6N5F4	
31	1051.79200	2	2102.57673	1883.65183	H9N2		42	1149.96290	3	3447.87416	3229.15513	H6N6F1S3	
32	1425.41900	2	2849.83073	2630.96943	H5N6F2S1		43	1203.98930	3	3609.95336	3391.20793	H7N6F1S3	
33	882.90830	3	2646.71036	2427.89003	H5N5F2S1		44	1155.97880	3	3465.92186	3247.19083	H7N6F4S1	
34a	912.25800	3	2734.75946	2515.90603	H5N4F2S2		45	1252.65220	3	3755.94206	3537.26583	H7N6F2S3	
34b	960.59500	3	2879.77046	2660.94353	H5N4F1S3		46	1301.00370	3	3900.99656	3682.30333	H7N6F1S4	
34c	1294.85680	2	2588.70633	2369.84813	H5N4F1S2								
34d	902.26860	3	2704.79126	2485.93193	H5N6F3								
35	931.27000	3	2791.79546	2572.92753	H5N5F1S2								

Tablica 4.2 Skupina 24h – pretpostavljene strukture dominantnih kompozicija po frakcijama

Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
1	1276.4719	1	1276.47190	1057.39293	H3N2F1		15	930.8039	2	1860.60053	1641.59943	H5N4	
2	1292.4553	1	1292.45530	1073.38783	H4N2		16	1003.7952	2	2006.58313	1787.65733	H5N4F1	
3	740.2668	2	1479.52633	1260.47233	H3N3F1		17	1024.3475	2	2047.68773	1828.68393	H4N5F1	
4	719.7519	2	1438.49653	1219.44573	H4N2F1		18	1003.8367	2	2006.66613	1787.65733	H5N4F1	
5	870.3112	2	1739.61513	1520.57323	H3N5		19	1097.3789	2	2193.75053	1974.74183	H4N5F2	
6	1454.4965	1	1454.49650	1235.44063	H5N2		20.1	1097.3789	2	2193.75053	1974.74183	H4N5F2	
7	943.3339	2	1885.66053	1666.63113	H3N5F1		20.2	889.7939	2	1778.58053	1559.54623	H7N2	
8	943.2940	2	1885.58073	1666.63113	H3N5F1		21	1076.8618	2	2152.71633	1933.71523	H5N4F2	
9	922.8196	2	1844.63193	1625.60453	H4N4F1		22	1152.3318	2	2303.65633	2084.67282	H4N5F1Sulph1 HexA1	
10	922.8196	2	1844.63193	1625.60453	H4N4F1		23	1076.3463	2	2151.68533	1932.69483	H5N4S1	
11	922.8196	2	1844.63193	1625.60453	H4N4F1		24	1178.3860	2	2355.76473	2136.79463	H5N5F2	
12	1024.3475	2	2047.68773	1828.68393	H4N5F1		25	970.8061	2	1940.60493	1721.59903	H8N2	
13	808.7699	2	1616.53253	1397.49343	H6N2		26	970.8061	2	1940.60493	1721.59903	H8N2	
14	807.7650	2	1614.54623	1395.37323	H5N2Phos2		27.1	969.7594	2	1938.51152	1719.47883	H7N2Phos2	

Tablica 4.2 (Nastavak)

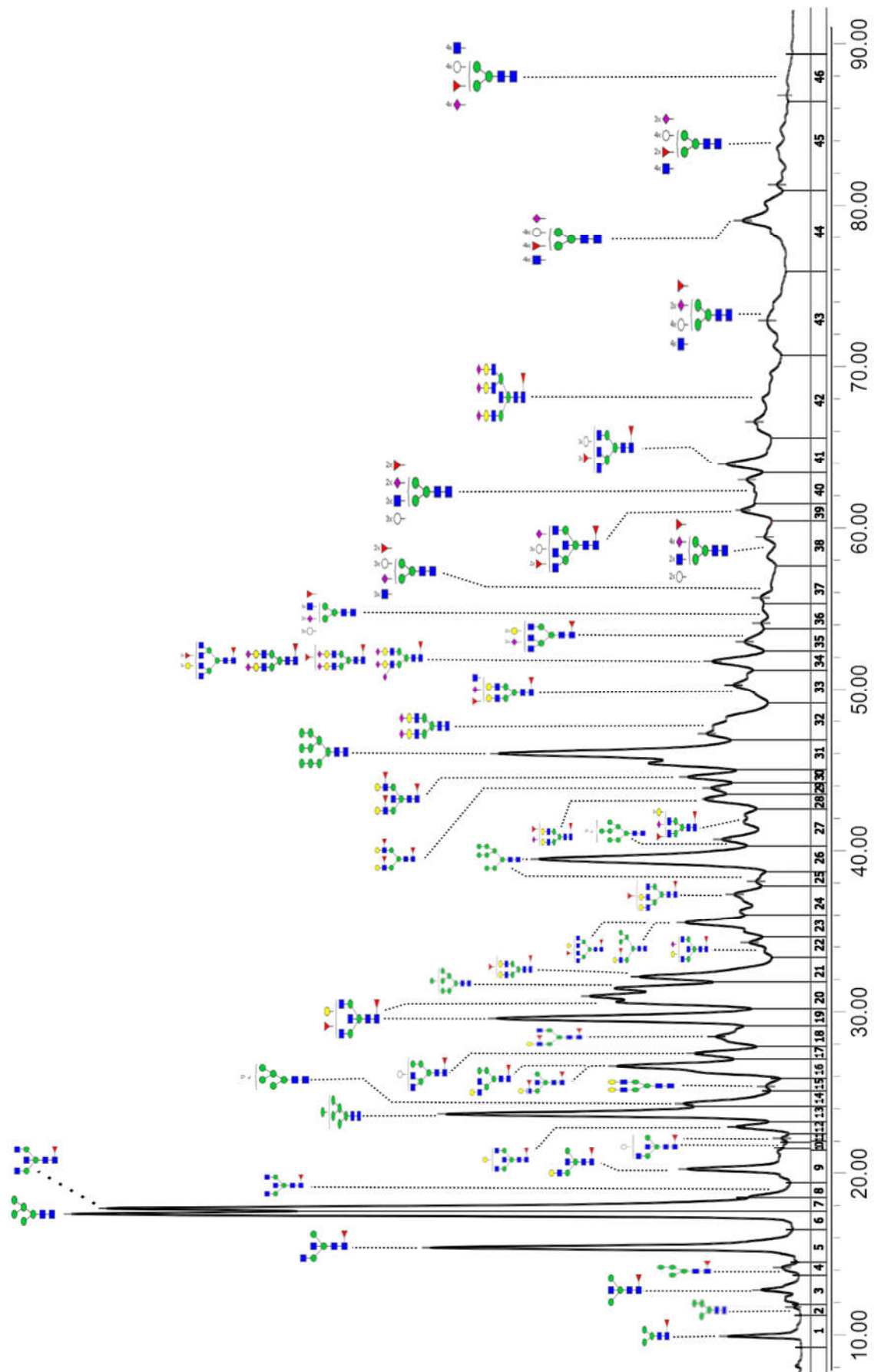
Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
27.2	1250.8920	2	2500.77673	2281.83213	H5N5F1S1		41	1082.3246	3	3244.95926	3026.07573	H6N5F1S3	
28	1222.3804	2	2443.75353	2224.81063	H5N4F2S1		42	1107.0131	3	3319.02476	3100.11253	H7N6F1S2	
29	1149.8445	2	2298.68173	2079.77313	H5N4F3		43	1204.0195	3	3610.04396	3391.20793	H7N6F1S3	
30	1251.4014	2	2501.79553	2282.85253	H5N5F3		44	1301.0353	3	3901.09136	3682.30333	H7N6F1S4	
31	1051.7920	2	2102.57673	1883.65183	H9N2		45	1301.0353	3	3901.09136	3682.30333	H7N6F1S4	
32	1050.7731	2	2100.53893	1881.53163	H8N2Phos2		46	1374.3984	3	4121.18066	3902.39803	H8N7F2S3	
33	882.9471	3	2646.82676	2427.89003	H5N5F2S1								
34	1294.9038	2	2588.80033	2369.84813	H5N4F1S2								
35	931.2833	3	2791.83536	2572.92753	H5N5F1S2								
36	985.2994	3	2953.88366	2734.98033	H6N5F1S2								
37	1052.9950	3	3156.97046	2938.05973	H6N6F1S2								
38	1053.3208	3	3157.94786	2939.08013	H6N6F3S1								
39	1053.3208	3	3157.94786	2939.08013	H6N6F3S1								
40	1033.9791	3	3099.92276	2881.03823	H6N5F2S2								

Tablica 4.3 Skupina 48h – pretpostavljene strukture dominantnih kompozicija po frakcijama

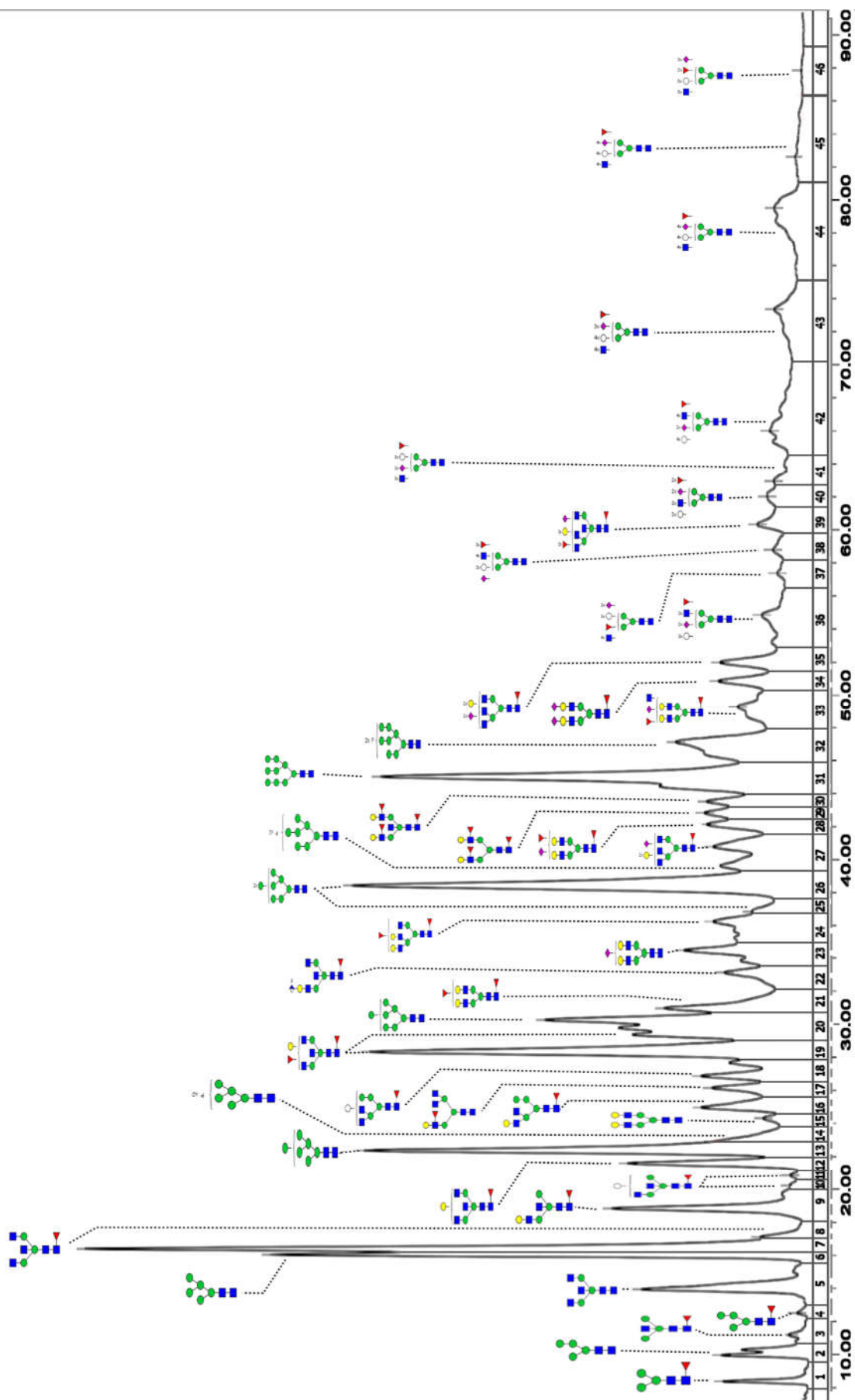
Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
1	1276.4719	1	1276.47190	1057.39293	H3N2F1		15	930.7906	2	1860.57393	1641.59943	H5N4	
2	1292.4396	1	1292.43960	1073.38783	H4N2		16	1003.8090	2	2006.61073	1787.65733	H5N4F1	
3	740.2431	2	1479.47893	1260.47233	H3N3F1		17	1024.3197	2	2047.63213	1828.68393	H4N5F1	
4	719.7285	2	1438.44973	1219.44573	H4N2F1		18	1003.8090	2	2006.61073	1787.65733	H5N4F1	
5	870.2854	2	1739.56353	1520.57323	H3N5		19	1097.3356	2	2193.66393	1974.74183	H4N5F2	
6	727.7349	2	1454.46253	1235.44063	H5N2		20.1	1097.3356	2	2193.66393	1974.74183	H4N5F2	
7	943.3071	2	1885.60693	1666.63113	H3N5F1		20.2	889.7679	2	1778.52853	1559.54623	H7N2	
8	943.3071	2	1885.60693	1666.63113	H3N5F1		21	1076.8330	2	2152.65873	1933.71523	H5N4F2	
9	922.7931	2	1844.57893	1625.60453	H4N4F1		22	1152.3021	2	2303.59693	2084.67282	H4N5F1Sulph1 HexA1	
10	922.7931	2	1844.57893	1625.60453	H4N4F1		23	1169.8479	2	2338.68853	2119.77933	H4N5F1S1	
11	922.7931	2	1844.57893	1625.60453	H4N4F1		24	1178.3561	2	2355.70493	2136.79463	H5N5F2	
12	1024.3197	2	2047.63213	1828.68393	H4N5F1		25	970.7789	2	1940.55053	1721.59903	H8N2	
13	808.7451	2	1616.48293	1397.49343	H6N2		26	970.7789	2	1940.55053	1721.59903	H8N2	
14	807.7402	2	1614.47312	1395.37323	H5N2Phos2		27.1	969.7720	2	1938.53672	1719.47883	H7N2Phos2	

Tablica 4.3 (Nastavak)

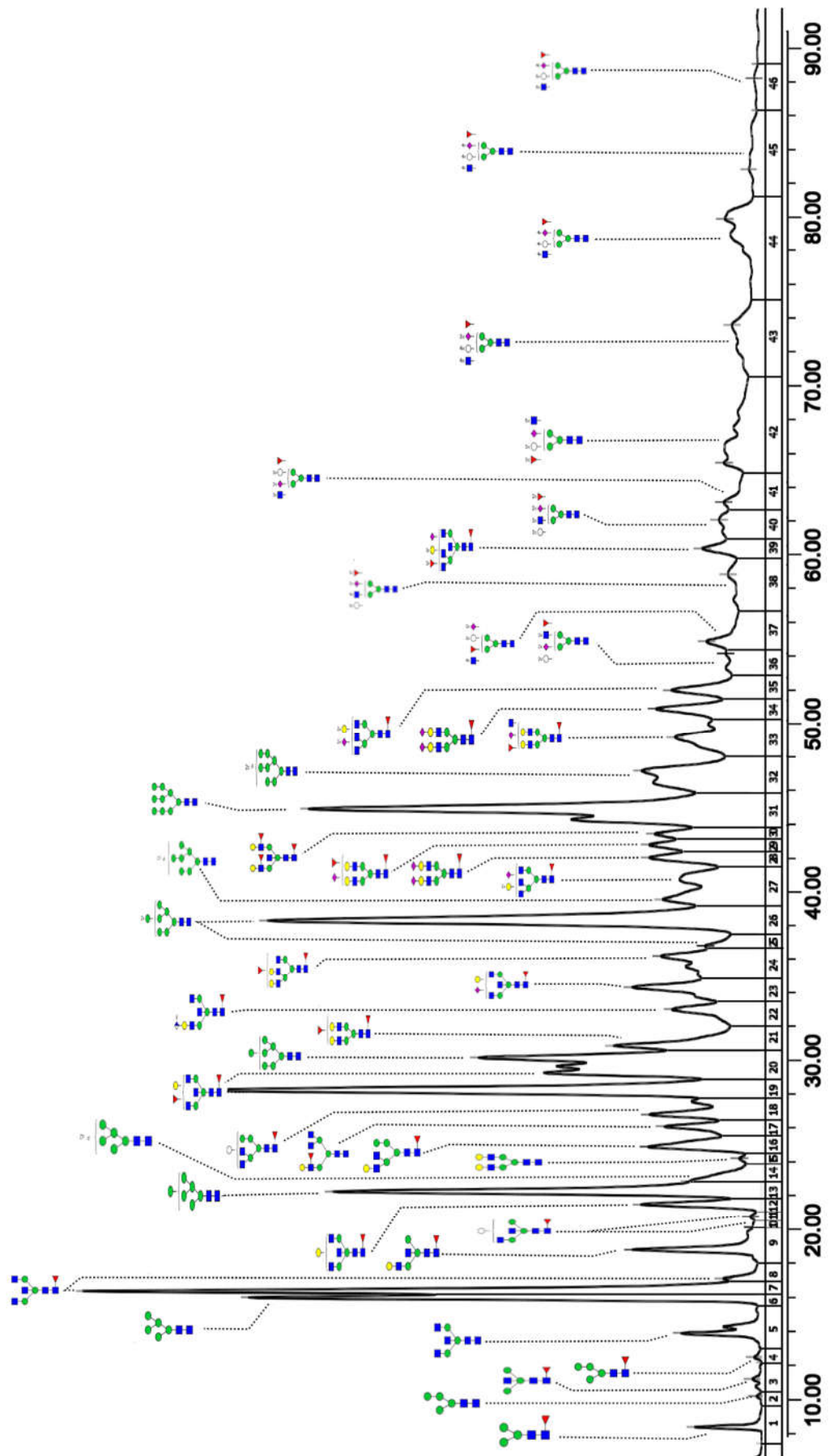
Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH] ⁺ (Da)	Teorijski [MH] ⁺ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH] ⁺ (Da)	Teorijski [MH] ⁺ (Da)	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
27.2	1250.8612	2	2500.71513	2281.83213	H5N5F1S1		41	1082.2959	3	3244.87316	3026.07573	H6N5F1S3	
28	1294.8724	2	2588.73753	2369.84813	H5N4F1S2		42	1120.9807	3	3360.92756	3142.15953	H6N7F3S1	
29	1222.3499	2	2443.69253	2224.81063	H5N4F2S1		43	1203.9898	3	3609.95486	3391.20793	H7N6F1S3	
30	1251.3705	2	2501.73373	2282.85253	H5N5F3		44	1301.0037	3	3900.99656	3682.30333	H7N6F1S4	
31	1051.7917	2	2102.57613	1883.65183	H9N2		45	1301.0037	3	3900.99656	3682.30333	H7N6F1S4	
32	1050.7872	2	2100.56713	1881.53163	H8N2Phos2		46	1422.6689	3	4265.99216	4047.43553	H8N7F1S4	
33	882.9212	3	2646.74906	2427.89003	H5N5F2S1								
34	1294.8568	2	2588.70633	2369.84813	H5N4F1S2								
35	931.2567	3	2791.75556	2572.92753	H5N5F1S2								
36	985.2720	3	2953.80146	2734.98033	H6N5F1S2								
37	1052.9667	3	3156.88556	2938.05973	H6N6F1S2								
38	1101.6332	3	3302.88506	3084.11763	H6N6F2S2								
39	1053.2925	3	3157.86296	2939.08013	H6N6F3S1								
40	1033.9510	3	3099.83846	2881.03823	H6N5F2S2								



Slika 4.3 Anotirani kromatogram: HILIC-UPLC N-glikoprofil korteksa odraslog štakora



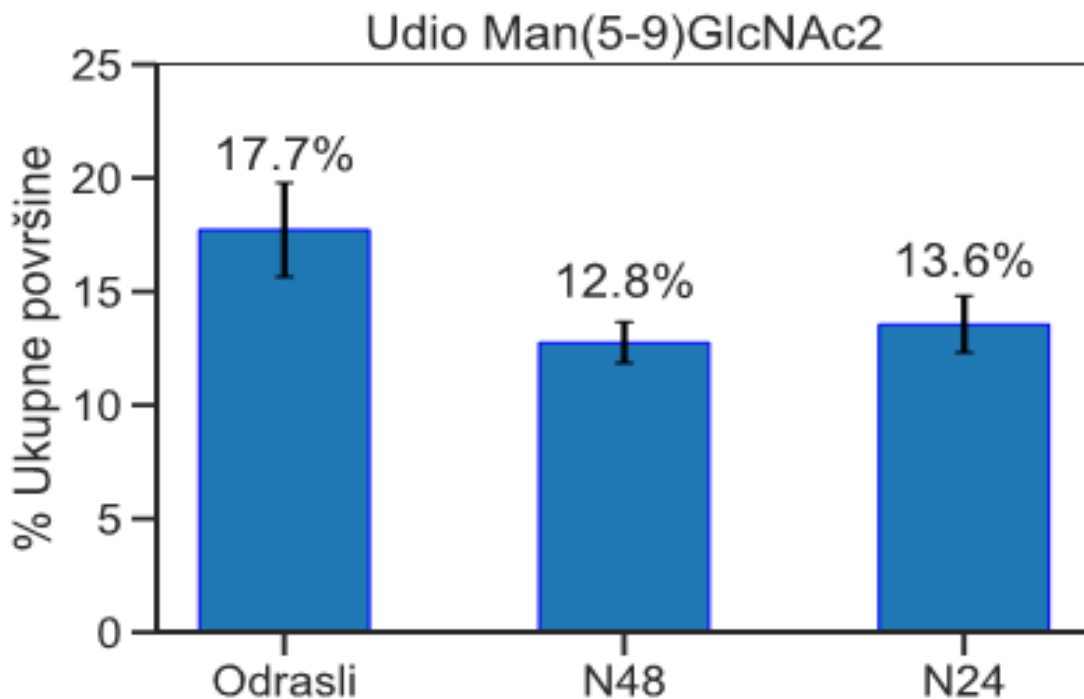
Slika 4.4 Anotirani kromatogram: HILIC-UPLC N-glikoprofil mozga štakora starog 24h



Slika 4.5 Anotirani kromatogram: *HILIC-UPLC N-glikoprofil mozga štakora starog 48h*

4.3 Udio oligomanoznih struktura

Relativno visok udio oligomanoznih struktura jedna je od glavnih karakteristika N-glikopfila mozga. Pregledom literature utvrđeno je da se koncentracija oligomanoznih ($\text{Man}_{(5-9)}\text{GlcNAc}_2$) struktura iznosi oko 15% ukupnih N-glikana mozga (Chen i sur., 1998). Udio oligomanoznih struktura u profilu svake skupine uzoraka u ovom istraživanju slaže se s ovom činjenicom. **Slika 4.4** prikazuje stupičasti dijagram ukupnog udjela oligomanoznih struktura u N-glikoprofilu pojedinog uzorka

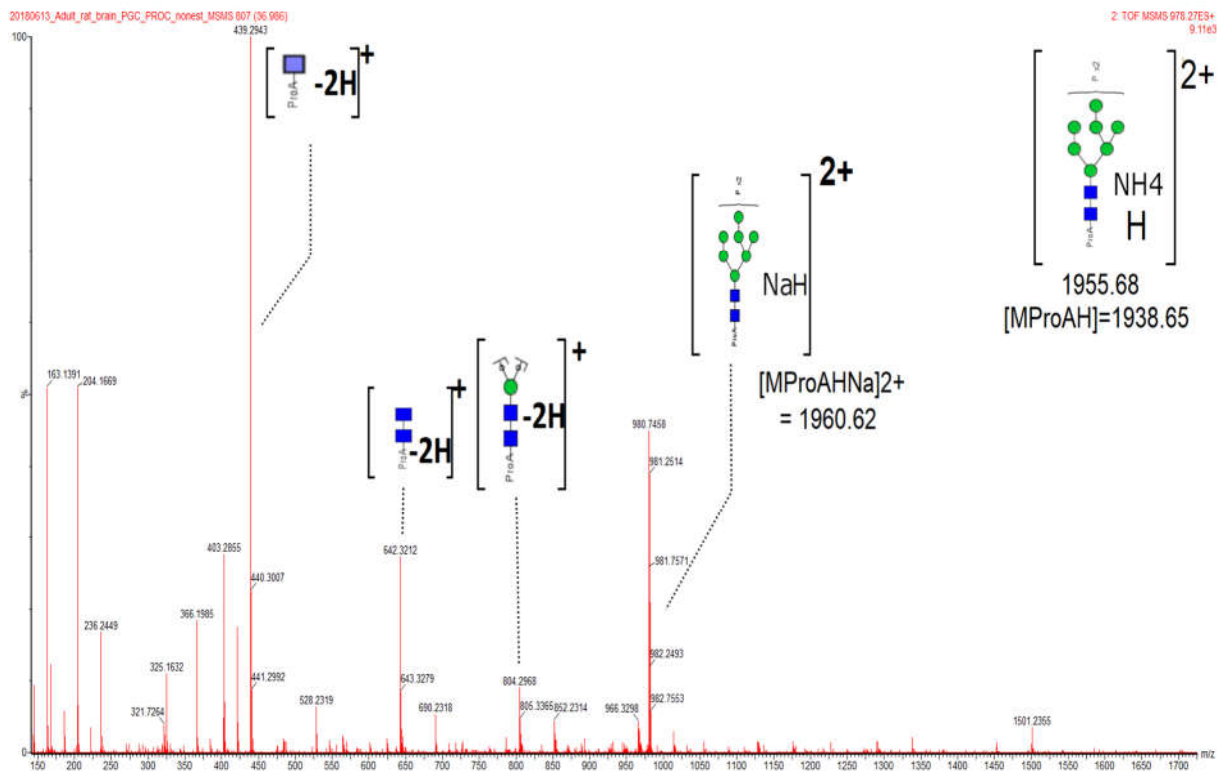


Slika 4.6 Udio oligomanoznih $\text{Man}_{(5-9)}\text{GlcNAc}_2$ struktura u pojedinim skupinama

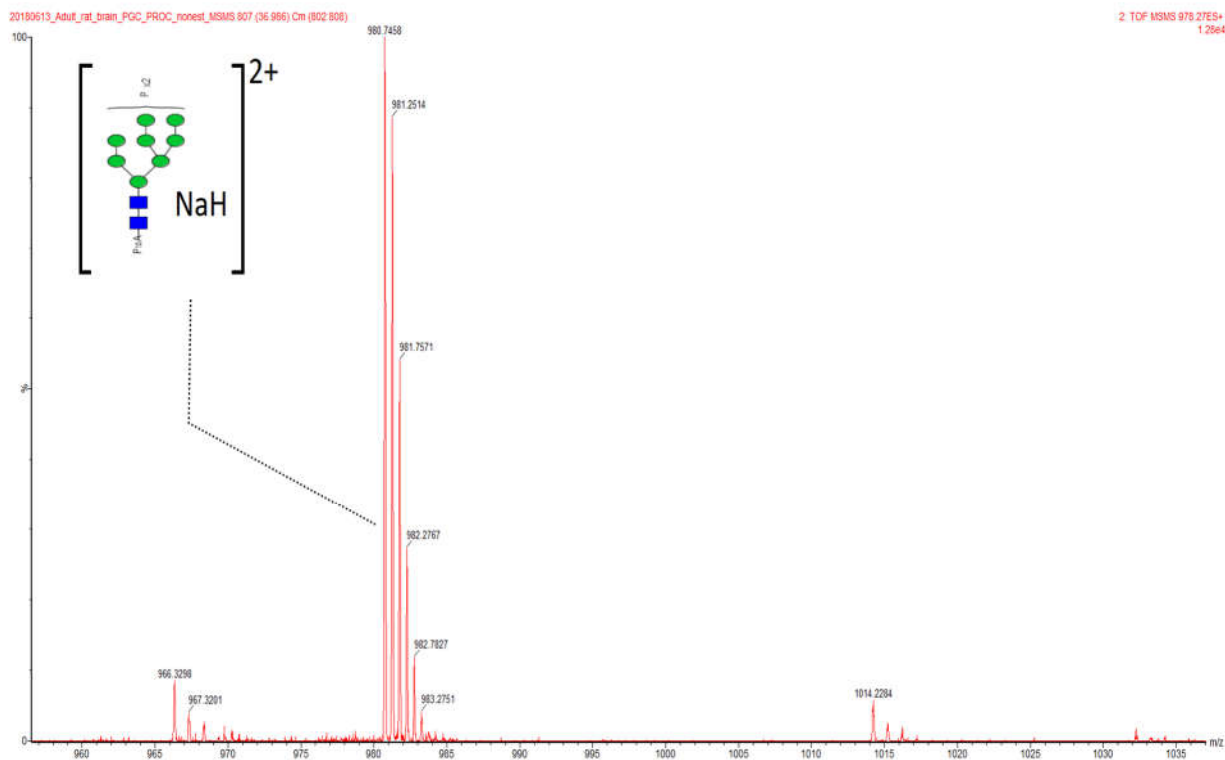
Posebno je zanimljiva činjenica da se udio navedenih struktura u mozgu odraslih jedinki statistički značajno razlikuje ($p < 0.05$, korigirano prema *Bonferroniju*) od udjela u mlađim jedinkama ($p = 0.00991$ za skupinu 24h, $p = 0.00847$ za skupinu 48h). Ovaj rezultat može ukazivati na važnost oligomanoznih struktura u neurološkim procesima, no zbog prirode istraživanja (*dostupne informacije odnose se isključivo na N-glikane, a ne na N-glikoproteine*) nije moguće raspravljati o specifičnim implikacijama ovog rezultata. Također, u ovom slučaju čimbenik vremena je ključan – moguće je da jedinke trebaju doseći određenu starost kako bi se uspostavile potrebne razine oligomanoznih struktura, posebice u korteksu mozga.

4.4 Specifičnosti fosforiliranih N-glikana pri sudarom izazvanoj disocijaciji (CID)

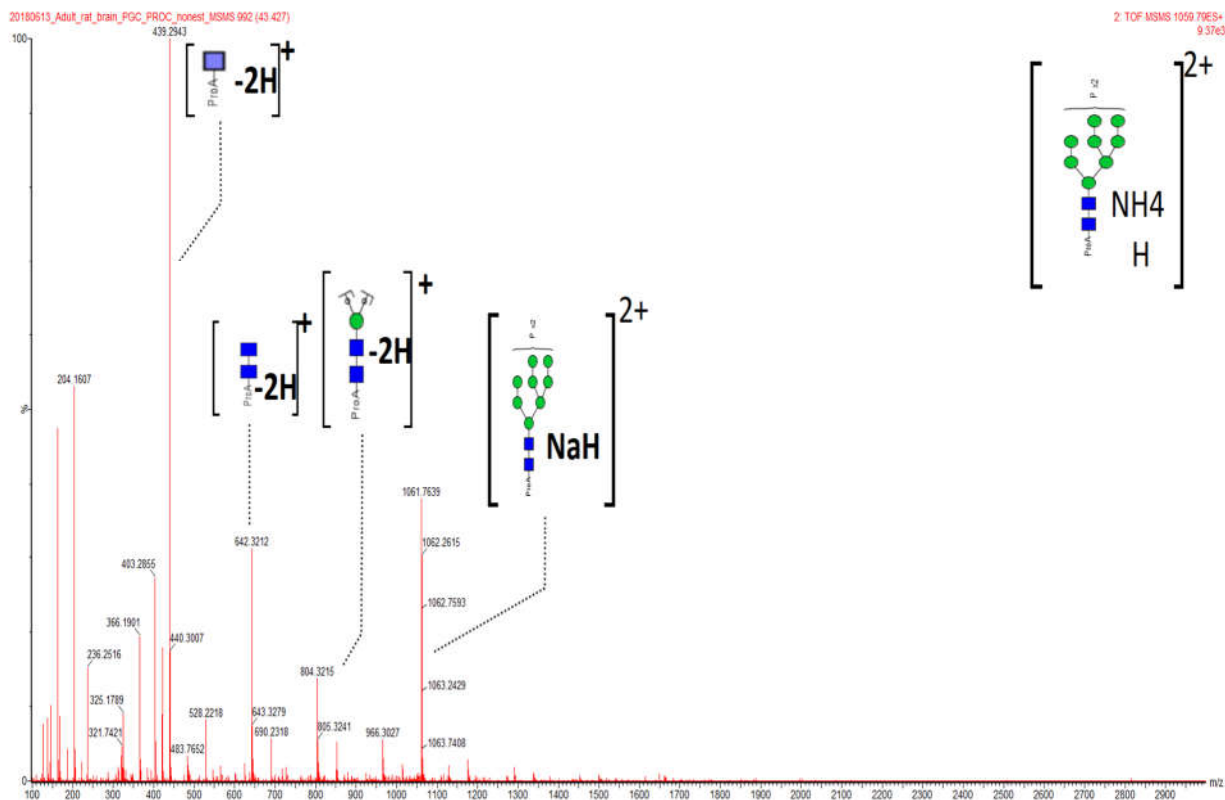
Molekule koje su prema *Glycomod* mrežnom alatu svojim m/z vrijednostima odgovarale fosforiliranim N-glikanima pokazivale su određene specifičnosti pri fragmentacijskoj analizi. Kod ovih kompozicija u literaturi navodi se *reakcija neutralne izmjene* jednog ili više protona fosfatne skupine jednakim brojem iona natrija ili kalija. Ova reakcija ne mijenja stanje naboja molekule, a opisana je u (Khoo i Yu, 2010; Harvey i Bousfield, 2005). U ovom radu primijećena je sklonost asociiranja ovih molekula s NH_4^+ ionima (mobilna faza sadrži NH_4COOH 50mM). Pri proučavanju fragmentacijskih spektara uočeno je nekoliko anomalija koje mogu ometati analizu i dovesti do krivih zaključaka o strukturi (ili čak kompoziciji molekule). **Slike 4.7, 4.8, 4.9** Prikazuju primjer fragmentacijskih spektara kontroverznih molekula. Iz slika je vidljivo da neki od fragmenata koji sadrže vezani fluorofor (prokainamid) pokazuju gubitak mase od 2 Da (ekvivalent 2 H). Usto, vidljiva je velika količina nefragmentirane molekule u stanju naboja 2+ koja prema izračunima odgovara nefragmentiranoj molekuli koja je vezala dodatni Na. Prema (Harvey, 2000) moguće je odvijanje različitih kemijskih reakcija na sržnim GlcNAc u blizini vezanog fluorofora pri uvjetima ESI(+), međutim gubitak od 2 Da (ekvivalent 2 H) nije naveden kao jedan od rezultata. Moguće je da se ova pojava javlja uslijed nedovoljno prilagođene razine kolizijske energije za ovaj tip molekula. Također, valjda spomenuti da fosforilirani glikani oligomanoznog tipa pri kromatografskoj analizi obično eluiraju gotovo neposredno nakon oligomanoznih glikana njima vrlo bliske mase (Tablice 4.1, 4.2, 4.3 – frakcije 26 i 27.1 kao primjer) s razlikom masa između moguće fosforiliranih struktura i oligomanoznih struktura oko 2 Da, stoga nije moguće sa potpunom sigurnošću isključiti fragmentaciju oligomanoznih glikana unutar izvora iona (gubitak ekvivalenta 2 H) zbog nedovoljno prilagođenih uvjeta pri analizi masenim spektrometrom. U svim rezultatima prikazanim u ovom radu, kontroverzne kompozicije koje opisuje ovo poglavlje smatrane su fosforiliranima.



Slika 4.7 Fragmentacijski spektar fosforilirane strukture. *Fragmenti 439.294, 642.3212, 804.2968 su za 2 Da lakši od očekivanih masa prisutnih u spektrima ostalih molekula. 980.7458 – velika količina nefragmentirane molekule s dodatnim vezanim Na+ (Slika 4.6 daje uvećani prikaz).*



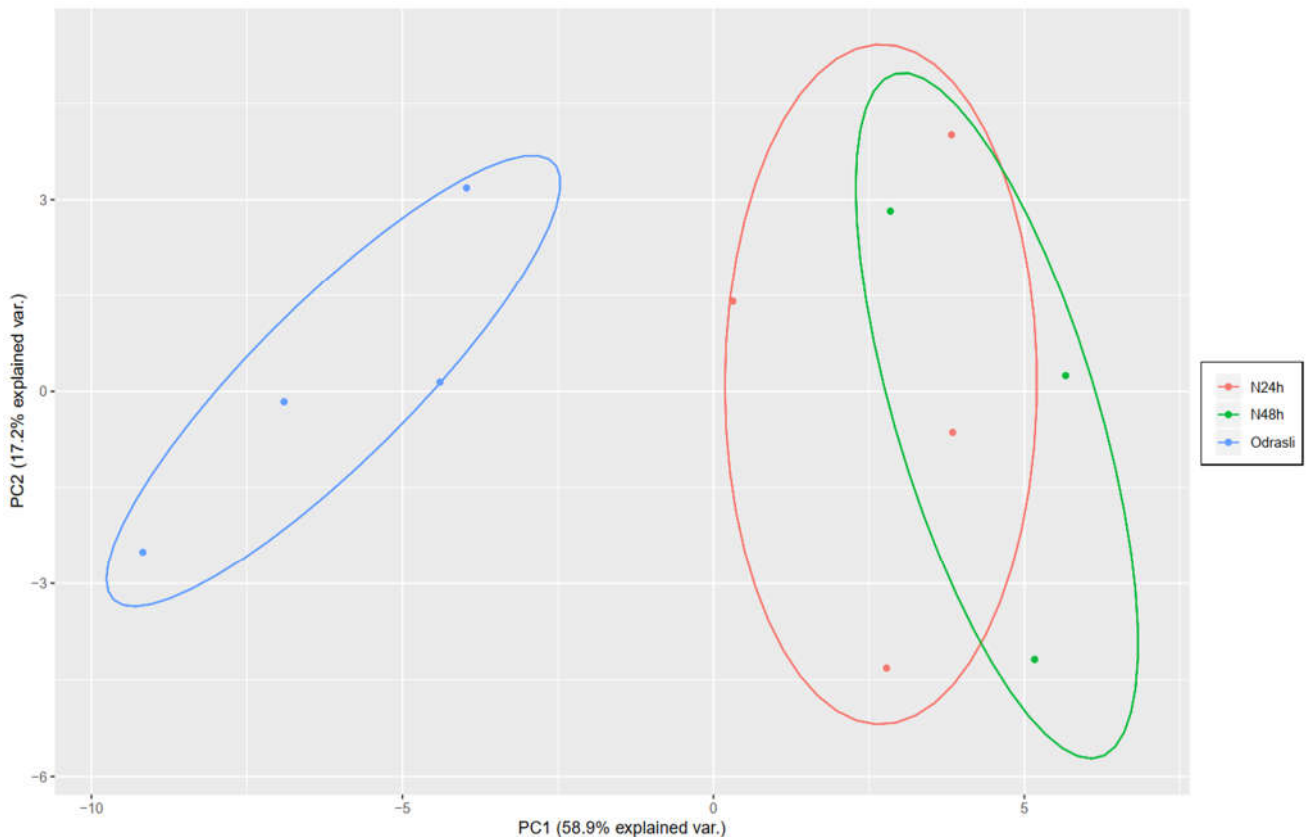
Slika 4.8 Uvećani prikaz $m/z = 980.7458$ ($[MProAHNa]^{2+}$)



Slika 4.9 Dodatni primjer kontroverzne strukture. *Problematika je jednaka onoj opisanoj na slici 4.7.*

4.5 Rezultati analize glavne komponente

Postupak analize glavne komponente (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) izvršen je na \log_2 -transformiranim vrijednostima površina dobivenih integracijom HILIC-UPLC-FLR kromatograma. PCA je operacija redukcije dimenzionalnosti podataka koja se u širem smislu koristi uklanjanjem dimenzija koje su visoko korelirane. Grafički prikaz rezultata daje **Slika 4.10**.



Slika 4.10 Grafički prikaz rezultata PCA. Ističe se razdvajanje skupine odraslih uzoraka (plavo) od skupina koje sačinjavaju mlade životinje (24h – zeleno, 48h - narančasto). Pojedini uzorak označen je točkom pripadajuće boje, a skupina je istaknuta elipsom pripadajuće boje.

U ovom slučaju rezultati PCA zbog specifičnosti grupiranja (**Slika 4.10**) mogu upućivati na postojanje razlika među ispitivanim skupinama - čak i pri malom broju dostupnih uzoraka očito je razdvajanje odraslih od mladih jedinki - no iz ovih rezultata nije moguće utvrditi što čini razliku među ispitivanim skupinama. Iz navedenih razloga ovaj rezultat treba, u najboljem slučaju, smatrati tek sugestivnim.

4.6 Statistički značajne razlike između skupina

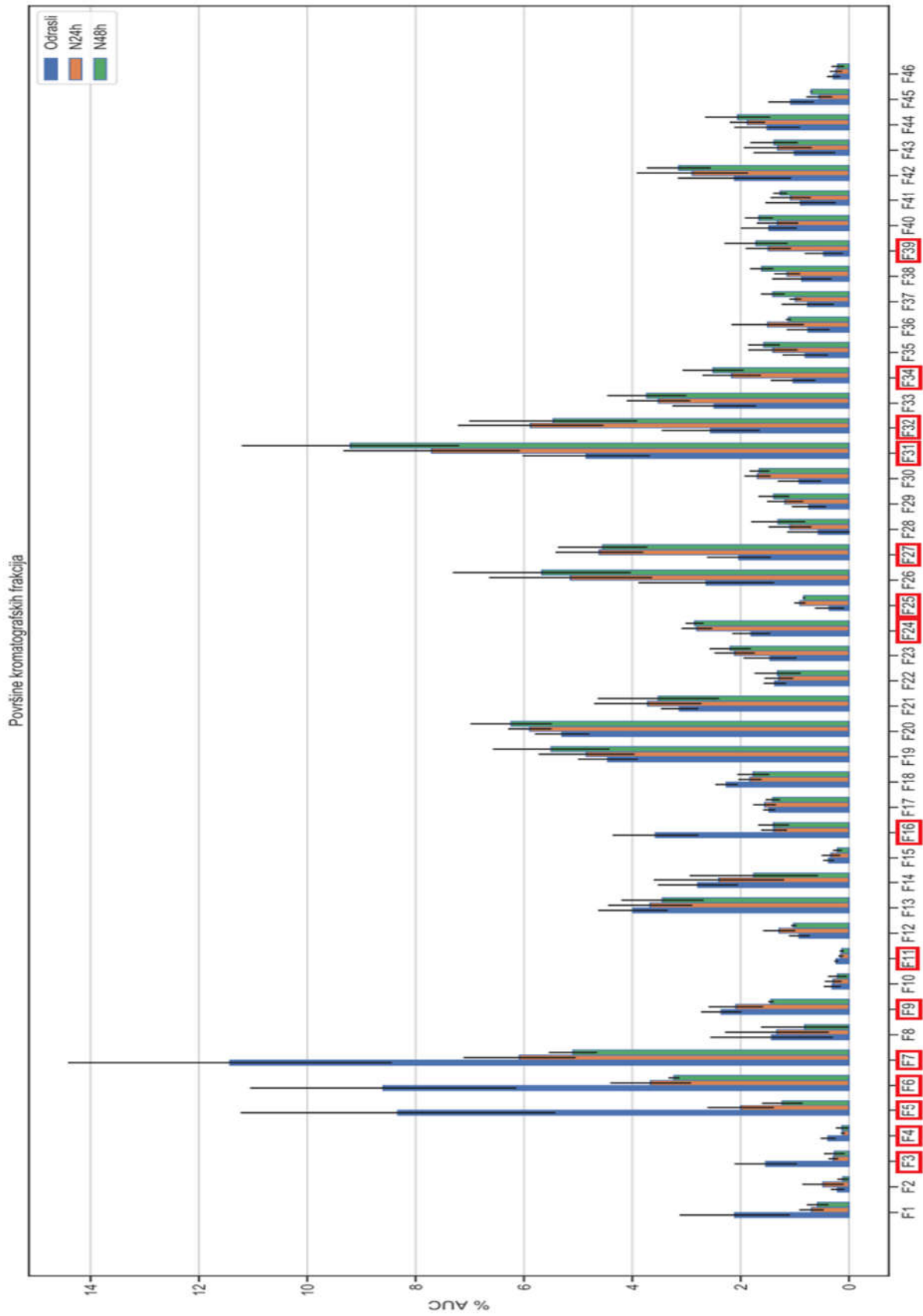
Slika 4.11 prikazuje stupičaste dijagrame udjela pojedine frakcije u ukupnoj površini ispod krivulje kromatograma za sve tri skupine uzoraka. Ovakav prikaz može pojednostaviti tumačenje rezultata. Frakcije za koje je utvrđena statistički značajna razlika uokvirene su crvenom bojom.

Utvrđivanje statistički značajnih razlika između skupina izvršeno je na \log_2 -transformiranim vrijednostima površina dobivenih integracijom HILIC-UPLC-FLR kromatograma pomoću *T-testova* (dvostrani, nezavisni). Uspoređivane su površine svake pojedinačne frakcije (46 frakcija) između *odrasle skupina* i *skupine 24h* te *odrasle skupine* i *skupine 48h*. Za korekciju rezultata višestrukih testiranja (engl. *Multiple Testing Correction*) korištena je FDR metoda (engl. *False Discovery Rate*, FDR).

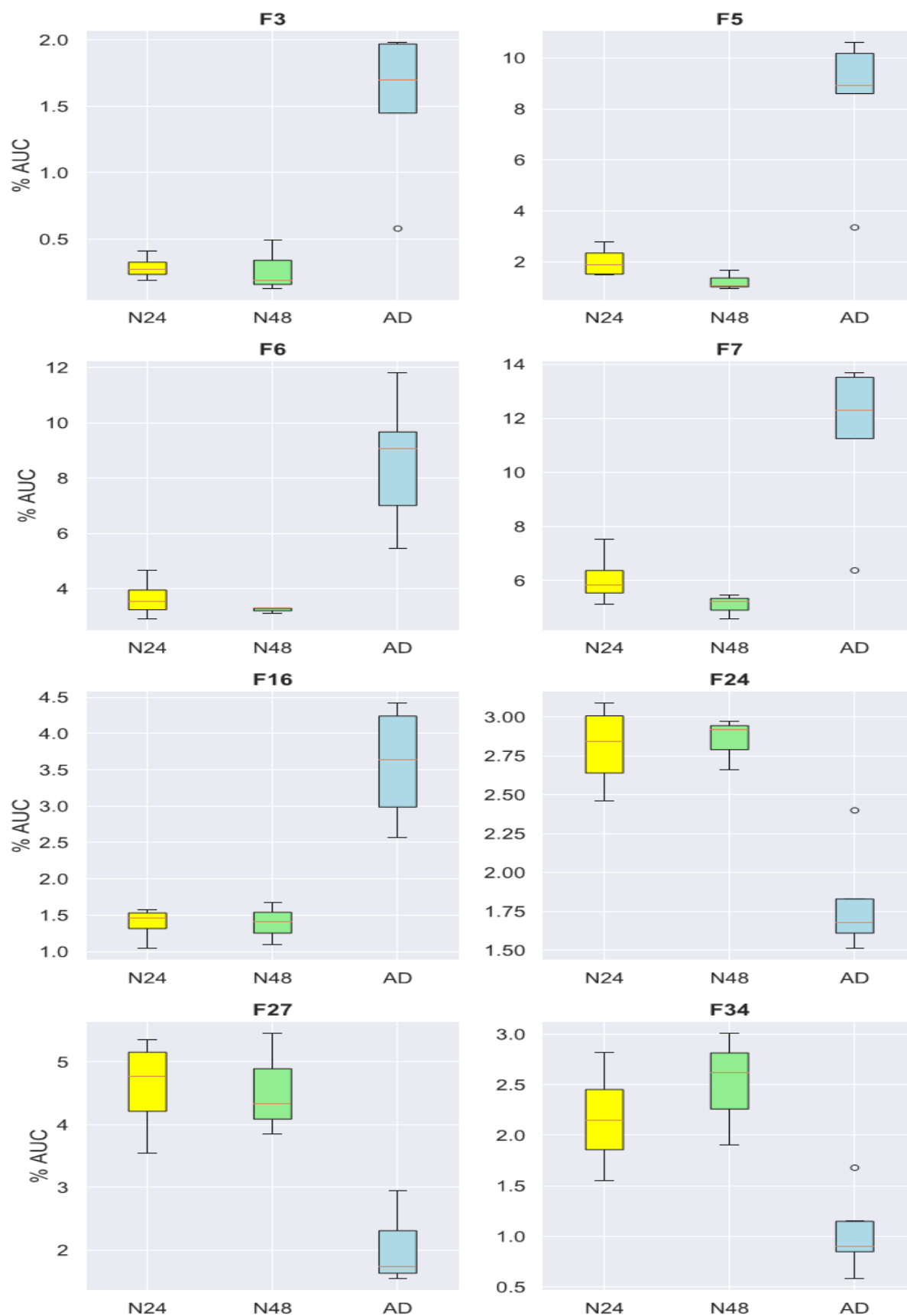
Rezultati ukazuju na statistički značajne razlike između *odrasle skupine* i *skupine 24h* u frakcijama: 3, 4, 5, 6, 7, 16, 24, 25, 27, 32, 34 i 39 (ukupno 12); između *odrasle skupine* i *skupine 48h* u frakcijama: 3, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 24, 27, 31, 34 (ukupno 11). Frakcije statistički značajno različite za obje skupine ispitivanja su: 3, 5, 6, 7, 16, 24, 27, 34 (ukupno 8). **Tablica 4.4** prikazuje statistički značajno različite frakcije između skupina uzoraka. Zbog malog broja uzoraka važno je *veličinu učinka* razmatrati s rezervom. *Hedgesova g* vrijednost prikazuje omjer razlike srednjih vrijednosti mjerenja i ukupne standardne devijacije mjerenja, korigirano za mali broj uzoraka (korištena formula nalazi se u dodatku).

Tablica 4.4 Statistički značajno različite frakcije između uzoraka. Negativan predznak *veličine učinka* znači da je srednja vrijednost pojedine frakcije veća u *skupini 24h* i *skupini 48h*, pozitivan predznak označava veće vrijednosti u *odrasloj skupini*. *Veličina učinka* odnosi se na standardiziranu razliku srednjih vrijednosti frakcija po skupinama. Crvenom bojom označene su kompozicije koje sadržavaju sržnu Fuc, zelenom oligomanozne, plavo strukture s antenarnom i sržnom Fuc, bijelo fosforilirane strukture, ljubičasto strukture s jednom ili više Neu5Ac.

Frakcija	Kompozicija			Odrasla skupina vs skupina 24h ($p < 0.05$)		Odrasla skupina vs skupina 48h ($p < 0.05$)	
	Odrasli	24h	48h	p (FDR korigirano)	Veličina učinka (Hedgesov g)	p (FDR korigirano)	Veličina učinka (Hedgesov g)
3	H3N3F1			0.02	2.22	0.033	1.96
4	H4N2F1			0.02	1.96	-	-
5	H3N4F1	H3N5		0.02	2.22	0.02	2.24
6	H5N2			0.021	2.01	0.021	2.01
7	H3N5F1			0.046	1.77	0.04	1.94
9	H4N4F1			-	-	0.027	2.25
11	H4N4F1			-	-	0.46	1.93
16	H4N4F2 H5N4F1	H5N4F1		0.02	2.76	0.02	2.45
24	H5N5F2			0.027	-2.41	0.033	-2.59
25	H8N2			0.046	-1.97	-	-
27	H7N2Phos2 H5N4F2S1			0.02	-2.91	0.028	-2.79
31	H9N2			-	-	0.043	-2.17
32	H5N6F2S1	H8N2Phos2		0.033	-2.33	-	-
34	H5N4F2S2 H5N4F1S3 H5N4F1S2 H5N6F3	H5N4F1S2		0.046	-1.87	0.046	-2.37
39	H6N6F3S1			0.045	-2.1	-	-



Slika 4.11 Površine kromatografskih frakcija predstavljene kao stupićasti dijagrami. Statistički značajno različite frakcije uokvirene su crvenom bojom.



Slika 4.12 Kutijasti dijagrami statistički značajno različitih frakcija između skupina. Frakcije su označene s F uz pripadajući broj frakcije. N24 – skupina 24h (žuto), N48 – skupina 48h (zeleno), AD – odrasla skupina (plavo). Dodatni prikazi u poglavlju 8.Prilozi.

Frakcije koje su se pokazale statistički značajno različite između *odrasle skupine* i *skupine 24h* te *odrasle skupine* i *skupine 48h* pomnije su analizirane. Pregledom rezultata (**Tablica 4.4**) utvrđeno je da u frakcijama 3, 5, 6, 7, 24 dolazi do promjene količine dominantne komponente u frakciji između skupina, dok u frakcijama 5, 16, 27 i 34 osim do promjene količine N-glikana (iskazano površinom ispod krivulje) dolazi i do promjene u relativnom omjeru komponenti u frakciji – **Slike 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17**.

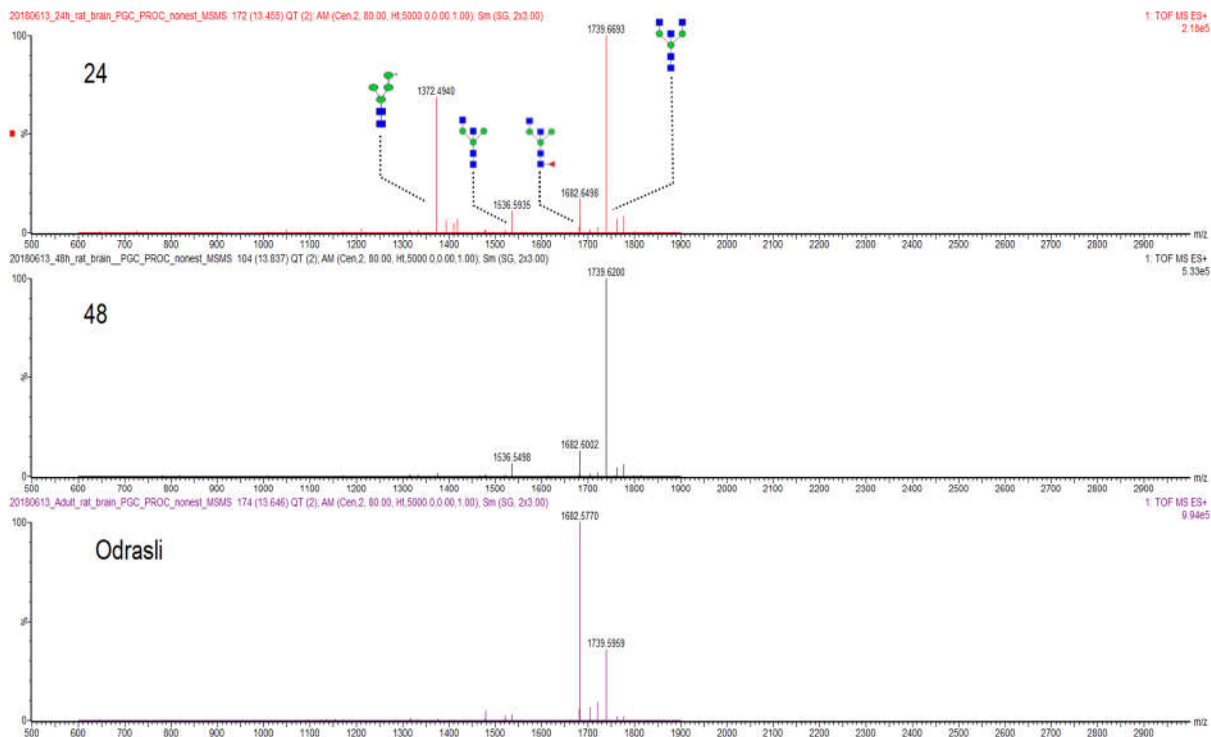
Rezultati nalažu da se u frakciji 5 u *odrasloj skupini* kao dominantna struktura nalazi N-glikan kompozicije **H3N4F1** (kompleksni tip, sržno fukoziliran), dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira N-glikan kompozicije **H3N5** (kompleksni tip) (**Slika 4.13**).

U frakciji 16 u *odrasloj skupini* dvije su kompozicije N-glikana prisutne u približno jednakom omjeru: **H4N4F2** (kompleksni tip) i **H5N4F1** (kompleksni tip), dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira kompozicija **H5N4F1** (kompleksni tip). U svim skupinama u frakciji 16 prisutna je kompozicija **H3N5F1** (kompleksni tip, antenarna fukozilacija). **Slika 4.14** prikazuje razlike među skupinama u frakciji 16. Potpuni izostanak kompozicije **H4N4F2** u *skupini 24h* i *skupini 48h* može objasniti statistički značajno smanjenje površine frakcije 16 u *skupini 24h* i *skupini 48h*.

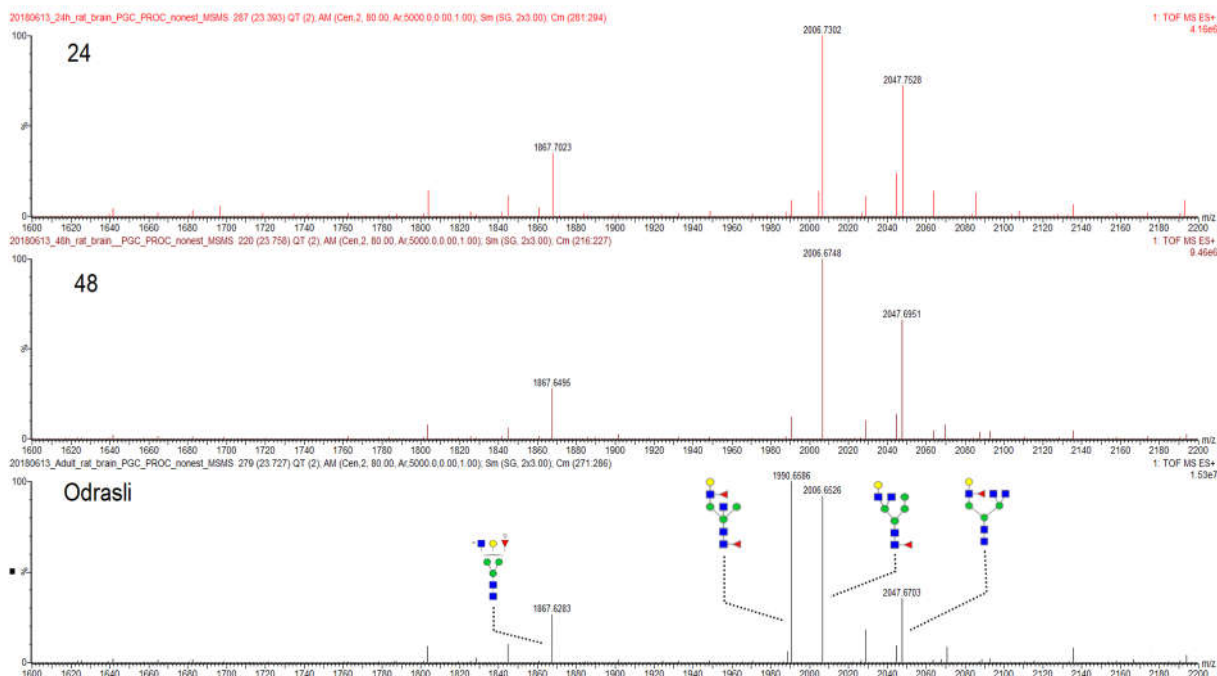
U frakciji 27.1 u *odrasloj skupini* dominira kompozicija **H7N2Phos2**, uz značajnu prisutnost **H6N4F2** (kompleksni ili hibridni tip, sržna i antenarna fukozilacija) dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira kompozicija **H7N2Phos2** uz primjetno niži udio **H6N4F2** (**Slika 4.15**).

U frakciji 27.2 (**Slika 4.16**) u svim skupinama dominira kompozicija **H5N5F1S1** (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna fukozilacija) uz promjenjivi udio **H5N4F2S1** (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna i antenarna fukozilacija).

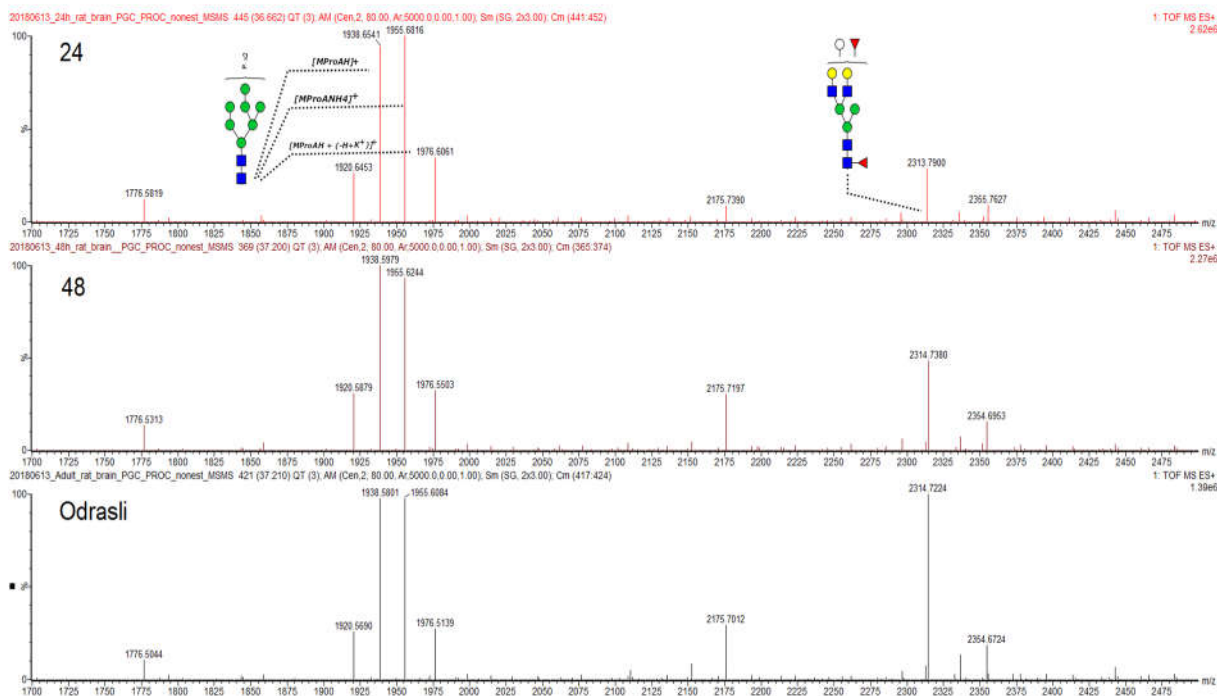
U frakciji 34 u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominantna je kompozicija **H5N4F1S2** dok se u *odrasloj skupini* ističu 4 kompozicije: 1. **H5N4F2S2** (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna i antenarna fukozilacija), 2. **H5N4F1S3** (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna fukozilacija), 3. **H5N4F1S2** (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna fukozilacija) i 4. **H5N6F3** (kompleksni tip, sržna i antenarna fukozilacija). Površina frakcije 34 u *odrasloj skupini* značajno je niža od površine navedene frakcije u *skupini 24h* i *skupini 48h* (**Slika 4.10**). Razlika u površinama frakcije 34 među skupinama uzoraka može se objasniti smanjenjem količine kompozicije **H5N4F1S2** u korteksu odraslog štakora što rezultira detekcijom 4 različite kompozicije u približno jednakim omjerima prilikom tumačenja masenih spektara (**Slika 4.17**).



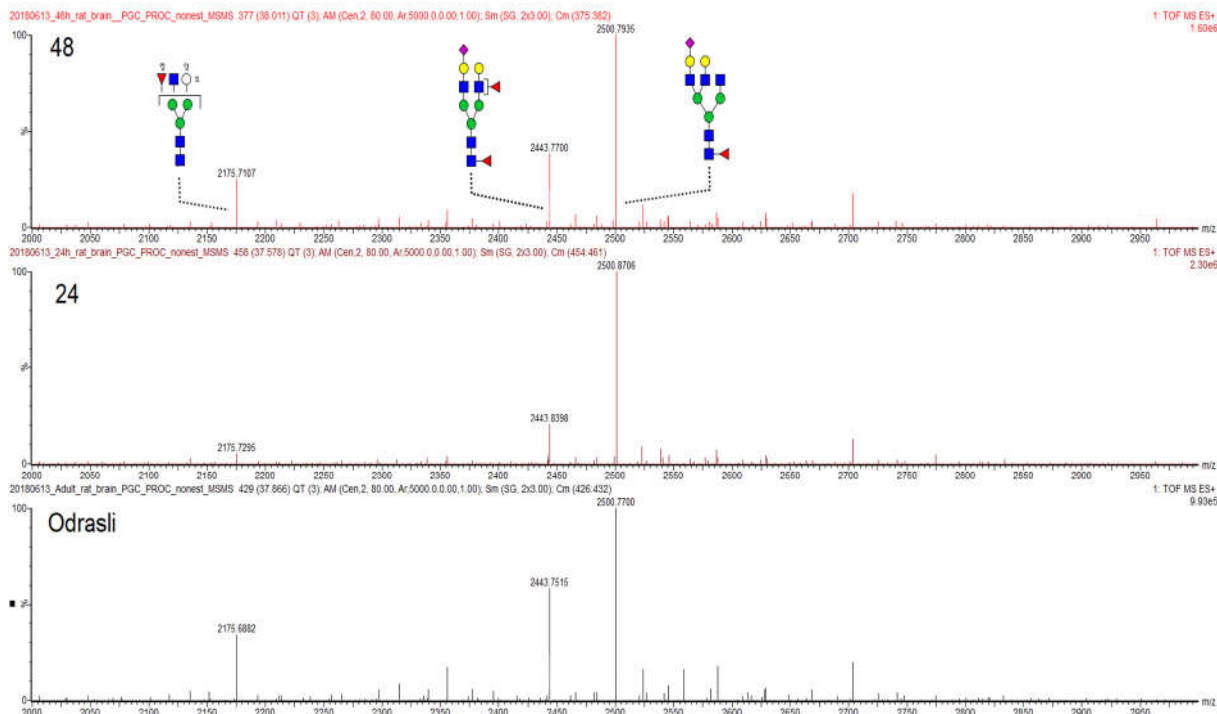
Slika 4.13 Frakcija 5. Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.



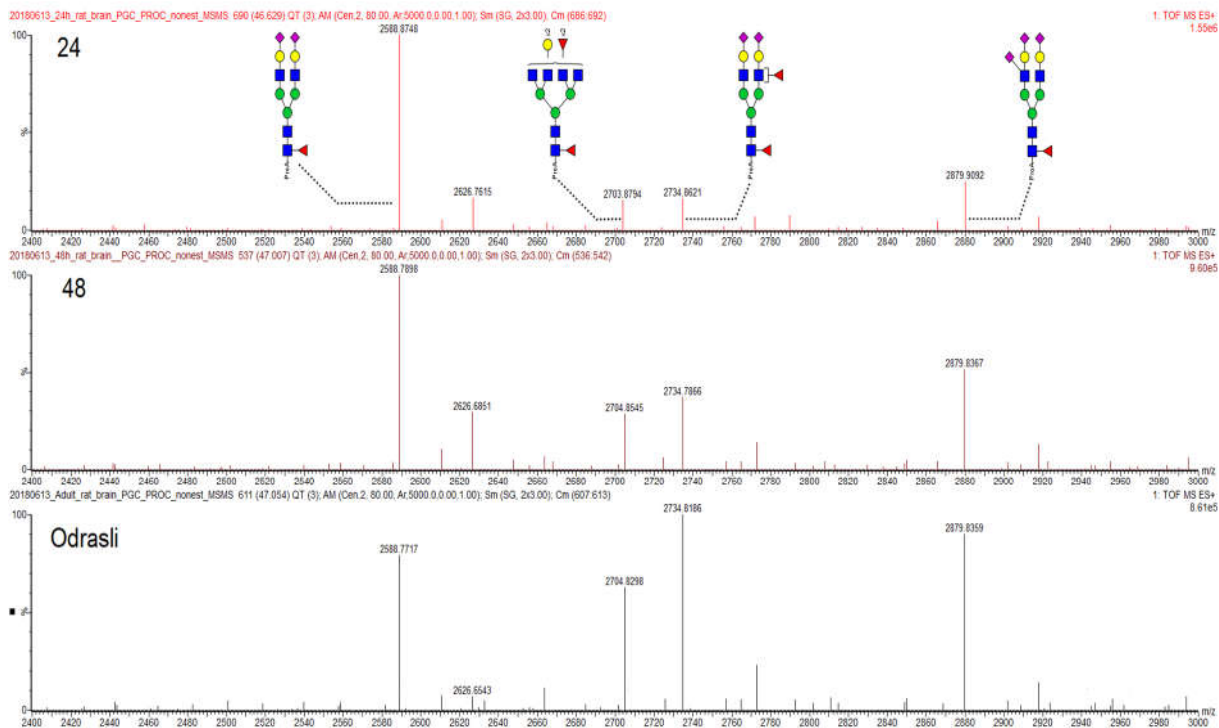
Slika 4.14 Frakcija 16. Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.



Slika 4.15 Frakcija 27.1. Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.



Slika 4.16 Frakcija 27.2. Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.



Slika 4.17 Frakcija 34. Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.

4.7 Biološko tumačenje statistički značajnih razlika

Sudeći prema posljednjim trendovima u neuroglikobiološkim istraživanjima, interes za uloge pojedinih sijaloglikana sve je veći. U nedavim pregledima literature (Scott i Panin, 2014) naglašeni su napori mnogih znanstvenih skupinama usmjereni ka otkrivanju uloga upravo ovih struktura, ali najveći interes iskazan je zapravo za polisijalinizirane strukture (Angata i sur., 2007; Weinhold i sur., 2005) koje čini se imaju mnoge regulatorne uloge u živčanom sustavu, posebice u modulaciji proteina uključenih u prijenos signala unutar živčanog sustava (naponom regulirani ionski kanali, receptori za neuroprijenosnike) te staničnoj migraciji i adheziji (Scott i Panin, 2014; Angata i sur., 2007; Weinhold i sur., 2005). Zbog raznolikosti sijaliniziranih struktura N-glikana nije moguće isključiti važnost specifičnih sijaliniziranih struktura ne-polisijalinskog tipa, neke od kojih su spomenute i u ovom radu.

U istraživanju (Torii i sur., 2014) vršenom na korteksu miševa u različitim stadijima razvoja utvrđeno je da se u mišjem neuroglikomu antenarna sijalinska kiselina dominantno pojavljuje vezana za $\beta(1-4)$ galaktozu antene tipa 2 u $\alpha(2-3)$ ili $\alpha(2-6)$ konfiguraciji veze. Osim toga utvrđena je pojava [Gal $\beta(1-3)$ {NeuAc $\alpha(2-6)$ }GlcNAc-] razgranate strukture poznate kao 6-sijalil Lewis C antigen. Autori smatraju da Gal $\beta(1-3)$ vezana na GlcNAc omogućava dodatnu modifikaciju GlcNAc dodatkom NeuAc u položaju 6 u alfa konfiguraciji. Njihovi rezultati pokazuju značajan porast ove strukture rijekom razvoja miša od embrionalnog dana 12 sve do starosti od 12 tjedana.

U štakora, za strukture koje nose NeuAc $\alpha(2-6)$ GlcNAc utvrđena je značajna prisutnost disijalil-Lewis C antigena [NeuAc $\alpha(2-3)$ -Gal $\beta(1-3)$ -{NeuAc $\alpha(2-6)$ }GlcNAc-] (Zamze, i sur., 1998), dok u kasnijem istraživanju (Torii i sur. 2014) aludiraju da su 6-sialil i disialil-Lewis C antigen noseće strukture prisutne u podjednakim razinama u korteksu miša i štakora što bi moglo implicirati istaknutu biološku ulogu ovih struktura – no, rezultati koji trebaju prikazati odnose ovih struktura još uvijek nisu dostupni široj javnosti.

U ovom istraživanju pronađena je razlika u neuroglikoprofilu štakora postnatalne dobi 24h i 48h i odraslih štakora u frakciji 34 koja sadrži antenarno sijalinizirane strukture sa dvije ili tri sijalinske kiseline. Ako je suditi prema rezultatima (Zamze i sur., 1998; Torii i sur., 2014) detektirana kompozicija H5N4F1S3 (**Slika 4.17**) mogla bi sadržavati barem jednu antenu koja nosi ranije spomenuti disijalil Lewis C antigen, dok kompozicije H5N4F1S2 i H5N4F2S2 vjerojatno sadržavaju [NeuAc $\alpha(2-6)$ Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc-] ili [NeuAc $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc-] skupine sa i/ili bez antenarno vezane fukoze.

Ovdje objavljeni rezultati mogu sugerirati veći doprinos struktura koje posjeduju razgranate, disialil Lewis C antigene u odrasloj dobi, dok u mladim životinja u razvoju dominiraju nerazgranate strukture sijalinizirane na terminalnim galaktozama što je u skladu s ranijim studijama. Omjer površine frakcije 34 koji se kreće oko 2:1 (mlade životinje : odrasle životinje) sugerira postupno, ali značajno smanjenje količine (a time i uloge) kompozicije H5N4F1S2 uz pomak prema razgranatim strukturama s višestruko supstituiranim GlcNAc (H5N4F2S2 – sialil Lewis X ili A, H5N4F1S3 – disialil Lewis C) tijekom sazrijevanja korteksa mozga štakora (**Slika 4.17, Slika 4.12 – F34**)

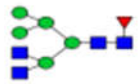
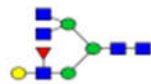

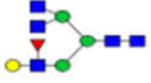
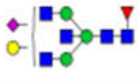



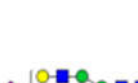

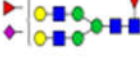
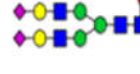
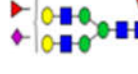
4.8 Kvalitativne razlike između skupina

Pregled kvalitativnih razlika u dominantnim kompozicijama između skupina prikazuje **Tablica 4.5.**

Posebno interesantna razlika pronađena je u frakciji 22 za koju statistički značajna razlika u površinama između skupina nije detektirana. U *odrasloj skupini* dominira N-glikan kompozicije H4N5F1S1, dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira kompozicija H4N5F1Sulph1HexA1 – N-glikan koji nosi HNK-1 antigen (CD57, 3-O-sulfo glukuronska kiselina (GlcA) vezana α 1-3 vezom na terminalnu Gal). Smatra se da se obrasci ekspresije ovog antigena mijenjaju tijekom razvoja živčanog sustava kralježnjaka. Ovaj antigen identificiran je kao sastavni dio O- ili N-glikana, proteoglikana i glikolipida.

Neuroglikoproteini koji za koje je ustanovljena prisutnost HNK-1 antigena uključuju: neuronalnu staničnu adhezijsku molekulu (engl. *Neuronal cell adhesion molecule*, NCAM), kontaktin, mijelin-asocirani glikoprotein (MAG), telenkefalin L1, telenkefalin P0. Također, smatra se da ovaj antigen može služiti kao ligand za laminin, L-selektin, P-selektin te cerebelarni adhezijski protein amfoterin. (Stanley i Cummings, 2017)

Tablica 4.5 Kvalitativne razlike frakcija između uzoraka.

	ODRASLI		N48		N24	
	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
17	HSN4F1		H4NSF1			
18	H4N4F2		HSN4F1			
22	H4N5F1S1		H4NSF1Sulph1HexA1			
23.1	H6N3F1		H4N5F1S1		HSN4S1	
23.2	H4N6F2					
28	HSN4F2S1		HSN4F1S2		HSN4F2S1	

Tablica 4.5 (Nastavak)

	ODRASLI		N48		N24	
	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Skraćena kompozicija	Predložena struktura	Skraćena kompozicija	Predložena struktura
29	HSN4F3		HSN4F2S1		HSN4F3	
32	HSN6F2S1		HBN2Phos2			
37	H6N5F2S1		H6N6F1S2			
38	HSN4F1S4		H6N6F2S2		H6N6F3S1	
41	H6N5F4		H6N5F1S3			
42	H6N6F1S3		H6N7F3S1		H7N6F1S2	
44	H7N6F4S1		H7N6F1S4			
45	H7N6F2S3		H7N6F1S4			
46	H7N6F1S4		HBN7F1S4		HBN7F2S3	

4.9 Osvrt na korištene metode

Slikovni prikazi kompozicija predstavljaju samo *predložene strukture*, one strukture koje bi navedena kompozicija mogla zauzeti s određenim stupnjem sigurnosti, sudeći prema poznatim putevima biosinteze N-glikana u endoplazmatskoj mrežici i Golgijevom aparatu. Za potpunu informaciju o strukturi potrebno je koristiti moćnije tehnike kao što je ESI u negativnom načinu rada ili MALDI-TOF čime bi se ostvarila značajno veća vjerojatnost fragmentacije unutar prstena monosaharida koji čine određenu kompoziciju što je moguće iskoristiti za razlučivanje konfiguracije pojedinih veza unutar molekule N-glikana. Osim toga, istraživanje se može poboljšati izolacijom isključivo N-glikana stanične površine (*u ovom istraživanju korišten je homogenat tkiva čime su obuhvaćani i glikani u različitim stadijima dorade u Golgijevom aparatu, a moguće i glikani u prisutni u drugim staničnim odjeljcima, npr lizosomski glikani*), provođenjem reakcije karboksietilacije čime bi se omogućilo razlikovanje α 2-6 i α 2-3 vezane sialinske kiseline te iterativnim postupcima analize nakon razgradnje N-glikanaspecifičnim egzoglikozidazama. Nedostatak ovog ispitivanja je mali broj uzoraka po skupinama što može negativno utjecati na statističke rezultate i dovesti do krivih zaključaka, no na taj čimbenik vrlo je teško utjecati zbog teškoća u nabavi ovog tipa tkiva.

5. Zaključci

U ovom radu slobodni N-glikani obilježeni prokainamidom analizirani su HILIC-UPLC-ESI-MS/MS metodom opisanom u poglavlju *Materijali i metode*. Rezultati kromatografske analize podijeljeni su u 46 različitih frakcija, a svakoj frakciji pomoću masenih spektara određen je kvalitativni sastav N-glikana (kompozicija). Identificirano je ukupno 87 različitih kompozicija kroz 3 skupine uzoraka. Od 46 frakcija, ukupno 15 frakcija (3, 4, 5, 6, 7, 16, 24, 25, 27, 32, 34 i 39 između *odrasle skupine* i *skupine 48h* - ukupno 12; 3, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 24, 27, 31 i 34 između *odrasle skupine* i *skupine 48h* - ukupno 11) pokazalo se različitim na statistički značajan način. Broj prisutnih N-glikanskih struktura u mozgu štakora vjerojatno je značajno veći od 87 navedenih kompozicija, no zbog male količine dostupnog tkiva, metode pripreme i malog volumena injekcije pri *on-line* analizi masenom spektrometrijom potpuna informacija o bogatstvu struktura ovog tipa tkiva nažalost nije dobivena.

Frakcije 5, 16, 27 i 34 osim statističkog značaja vjerojatno odražavaju određene biološki značajne i razvojno specifične karakteristike neuroglikoma korteksa mozga štakora. U frakciji 5 N-glikan kompozicije *H3N4F1* (antenarno fukozilirani kompleksni tip) predstavlja dominantnu kompoziciju u odraslih životinja, dok u korteksu mozga životinja postnatalne starosti 24 i 48 dominira N-glikan kompozicije H3N5. Ovaj pronalazak može implicirati promjenjivu razinu antenarne fukozilacije N-glikana molekulske masa < 2000 Da. U frakciji 27 u odraslih životinja dominira kompozicija *H7N2Phos2*, uz značajnu prisutnost *H6N4F2* (kompleksni ili hibridni tip, sržna i antenarna fukozilacija) dok mladih jedinki dominira kompozicija *H7N2Phos2* uz primjetno niži udio *H6N4F2*. U frakciji 16 zabilježen je bitno niži udio kompozicije *H4N4F2* (može se protumačiti kao struktura koja nosi *Lewis X* ili *Lewis A* antigen, ispitivanje van dometa ovog rada) u mladim štakora postnatalne dobi 24 i 48 sati. U frakciji 34 detektirano je smanjenje udjela kompozicije *H5N4F1S2* u neuroglikoprofilu korteksa odraslog štakora u odnosu na korteks štakora postnatalne dobi 24 i 48 sati uz smanjenje površine frakcije za oko 2 puta što sugerira smanjenje ukupne količine N-glikana unutar navedene frakcije. Ova pojava može se tumačiti kroz smanjenje utjecaja navedene strukture u korteksu mozga odraslih jedinki, ukoliko se ispostavi da ova struktura ima određenu modulatornu ulogu. Ove promjene mogu biti posljedica različite aktivnosti enzimskih sustava uključenih u sintezu ovih struktura tijekom razvoja korteksa štakora, a također mogu značiti smanjenje udjela proteina koji bivaju modificirani specifično navedenim N-glikanima u ukupnom neuroglikoproteomu korteksa mozga štakora.

Zbog prirode *glikomičkih* pokusa dobivene informacije odnose se isključivo na profile slobodnih N-glikana otpuštenih s glikoproteina PNG-azom F i obilježenih fluoroforom. Odvajanjem N-glikana od glikoproteina gubi se veliki dio smislene cjeline interakcija pojedinih glikoproteina i njihove uloge u fiziološkom funkcioniranju pojedinog organa – u ovom slučaju mozga. Osim toga, izgubljena je informacija o bogatstvu glikoformi pojedinih proteina.

Iako ograničenog opsega, ovi rezultati mogu služiti kao dobra osnova za buduća kompleksnija i iscrpnija istraživanja koja trebaju uključivati *glikomički* i *glikoproteomički* pristup analizi.

6. Literatura

Ahn J, Bones J, Yu YQ, Rudd PM, Gilar M. Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 microm sorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878, 403–408.

Angata K, Huckaby V, Ranscht B, Terskikh A, Marth JD, Fukuda M. Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Mol Cell Biol*, 2007, 27, 6659–6668.

Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res*, 2008, 7, 1650–1659.

Chen YJ, Wing DR, Guile GR, Dwek RA, Harvey DJ, Zamze S. Neutral N-glycans in adult rat brain tissue--complete characterisation reveals fucosylated hybrid and complex structures. *Eur J Biochem*, 1998, 251, 691–703.

Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod--a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics*, 2001, 1, 340–349.

Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. Predicting Glycan Composition from Experimental Mass Using GlycoMod. U: Handbook of Proteomic Methods. Conn PM, urednik. Totowa NJ, Humana Press, 2003, str. 225–231.

Davies LRL, Varki A. Why Is N-Glycolylneuraminic Acid Rare in the Vertebrate Brain? *Top Curr Chem*, 2015, 366, 31–54.

Domon B, Costello C. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates, *Glycoconjugate J*, 1988, 5, 397-409.

Freeze HH, Eklund EA, Ng BG, Patterson MC. Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol*, 2012, 11, 453–466.

Han L, Costello CE. Mass spectrometry of glycans. *Biochemistry Mosc*, 2013, 78, 710–720.

Harvey DJ, Bousfield GR. Differentiation between sulphated and phosphated carbohydrates in low-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19, 287–288.

Harvey DJ. Electrospray mass spectrometry and fragmentation of N-linked carbohydrates derivatized at the reducing terminus. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11, 900–915.

Haslam SM, North SJ, Dell A. Mass spectrometric analysis of N- and O-glycosylation of tissues and cells. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16, 584–591.

Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science Engineering*, 2007, 9, 90–95.

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

Jones E, Oliphant T, Peterson P i suradnici. SciPy: Open source scientific tools for Python, 2001., <http://www.scipy.org/>, pristupljeno 24. 08. 2018.

Khoo KH, Yu SY. Mass spectrometric analysis of sulfated N- and O-glycans. *Meth Enzymol*, 2010, 478, 3–26.

Klarić T, Gudelj I. HILIC-UPLC Analysis of Brain Tissue N-Glycans. U: High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Lauc G, Wuhrer M, urednici. New York, Humana Press, 2017, str. 207–216.

Kozak RP, Tortosa CB, Fernandes DL, Spencer DIR. Comparison of procainamide and 2-aminobenzamide labeling for profiling and identification of glycans by liquid chromatography with fluorescence detection coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2015, 486, 38–40.

Krištić J, Lauc G, Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. U: High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Lauc G, Wuhrer M, urednici. New York, Humana Press, 2017, str. 1-12.

Lauc G, Krištić J, Zoldoš V, 2014. Glycans – the third revolution in evolution. *Front Genet*, 2014, 5, 145.

Matsui T, Takita E, Sato T, Kinjo S, Aizawa M, Sugiura Y, Hamabata T, Sawada K, Kato K. N-glycosylation at noncanonical Asn-X-Cys sequences in plant cells. *Glycobiology*, 2011, 21, 994–999.

Naito-Matsui Y, Davies LRL, Takematsu H, Chou HH, Tangvoranuntakul P, Carlin AF, Verhagen A, Heyser CJ, Yoo SW, Choudhury B, Paton JC, Paton AW, Varki NM, Schnaar RL, Varki A. Physiological Exploration of the Long Term Evolutionary Selection against Expression of N-Glycolylneuraminic Acid in the Brain. *J Biol Chem*, 2017, 292, 2557–2570.

Prestegard JH, Liu J, Widmalm G. Oligosaccharides and Polysaccharides. U: Essentials of Glycobiology [Internet] 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, urednici. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/>, pristupljeno 23. 08. 2018.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018., <http://www.R-project.org/>, pristupljeno 24. 08. 2018.

RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, 2015., <http://www.rstudio.com/>, pristupljeno 24. 08. 2018.

Roth J, Zuber C, Park S, Jang I, Lee Y, Kysela KG, Le Fourn V, Santimaria R, Guhl B, Cho JW. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells*, 2010, 30, 497–506.

Royle L, Campbell MP, Radcliffe CM, White DM, Harvey DJ, Abrahams JL, Kim YG, Henry GW, Shadick NA, Weinblatt ME, Lee DM, Rudd PM, Dwek RA. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal Biochem*, 2008, 376, 1–12.

Rudd P, Karlsson NG, Khoo KH, Packer NH, 2015. Glycomics and Glycoproteomics. U: Essentials of Glycobiology [Internet] 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, urednici. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/>, pristupljeno 23. 08. 2018.

Ruhaak LR, Huhn C, Waterreus WJ, de Boer AR, Neusüss C, Hokke CH, Deelder AM, Wuhrer M. Hydrophilic interaction chromatography-based high-throughput sample preparation method for N-glycan analysis from total human plasma glycoproteins. *Anal Chem*, 2008 ,80, 6119–6126.

Ruhaak LR, Uh HW, Beekman M, Hokke CH, Westendorp RG, Houwing-Duistermaat J, Wuhler M, Deelder AM, Slagboom PE. Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *J Proteome Res*, 2011, 10(4), 1667-1674.

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

Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhler M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 3457–3481.

Scott H, Panin VM. N-glycosylation in regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol*, 2014, 9, 367–394.

Seeberger PH, Monosaccharide Diversity.. In: Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, urednici. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453086/> pristupljeno 23. 08. 2018.

Stanley P, Cummings RD. Structures Common to Different Glycans. 2017. U: Essentials of Glycobiology [Internet] 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, urednici. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/>, pristupljeno 23. 08. 2018.

Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. U: Essentials of Glycobiology [Internet] 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, urednici. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/>, pristupljeno 23. 08. 2018.

Sun S, Zhang H. Identification and Validation of Atypical N-Glycosylation Sites. *Anal Chem*, 2015, 87, 11948–11951.

Taniguchi N, Kizuka, Y. N-glycan branching and Its Biological Significance.U: Glycoscience: Biology and Medicine. Endo T, Seeberger PH, Hart GW, Wong CH, Taniguchi N, urednici. Tokyo, Springer Japan, 2014, str. 1–7.

Torii T, Yoshimura T, Narumi M, Hitoshi S, Takaki Y, Tsuji S, Ikenaka K. Determination of major sialylated N-glycans and identification of branched sialylated N-glycans that dynamically change their content during development in the mouse cerebral cortex. *Glycoconj J*, 2014, 31, 671–683.

Varki A, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 1993, 3, 97–130.

Varki A, Kornfeld S. Historical Background and Overview. U: Essentials of Glycobiology [Internet] 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, urednici. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/>, pristupljeno 23. 08. 2018.

Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, 2005, 280, 42971–42977.

Ye Z, Marth JD. N-glycan branching requirement in neuronal and postnatal viability. *Glycobiology*, 2004, 14, 547–558.

Zamze S, Harvey DJ, Chen YJ, Guile GR, Dwek RA, Wing DR. Sialylated N-glycans in adult rat brain tissue--a widespread distribution of disialylated antennae in complex and hybrid structures. *Eur J Biochem*, 1998, 258, 243–270.

Zauner G, Deelder AM, Wuhler M. Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*, 2011, 32, 3456–3466.

Zielinska DF, Gnad F, Schropp K, Wiśniewski JR, Mann M. Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery. *Mol Cell*, 2012, 46, 542–548.

Zielinska DF, Gnad F, Wiśniewski JR, Mann M. Precision Mapping of an in vivo N-Glycoproteome Reveals Rigid Topological and Sequence Constraints. *Cell* 2010, 141, 897–907.

7. Sažetak/Summary

7.1 Sažetak

Analiza N-glikana tkiva mozga postaje područje sve većeg interesa glikobiologa. Poznato je da N-glikoprofil određenog tipa tkiva ovisi o interakcijama unutar kompleksne mreže čimbenika. Jedan od važnih čimbenika je vrijeme, odnosno dob jedinke. U ovom radu, nakon izolacije, pročišćavanja i fluorescentnog obilježavanja reducirajućeg kraja N-glikani korteksa mozga štakora iz 3 različite vremenske točke razvoja (24 i 48 sati postnatalne dobi, odrasla dob) analizirani su ranije razvijenom normalnofaznom kromatografskom metodom uz fluorescencijsku detekciju (HILIC-UPLC-FLR; Klarić i Gudelj, 2017) uz manje modifikacije postupka. Rezultati kromatografske analize podijeljeni su u 48 frakcija, a kompozicije N-glikana u svakoj frakciji određene su interpretacijom ESI(+)-MS/MS spektara. Rezultati pokazuju statistički značajne razlike odraslih i mladih jedinki u frakcijama: **5** (*odrasli – dominantna kompozicija: H3N4F1, mladi – dominantna kompozicija: H3N5*), **16** (*odrasli: H4N4F2 i H5N4F1, mladi: H5N4F1, izostanak H4N4F2*), **27** (27.1 - *odrasli: H7N2Phos2, H6N4F2, mladi: H7N2Phos2*; 27.2 *H5N5F1S1, H5N4F2S1*), **34** (*odrasli: H5N4F2S2, H5N4F1S3, H5N4F1S2, H5N6F3, mladi: H5N4F1S2*). Iz ovog istraživanja nije moguće utvrditi točan utjecaj određene kompozicije/strukture, no nije moguće niti isključiti postojanje modulatorne uloge pojedinih kompozicija prilikom razvoja korteksa mozga štakora.

7.2 Summary

Brain tissue N-glycans analysis is becoming a field of intensive glycobiological research. It has been shown that the N-glycoprofile of a specific tissue types results from a complex network of interactions of various factors, one of which is time – or to be precise – the age of an organism. In this paper after isolation, purification and reducing end fluorescent labeling rat brain cortex N-glycans from 3 different temporal points (24 and 48 h post natum, adult brains) were analysed using a HILIC-UPLC-FLR method reported earlier (Klarić i Gudelj, 2017) with minor protocol modifications. Chromatograms were divided into 48 distinct fractions and N-glycan compositions found in each fraction were elucidated using ESI(+)-MS/MS spectra. Here, we report 4 major statistical differences with possible biological implications in fractions: : 5 (adults–dominant composition(s): H3N4F1, neonates–dominant composition(s): H3N5), 16 (adults: H4N4F2 i H5N4F1, neonates: H5N4F1, absence of H4N4F2), 27 (27.1 - adults: H7N2Phos2, H6N4F2, neonates: H7N2Phos2; 27.2 H5N5F1S1, H5N4F2S1), 34 (adults: H5N4F2S2, H5N4F1S3, H5N4F1S2, H5N6F3, neonates: H5N4F1S2). Furthermore, comprehensive research is needed to help elucidate the exact impact of these structures on brain cortex development in rats and other organisms.

8. Prilozi

Tablica 8.1 Odrasla skupina – iscrpna lista pronađenih kompozicija s dodatnim informacijama

Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MProAH]+ (Da)	Odstupanje (teor. - izr.)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćeno	Kompozicija
1	1276.41000	1	1276.41000	1276.56593	-0.156	1057.39293	H3N2F1	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1
2	1292.40200	1	1292.40200	1292.56083	-0.159	1073.38783	H4N2	(Hex)4 (HexNAc)2
3a	1479.46700	1	1479.46700	1479.64533	-0.178	1260.47233	H3N3F1	(HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
3b	768.74590	2	1536.48453	1536.66683	-0.182	1317.49383	H3N4	(HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
4	719.72800	2	1438.44873	1438.61873	-0.17	1219.44573	H4N2F1	(Hex)4 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1
5a	841.76300	2	1682.51873	1682.72473	-0.206	1463.55173	H3N4F1	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
5b	870.27300	2	1739.53873	1739.74623	-0.207	1520.57323	H3N5	(HexNAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
6	1454.44700	1	1454.44700	1454.61363	-0.167	1235.44063	H5N2	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2
7	943.29400	2	1885.58073	1885.80413	-0.223	1666.63113	H3N5F1	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
8	943.29400	2	1885.58073	1885.80413	-0.223	1666.63113	H3N5F1	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
9a	922.78000	2	1844.55273	1844.77753	-0.225	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
9b	942.28900	2	1883.57073	1883.71723	-0.147	1664.54423	H5N3F1Phos1	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (Phos)1 + (Man)3(GlcNAc)2
9c	1064.28270	2	2127.55810	2127.81373	-0.256	1908.64073	H4N5F1Sulph1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2
10a	922.78000	2	1844.55273	1844.77753	-0.225	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
10b	829.25070	2	1657.47413	1657.69303	-0.219	1438.52003	H5N3	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
11	922.78000	2	1844.55273	1844.77753	-0.225	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
12a	1024.30600	2	2047.60473	2047.85693	-0.252	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
12b	930.77730	2	1860.54733	1860.77243	-0.225	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
13	808.74500	2	1616.48273	1616.66643	-0.184	1397.49343	H6N2	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2
14a	807.72780	2	1614.44832	1614.54623	-0.098	1395.37323	H5N2Phos2	(Hex)2 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
14b	1024.30570	2	2047.60413	2047.85693	-0.253	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
14c	930.77730	2	1860.54733	1860.77243	-0.225	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
15a	930.77730	2	1860.54733	1860.77243	-0.225	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
15b	1068.30100	2	2135.59473	2135.87293	-0.278	1916.69993	H4N4F1S1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
16a	995.80610	2	1990.60493	1990.83543	-0.231	1771.66243	H4N4F2	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
16b	1003.79520	2	2006.58313	2006.83033	-0.247	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
16c	1024.30600	2	2047.60473	2047.85693	-0.252	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
17a	1003.77500	2	2006.54273	2006.83033	-0.288	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
17b	1169.83300	2	2338.65873	2338.95233	-0.294	2119.77933	H4N5F1S1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
17c	995.80610	2	1990.60493	1990.83543	-0.231	1771.66243	H4N4F2	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
18a	995.80600	2	1990.60473	1990.83543	-0.231	1771.66243	H4N4F2	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
18b	1003.79500	2	2006.58273	2006.83033	-0.248	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
18c	1169.83300	2	2338.65873	2338.95233	-0.294	2119.77933	H4N5F1S1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
18d	1068.31530	2	2135.62333	2135.87293	-0.25	1916.69993	H4N4F1S1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
19a	1097.33600	2	2193.66473	2193.91483	-0.25	1974.74183	H4N5F2	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
19b	1105.31510	2	2209.62293	2209.90973	-0.287	1990.73673	H5N5F1	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
20.1a	1097.32100	2	2193.63473	2193.91483	-0.28	1974.74183	H4N5F2	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
20.1b	975.28400	2	1949.56073	1949.80883	-0.248	1730.63583	H5N3F2	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
20.2	889.75500	2	1778.50273	1778.71923	-0.216	1559.54623	H7N2	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2
21a	1076.81900	2	2152.63073	2152.88823	-0.258	1933.71523	H5N4F2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
21b	888.77980	2	1776.55232	1776.59903	-0.047	1557.42603	H6N2Phos2	(Hex)3 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
22a	1169.83300	2	2338.65873	2338.95233	-0.294	2119.77933	H4N5F1S1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
22b	1076.81870	2	2152.63013	2152.88823	-0.258	1933.71523	H5N4F2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
23.1	983.28700	2	1965.56673	1965.80373	-0.237	1746.63073	H6N3F1	(Hex)3 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
23.2a	1198.84660	2	2396.68593	2396.99423	-0.308	2177.82123	H4N6F2	(Hex)1 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
23.2b	1076.31770	2	2151.62813	2151.86783	-0.24	1932.69483	H5N4S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
24a	1178.34000	2	2355.67273	2355.96763	-0.295	2136.79463	H5N5F2	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
24b	1084.82410	2	2168.64093	2168.88313	-0.242	1949.71013	H6N4F1	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
24c	1242.83310	2	2484.65893	2485.01023	-0.351	2265.83723	H4N5F2S1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2

Tablica 8.1 (Nastavak)

Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MProAH]+ (Da)	Odstupanje (teor. - izr.)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skraćeno	Kompozicija
25a	970.77900	2	1940.55073	1940.77203	-0.221	1721.59903	H8N2	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2
25b	1193.32300	2	2385.63873	2385.94173	-0.303	2166.76873	H5N3F1S2	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
26a	970.76530	2	1940.52333	1940.77203	-0.249	1721.59903	H8N2	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2
26b	1149.31190	2	2297.61653	2297.92573	-0.309	2078.75273	H5N4F1S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
27.1a	969.75940	2	1938.51152	1938.65183	-0.14	1719.47883	H7N2Phos2	(Hex)4 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
27.1b	1157.81900	2	2314.63073	2314.94103	-0.31	2095.76803	H6N4F2	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
27.2a	1250.84570	2	2500.68413	2501.00513	-0.321	2281.83213	H5N5F1S1	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
27.2b	1222.33500	2	2443.66273	2443.98363	-0.321	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
28a	1222.33500	2	2443.66273	2443.98363	-0.321	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
28b	1294.85680	2	2588.70633	2589.02113	-0.315	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
29a	1149.84450	2	2298.68173	2298.94613	-0.264	2079.77313	H5N4F3	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
29b	1222.33500	2	2443.66273	2443.98363	-0.321	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
30	1251.35510	2	2501.70293	2502.02553	-0.323	2282.85253	H5N5F3	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
31	1051.79200	2	2102.57673	2102.82483	-0.248	1883.65183	H9N2	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2
32a	1425.41900	2	2849.83073	2850.14243	-0.312	2630.96943	H5N6F2S1	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
32b	1050.77310	2	2100.53893	2100.70463	-0.166	1881.53163	H8N2Phos2	(Hex)5 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
32c	1221.83120	2	2442.65513	2442.96323	-0.308	2223.79023	H5N4S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
33a	882.90830	3	2646.71036	2647.06303	-0.353	2427.89003	H5N5F2S1	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
33b	902.26860	3	2704.79126	2705.10493	-0.314	2485.93193	H5N6F3	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
34a	912.25800	3	2734.75946	2735.07903	-0.32	2515.90603	H5N4F2S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
34b	960.59500	3	2879.77046	2880.11653	-0.346	2660.94353	H5N4F1S3	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
34c	1294.85680	2	2588.70633	2589.02113	-0.315	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
34d	902.26860	3	2704.79126	2705.10493	-0.314	2485.93193	H5N6F3	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
35a	931.27000	3	2791.79546	2792.10053	-0.305	2572.92753	H5N5F1S2	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
35b	1047.60680	3	3140.80586	3141.23783	-0.432	2922.06483	H5N6F2S2	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
35c	1132.80240	2	2264.59753	2264.87763	-0.28	2045.70463	H10N2	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2
36a	985.27200	3	2953.80146	2954.15333	-0.352	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
36b	1004.61110	3	3011.81876	3012.19523	-0.376	2793.02223	H6N6F2S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
36c	956.27160	3	2866.80026	2867.15773	-0.357	2647.98473	H6N6F3	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
36d	936.92490	3	2808.76016	2809.11583	-0.356	2589.94283	H6N5F2S1	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
37a	936.92490	3	2808.76016	2809.11583	-0.356	2589.94283	H6N5F2S1	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
37b	1047.60680	3	3140.80586	3141.23783	-0.432	2922.06483	H5N6F2S2	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
37c	1004.61110	3	3011.81876	3012.19523	-0.376	2793.02223	H6N6F2S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
37c	985.27200	3	2953.80146	2954.15333	-0.352	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
38a	1057.61650	3	3170.83496	3171.21193	-0.377	2952.03893	H5N4F1S4	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2
38b	1053.29250	3	3157.86296	3158.25313	-0.39	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
39	1053.29250	3	3157.86296	3158.25313	-0.39	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
40a	1033.93700	3	3099.79646	3100.21123	-0.415	2881.03823	H6N5F2S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
40b	985.27200	3	2953.80146	2954.15333	-0.352	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
41	937.25890	3	2809.76216	2810.13623	-0.374	2590.96323	H6N5F4	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)4 + (Man)3(GlcNAc)2
42a	1149.96290	3	3447.87416	3448.32813	-0.454	3229.15513	H6N6F1S3	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
42b	1120.95150	3	3360.83996	3361.33253	-0.493	3142.15953	H6N7F3S1	(Hex)3 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
42c	1130.95250	3	3390.84296	3391.30663	-0.464	3172.13363	H6N5F2S3	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
43a	1203.98930	3	3609.95336	3610.38093	-0.428	3391.20793	H7N6F1S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
43b	1155.65230	3	3464.94236	3465.34343	-0.401	3246.17043	H7N6F2S2	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
44a	1155.97880	3	3465.92186	3466.36383	-0.442	3247.19083	H7N6F4S1	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)4 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
44b	1203.98930	3	3609.95336	3610.38093	-0.428	3391.20793	H7N6F1S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
44c	1252.65220	3	3755.94206	3756.43883	-0.497	3537.26583	H7N6F2S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
45a	1252.65220	3	3755.94206	3756.43883	-0.497	3537.26583	H7N6F2S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
45b	1301.00370	3	3900.99656	3901.47633	-0.48	3682.30333	H7N6F1S4	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2
46	1301.0037	3	3900.99656	3901.47633	-0.48	3682.30333	H7N6F1S4	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2

Tablica 8.2 Skupina 48h – iscrpna lista pronađenih kompozicija s dodatnim informacijama

Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MProAH]+ (Da)	Odstupanje (teor. - izr.)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skrraćeno	Kompozicija
1	1276.4719	1	1276.47190	1276.56593	-0.094	1057.39293	H3N2F1	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1
2	1292.4396	1	1292.43960	1292.56083	-0.121	1073.38783	H4N2	(Hex)4 (HexNAc)2
3a	740.2431	2	1479.47893	1479.64533	-0.166	1260.47233	H3N3F1	(HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
3b	768.7459	2	1536.48453	1536.66683	-0.182	1317.49383	H3N4	(HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
4	719.7285	2	1438.44973	1438.61873	-0.169	1219.44573	H4N2F1	(Hex)4 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1
5a	870.2854	2	1739.56353	1739.74623	-0.183	1520.57323	H3N5	(HexNAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
5b	841.7761	2	1682.54493	1682.72473	-0.180	1463.55173	H3N4F1	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
6	727.7349	2	1454.46253	1454.61363	-0.151	1235.44063	H5N2	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2
7	943.3071	2	1885.60693	1885.80413	-0.197	1666.63113	H3N5F1	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
8	943.3071	2	1885.60693	1885.80413	-0.197	1666.63113	H3N5F1	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
9a	922.7931	2	1844.57893	1844.77753	-0.199	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
9b	942.2888	2	1883.57033	1883.71723	-0.147	1664.54423	H5N3F1Phos1	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (Phos)1 + (Man)3(GlcNAc)2
9c	1064.2969	2	2127.58653	2127.81373	-0.227	1908.64073	H4N5F1Sulph1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2
10a	922.7931	2	1844.57893	1844.77753	-0.199	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
10b	829.2507	2	1657.49413	1657.69303	-0.199	1438.52003	H5N3	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
10c	951.2852	2	1901.56313	1901.79903	-0.236	1682.62603	H4N5	(Hex)1 (HexNAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
10d	1044.8262	2	2088.64513	2088.88353	-0.238	1869.71053	H3N6F1	(HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
11	922.7931	2	1844.57893	1844.77753	-0.199	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
12a	1024.3197	2	2047.63213	2047.85693	-0.225	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
12b	930.7906	2	1860.57393	1860.77243	-0.198	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
12c	922.7931	2	1844.57893	1844.77753	-0.199	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
13	808.7451	2	1616.48293	1616.66643	-0.184	1397.49343	H6N2	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2
14a	807.7402	2	1614.47312	1614.54623	-0.073	1395.37323	H5N2Phos2	(Hex)2 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
14b	1024.3197	2	2047.63213	2047.85693	-0.225	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
14c	930.7906	2	1860.57393	1860.77243	-0.198	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
15a	930.7906	2	1860.57393	1860.77243	-0.198	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
15b	1024.3197	2	2047.63213	2047.85693	-0.225	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
15c	995.8199	2	1990.63253	1990.83543	-0.203	1771.66243	H4N4F2	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
16a	1003.8090	2	2006.61073	2006.83033	-0.220	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
16b	1024.3197	2	2047.63213	2047.85693	-0.225	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
16c	995.8199	2	1990.63253	1990.83543	-0.203	1771.66243	H4N4F2	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
17a	1024.3197	2	2047.63213	2047.85693	-0.225	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
17b	1003.8090	2	2006.61073	2006.83033	-0.220	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
17c	902.2817	2	1803.55613	1803.75093	-0.195	1584.57793	H5N3F1	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
18a	1003.8090	2	2006.61073	2006.83033	-0.220	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
18b	1169.8479	2	2338.68853	2338.95233	-0.264	2119.77933	H4N5F1S1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
18c	995.8061	2	1990.60493	1990.83543	-0.231	1771.66243	H4N4F2	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
19a	1097.3356	2	2193.66393	2193.91483	-0.251	1974.74183	H4N5F2	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
19b	1105.3440	2	2209.68073	2209.90973	-0.229	1990.73673	H5N5F1	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
20.1a	1097.3356	2	2193.66393	2193.91483	-0.251	1974.74183	H4N5F2	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
20.1b	889.7679	2	1778.52853	1778.71923	-0.191	1559.54623	H7N2	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2
20.2	889.7679	2	1778.52853	1778.71923	-0.191	1559.54623	H7N2	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2
21a	1076.8330	2	2152.65873	2152.88823	-0.229	1933.71523	H5N4F2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
21b	888.75290	2	1776.49852	1776.59903	-0.101	1557.42603	H6N2Phos2	(Hex)3 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
22a	1152.3021	2	2303.59693	2303.84582	-0.249	2084.67282	H4N5F1Sulph1HexA1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (HexA)1 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2
22b	1149.3414	2	2297.67553	2297.92573	-0.250	2078.75273	H5N4F1S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
23a	1169.8479	2	2338.68853	2338.95233	-0.264	2119.77933	H4N5F1S1	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
23b	1084.8241	2	2168.64093	2168.88313	-0.242	1949.71013	H6N4F1	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
23c	983.3006	2	1965.59393	1965.80373	-0.210	1746.63073	H6N3F1	(Hex)3 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
23d	1076.3177	2	2151.62813	2151.86783	-0.240	1932.69483	H5N4S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
24a	1178.3561	2	2355.70493	2355.96763	-0.263	2136.79463	H5N5F2	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
24b	1084.8241	2	2168.64093	2168.88313	-0.242	1949.71013	H6N4F1	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2
25a	970.7789	2	1940.55053	1940.77203	-0.222	1721.59903	H8N2	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2
25b	1178.3561	2	2355.70493	2355.96763	-0.263	2136.79463	H5N5F2	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2

Tablica 8.2 (Nastavak)

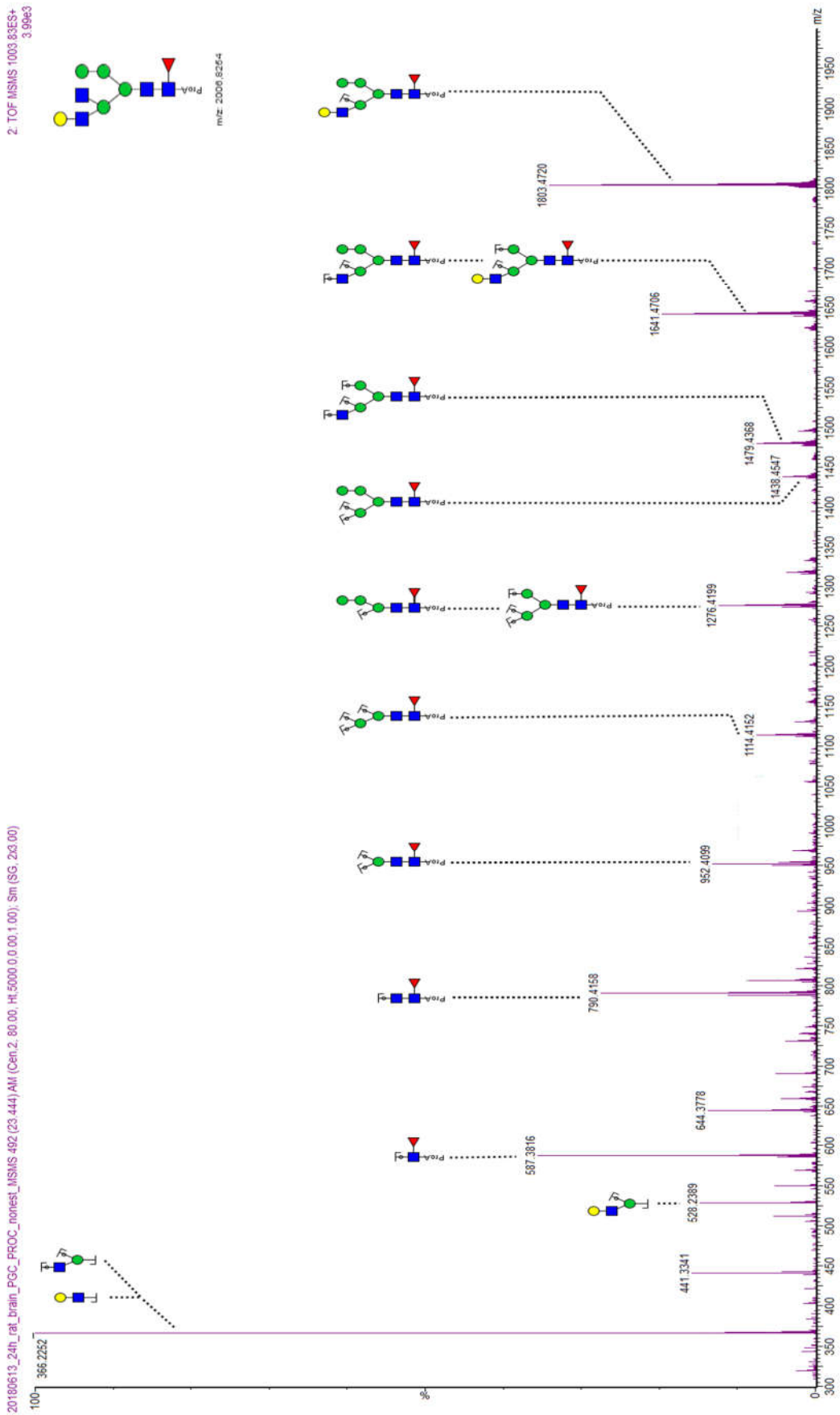
Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH]+ (Da)	Teorijski [MProAH]+ (Da)	Odstupanje (teor. - izr.)	Teorijski [MH]+ (Da)	Skrraćeno	Kompozicija
26a	970.7789	2	1940.55053	1940.77203	-0.222	1721.59903	H8N2	(Hex) ₅ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
26b	1128.8550	2	2256.70273	2256.89913	-0.196	2037.72613	H6N3F1S1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
26c	1193.3230	2	2385.63873	2385.94173	-0.303	2166.76873	H5N3F1S2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
27.1a	969.7720	2	1938.53672	1938.65183	-0.115	1719.47883	H7N2Phos2	(Hex) ₄ (Phos) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
27.1b	1157.8341	2	2314.66093	2314.94103	-0.280	2095.76803	H6N4F2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
27.2a	1250.8612	2	2500.71513	2501.00513	-0.290	2281.83213	H5N5F1S1	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
28a	1294.8724	2	2588.73753	2589.02113	-0.284	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
28b	1222.3804	2	2443.75353	2443.98363	-0.230	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
29a	1222.3499	2	2443.69253	2443.98363	-0.291	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
29b	1149.8445	2	2298.68173	2298.94613	-0.264	2079.77313	H5N4F3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
29c	890.9137	3	2670.72656	2671.07433	-0.348	2451.90133	H3N6F1S2	(HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
30	1251.3705	2	2501.73373	2502.02553	-0.292	2282.85253	H5N5F3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
31	1051.7917	2	2102.57613	2102.82483	-0.249	1883.65183	H9N2	(Hex) ₆ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
32a	1050.7872	2	2100.56713	2100.70463	-0.138	1881.53163	H8N2Phos2	(Hex) ₅ (Phos) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
32b	1425.4025	2	2849.79773	2850.14243	-0.345	2630.96943	H5N6F2S1	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
32c	1221.8312	2	2442.65513	2442.96323	-0.308	2223.79023	H5N4S2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
32d	1294.8568	2	2588.70633	2589.02113	-0.315	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
33a	882.9212	3	2646.74906	2647.06303	-0.314	2427.89003	H5N5F2S1	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
33b	950.5989	3	2849.78216	2850.14243	-0.360	2630.96943	H5N6F2S1	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
33b	902.2948	3	2704.86986	2705.10493	-0.235	2485.93193	H5N6F3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
34a	1294.8568	2	2588.70633	2589.02113	-0.315	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
34b	960.59470	3	2879.77046	2880.11653	-0.346	2660.94353	H5N4F1S3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
34c	912.25820	3	2734.75946	2735.07903	-0.32	2515.90603	H5N4F2S2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
34d	902.28170	3	2704.79126	2705.10493	-0.314	2485.93193	H5N6F3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
35a	931.2567	3	2791.75556	2792.10053	-0.345	2572.92753	H5N5F1S2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
35c	1132.8024	2	2264.59753	2264.87763	-0.280	2045.70463	H10N2	(Hex) ₇ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
36a	985.2720	3	2953.80146	2954.15333	-0.352	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
36b	960.5947	3	2879.76956	2880.11653	-0.347	2660.94353	H5N4F1S3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
36c	1004.6111	3	3011.81876	3012.19523	-0.376	2793.02223	H6N6F2S1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
36d	956.2851	3	2866.84076	2867.15773	-0.317	2647.98473	H6N6F3	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
37a	1052.9667	3	3156.88556	3157.23273	-0.347	2938.05973	H6N6F1S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
37b	985.2720	3	2953.80146	2954.15333	-0.352	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
38a	1101.6332	3	3302.88506	3303.29063	-0.406	3084.11763	H6N6F2S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
38b	1053.2925	3	3157.86296	3158.25313	-0.390	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
39	1053.2925	3	3157.86296	3158.25313	-0.390	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
40a	1033.9510	3	3099.83846	3100.21123	-0.373	2881.03823	H6N5F2S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
40b	1101.6332	3	3302.88506	3303.29063	-0.406	3084.11763	H6N6F2S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
40c	1082.2959	3	3244.87316	3245.24873	-0.376	3026.07573	H6N5F1S3	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
40d	1053.2925	3	3157.86296	3158.25313	-0.390	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
41a	1082.2959	3	3244.87316	3245.24873	-0.376	3026.07573	H6N5F1S3	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
41b	1053.2925	3	3157.86296	3158.25313	-0.390	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
42a	1120.9807	3	3360.92756	3361.33253	-0.405	3142.15953	H6N7F3S1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₅ (Deoxyhexose) ₃ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
42b	1169.3406	3	3506.00726	3506.37003	-0.363	3287.19703	H6N7F2S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₅ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
42c	1082.3246	3	3244.95926	3245.24873	-0.289	3026.07573	H6N5F1S3	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
42d	1150.3477	3	3449.02856	3449.34853	-0.320	3230.17553	H6N6F3S2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
42e	1107.0131	3	3319.02476	3319.28553	-0.261	3100.11253	H7N6F1S2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
43a	1203.9898	3	3609.95486	3610.38093	-0.426	3391.20793	H7N6F1S3	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
43b	1155.6523	3	3464.94236	3465.34343	-0.401	3246.17043	H7N6F2S2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
44a	1301.0037	3	3900.99656	3901.47633	-0.480	3682.30333	H7N6F1S4	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
44b	1252.6522	3	3755.94206	3756.43883	-0.497	3537.26583	H7N6F2S3	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
45a	1301.0037	3	3900.99656	3901.47633	-0.480	3682.30333	H7N6F1S4	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
45b	1252.6522	3	3755.94206	3756.43883	-0.497	3537.26583	H7N6F2S3	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
46a	1422.6689	3	4265.99216	4266.60853	-0.616	4047.43553	H8N7F1S4	(Hex) ₅ (HexNAc) ₅ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₄ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
46b	1374.3500	3	4121.03546	4121.57103	-0.536	3902.39803	H8N7F2S3	(Hex) ₅ (HexNAc) ₅ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂

Tablica 8.3 Skupina 24h – iscrpna lista pronađenih kompozicija s dodatnim informacijama

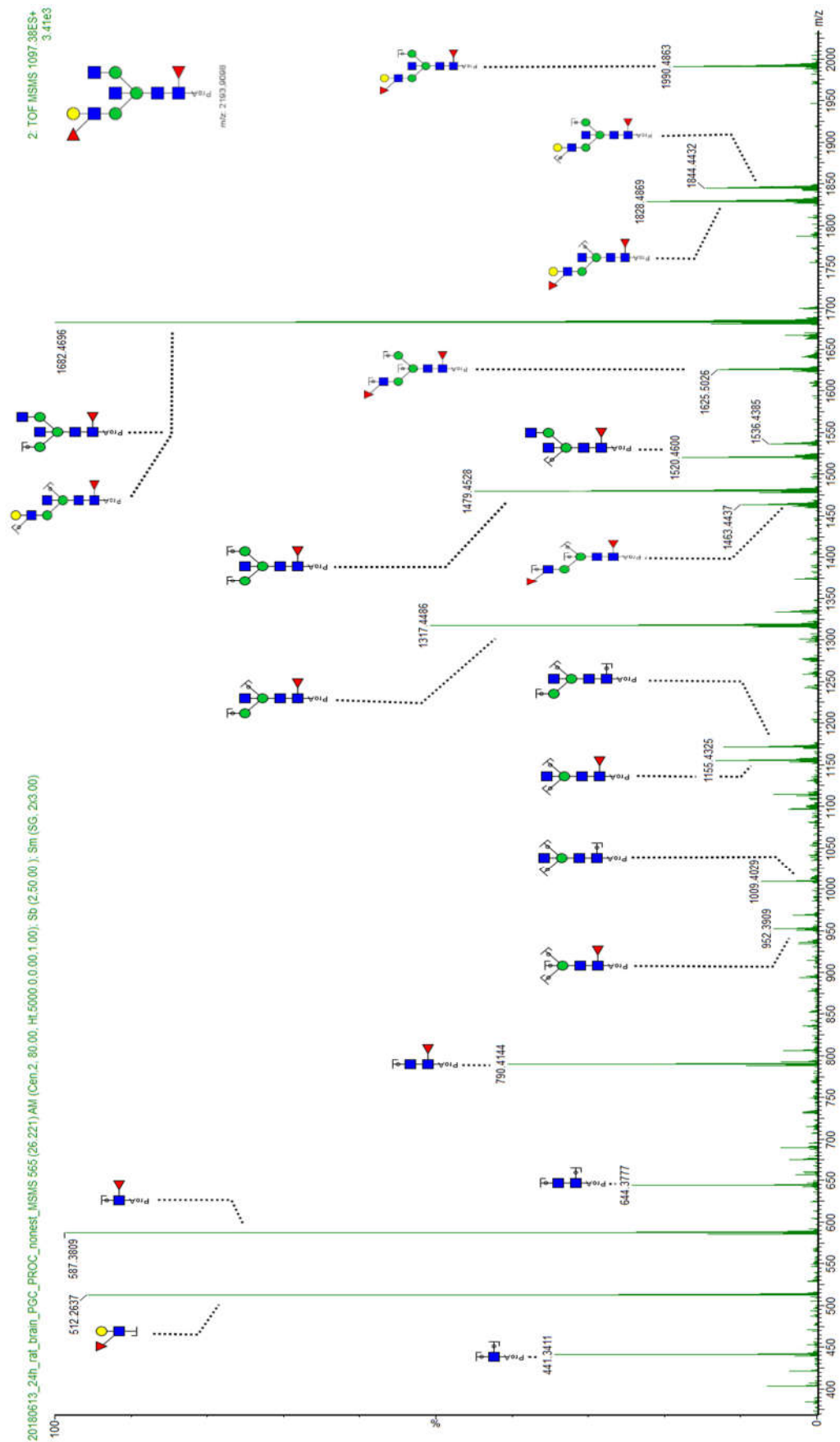
Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH] ⁺	Teorijski [MProAH] ⁺	Odstupanje (teor. - izr.)	Teorijski [MH] ⁺ (Da)	Skraćeno	Kompozicija
1	1276.4719	1	1276.47190	1276.56593	-0.094	1057.39293	H3N2F1	(Hex)3 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1
2	1292.4553	1	1292.45530	1292.56083	-0.106	1073.38783	H4N2	(Hex)4 (HexNac)2
3a	740.2668	2	1479.52633	1479.64533	-0.119	1260.47233	H3N3F1	(HexNac)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
3b	768.7701	2	1536.53293	1536.66683	-0.134	1317.49383	H3N4	(HexNac)2 + (Man)3(GlcNac)2
4	719.7519	2	1438.49653	1438.61873	-0.122	1219.44573	H4N2F1	(Hex)4 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1
5a	870.3112	2	1739.61513	1739.74623	-0.131	1520.57323	H3N5	(HexNac)3 + (Man)3(GlcNac)2
5b	1372.4578	1	1372.4578	1372.52713	-0.069	1153.35413	H4N2Phos1	(Hex)4 (HexNac)2 (Phos)1
5c	841.7630	2	1682.51873	1682.72473	-0.206	1463.55173	H3N4F1	(HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
6	1454.4965	1	1454.49650	1454.61363	-0.117	1235.44063	H5N2	(Hex)2 + (Man)3(GlcNac)2
7	943.3339	2	1885.66053	1885.80413	-0.144	1666.63113	H3N5F1	(HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
8	943.2940	2	1885.58073	1885.80413	-0.223	1666.63113	H3N5F1	(HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
9a	922.8196	2	1844.63193	1844.77753	-0.146	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
9b	942.3156	2	1883.62393	1883.71723	-0.093	1664.54423	H5N3F1Phos1	(Hex)2 (HexNac)1 (Deoxyhexose)1 (Phos)1 + (Man)3(GlcNac)2
9c	1064.3253	2	2127.64333	2127.81373	-0.170	1908.64073	H4N5F1Sulph1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNac)2
10a	922.8196	2	1844.63193	1844.77753	-0.146	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
10b	829.2759	2	1657.54453	1657.69303	-0.149	1438.52003	H5N3	(Hex)2 (HexNac)1 + (Man)3(GlcNac)2
10c	951.3121	2	1901.61693	1901.79903	-0.182	1682.62603	H4N5	(Hex)1 (HexNac)3 + (Man)3(GlcNac)2
11	922.8196	2	1844.63193	1844.77753	-0.146	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
12a	1024.3475	2	2047.68773	2047.85693	-0.169	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
12b	930.8039	2	1860.60053	1860.77243	-0.172	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNac)2 + (Man)3(GlcNac)2
12c	922.8196	2	1844.63193	1844.77753	-0.146	1625.60453	H4N4F1	(Hex)1 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
13	808.7699	2	1616.53253	1616.66643	-0.134	1397.49343	H6N2	(Hex)3 + (Man)3(GlcNac)2
14a	807.7650	2	1614.52272	1614.54623	-0.024	1395.37323	H5N2Phos2	(Hex)2 (Phos)2 + (Man)3(GlcNac)2
14b	1024.3457	2	2047.68413	2047.85693	-0.173	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
14c	930.8172	2	1860.62713	1860.77243	-0.145	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNac)2 + (Man)3(GlcNac)2
15a	930.8039	2	1860.60053	1860.77243	-0.172	1641.59943	H5N4	(Hex)2 (HexNac)2 + (Man)3(GlcNac)2
15b	1024.3457	2	2047.68413	2047.85693	-0.173	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
16a	1003.7952	2	2006.58313	2006.83033	-0.247	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
16b	1024.3475	2	2047.68773	2047.85693	-0.169	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
16c	995.8061	2	1990.60493	1990.83543	-0.231	1771.66243	H4N4F2	(Hex)1 (HexNac)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNac)2
17a	1024.3475	2	2047.68773	2047.85693	-0.169	1828.68393	H4N5F1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
17b	1003.8229	2	2006.63853	2006.83033	-0.192	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
17c	1032.3521	2	2063.69693	2063.85183	-0.155	1844.67883	H5N5	(Hex)2 (HexNac)3 + (Man)3(GlcNac)2
17d	902.3079	2	1803.60853	1803.75093	-0.142	1584.57793	H5N3F1	(Hex)2 (HexNac)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
18a	1003.8367	2	2006.66613	2006.83033	-0.164	1787.65733	H5N4F1	(Hex)2 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
18b	1169.8927	2	2338.77813	2338.95233	-0.174	2119.77933	H4N5F1S1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNac)2
19a	1097.3789	2	2193.75053	2193.91483	-0.164	1974.74183	H4N5F2	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNac)2
19b	1105.3585	2	2209.70973	2209.90973	-0.200	1990.73673	H5N5F1	(Hex)2 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
20.1a	1097.3789	2	2193.75053	2193.91483	-0.164	1974.74183	H4N5F2	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNac)2
20.1b	889.7939	2	1778.58053	1778.71923	-0.139	1559.54623	H7N2	(Hex)4 + (Man)3(GlcNac)2
20.2	889.7939	2	1778.58053	1778.71923	-0.139	1559.54623	H7N2	(Hex)4 + (Man)3(GlcNac)2
21a	1076.8618	2	2152.71633	2152.88823	-0.172	1933.71523	H5N4F2	(Hex)2 (HexNac)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNac)2
21b	888.7789	2	1776.55052	1776.59903	-0.049	1557.42603	H6N2Phos2	(Hex)3 (Phos)2 + (Man)3(GlcNac)2
22a	1152.3318	2	2303.65633	2303.84582	-0.189	2084.67282	H4N5F1Sulph1HexA1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 (HexA)1 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNac)2
22b	1149.3710	2	2297.73473	2297.92573	-0.191	2078.75273	H5N4F1S1	(Hex)2 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNac)2
23a	1076.3463	2	2151.68533	2151.86783	-0.183	1932.69483	H5N4S1	(Hex)2 (HexNac)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNac)2
23b	1169.8778	2	2338.74833	2338.95233	-0.204	2119.77933	H4N5F1S1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNac)2
23c	983.3279	2	1965.64853	1965.80373	-0.155	1746.63073	H6N3F1	(Hex)3 (HexNac)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
24a	1178.3860	2	2355.76473	2355.96763	-0.203	2136.79463	H5N5F2	(Hex)2 (HexNac)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNac)2
24b	1084.8528	2	2168.69833	2168.88313	-0.185	1949.71013	H6N4F1	(Hex)3 (HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNac)2
24c	1242.8794	2	2484.75153	2485.01023	-0.259	2265.83723	H4N5F2S1	(Hex)1 (HexNac)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNac)2
25a	970.8061	2	1940.60493	1940.77203	-0.167	1721.59903	H8N2	(Hex)5 + (Man)3(GlcNac)2
25b	1178.3710	2	2355.73473	2355.96763	-0.233	2136.79463	H5N5F2	(Hex)2 (HexNac)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNac)2

Tablica 8.3 (Nastavak)

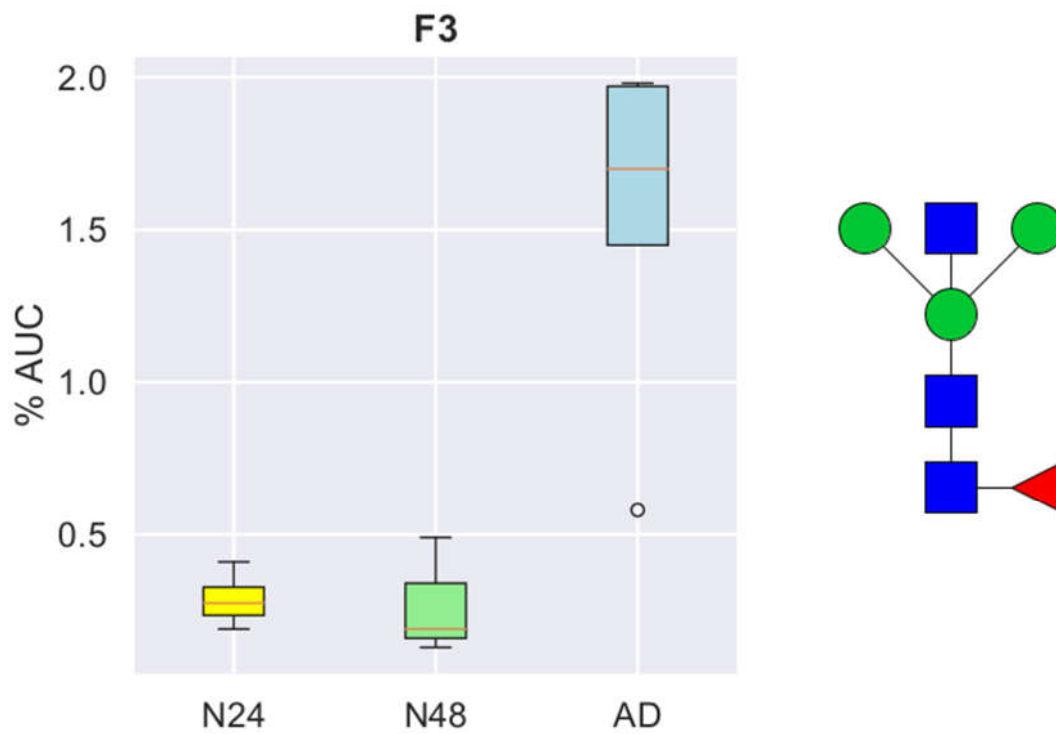
Frakcija	Mjereni m/z	Naboj	Izračunati [MProAH] ⁺	Teorijski [MProAH] ⁺	Odstupanje (teor. - izr.)	Teorijski [MH] ⁺ (Da)	Skraćeno	Kompozicija
26a	970.8061	2	1940.60493	1940.77203	-0.167	1721.59903	H8N2	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2
26b	1193.3230	2	2385.63873	2385.94173	-0.303	2166.76873	H5N3F1S2	(Hex)2 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
26c	1128.8550	2	2256.70273	2256.89913	-0.196	2037.72613	H6N3F1S1	(Hex)3 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
27.1a	969.7594	2	1938.51152	1938.65183	-0.140	1719.47883	H7N2Phos2	(Hex)4 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
27.1b	1157.8638	2	2314.72033	2314.94103	-0.221	2095.76803	H6N4F2	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2
27.2a	1250.8920	2	2500.77673	2501.00513	-0.228	2281.83213	H5N5F1S1	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
27.2b	1222.3956	2	2443.78393	2443.98363	-0.200	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
28a	1222.3804	2	2443.75353	2443.98363	-0.230	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
28b	1294.9038	2	2588.80033	2589.02113	-0.221	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
29a	1149.8445	2	2298.68173	2298.94613	-0.264	2079.77313	H5N4F3	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
29b	1222.3956	2	2443.78393	2443.98363	-0.200	2224.81063	H5N4F2S1	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
30	1251.4014	2	2501.79553	2502.02553	-0.230	2282.85253	H5N5F3	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
31	1051.7920	2	2102.57673	2102.82483	-0.248	1883.65183	H9N2	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2
32a	1050.7731	2	2100.53893	2100.70463	-0.166	1881.53163	H8N2Phos2	(Hex)5 (Phos)2 + (Man)3(GlcNAc)2
32b	1294.9038	2	2588.80033	2589.02113	-0.221	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
32c	1425.4519	2	2849.89653	2850.14243	-0.246	2630.96943	H5N6F2S1	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
32d	1221.8770	2	2442.74673	2442.96323	-0.216	2223.79023	H5N4S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
33a	882.9471	3	2646.82676	2647.06303	-0.236	2427.89003	H5N5F2S1	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
33b	902.2948	3	2704.86986	2705.10493	-0.235	2485.93193	H5N6F3	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
33c	1221.8770	2	2442.74673	2442.96323	-0.216	2223.79023	H5N4S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
34a	1294.9038	2	2588.80033	2589.02113	-0.221	2369.84813	H5N4F1S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
34b	960.62180	3	2879.85085	2880.11653	-0.346	2660.94353	H5N4F1S3	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
34c	912.28450	3	2734.83895	2735.07903	-0.32	2515.90603	H5N4F2S2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
34d	902.28170	3	2704.83055	2705.10493	-0.314	2485.93193	H5N6F3	(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
35a	931.2833	3	2791.83536	2792.10053	-0.265	2572.92753	H5N5F1S2	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
35c	1132.8318	2	2264.65633	2264.87763	-0.221	2045.70463	H10N2	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2
36a	985.2994	3	2953.88366	2954.15333	-0.270	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
36b	1004.6387	3	3011.90156	3012.19523	-0.294	2793.02223	H6N6F2S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
36c	956.3121	3	2866.92176	2867.15773	-0.236	2647.98473	H6N6F3	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2
36d	936.9650	3	2808.88046	2809.11583	-0.235	2589.94283	H6N5F2S1	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
37a	1052.9950	3	3156.97046	3157.23273	-0.262	2938.05973	H6N6F1S2	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
37b	985.2720	3	2953.80146	2954.15333	-0.352	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
38a	1053.3208	3	3157.94786	3158.25313	-0.305	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
38b	985.2720	3	2953.80146	2954.15333	-0.352	2734.98033	H6N5F1S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
39	1053.3208	3	3157.94786	3158.25313	-0.305	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
40a	1033.9791	3	3099.92276	3100.21123	-0.288	2881.03823	H6N5F2S2	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
40b	1053.3208	3	3157.94786	3158.25313	-0.305	2939.08013	H6N6F3S1	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2
40c	1082.3246	3	3244.95926	3245.24873	-0.289	3026.07573	H6N5F1S3	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
41	1082.3246	3	3244.95926	3245.24873	-0.289	3026.07573	H6N5F1S3	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
42a	1107.0131	3	3319.02476	3319.28553	-0.261	3100.11253	H7N6F1S2	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
42b	1169.3406	3	3506.00726	3506.37003	-0.363	3287.19703	H6N7F2S2	(Hex)3 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
42c	1082.3246	3	3244.95926	3245.24873	-0.289	3026.07573	H6N5F1S3	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
42d	1150.3477	3	3449.02856	3449.34853	-0.320	3230.17553	H6N6F3S2	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
42e	1179.3298	3	3535.97486	3536.34413	-0.369	3317.17113	H6N5F1S4	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2
43a	1204.0195	3	3610.04396	3610.38093	-0.337	3391.20793	H7N6F1S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
43b	1155.6671	3	3464.98676	3465.34343	-0.357	3246.17043	H7N6F2S2	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2
44a	1301.0353	3	3901.09136	3901.47633	-0.385	3682.30333	H7N6F1S4	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2
44b	1252.6985	3	3756.08096	3756.43883	-0.358	3537.26583	H7N6F2S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
44c	1204.0195	3	3610.04396	3610.38093	-0.337	3391.20793	H7N6F1S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
45a	1301.0353	3	3901.09136	3901.47633	-0.385	3682.30333	H7N6F1S4	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2
45b	1252.6985	3	3756.08096	3756.43883	-0.358	3537.26583	H7N6F2S3	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
46a	1374.3984	3	4121.18066	4121.57103	-0.390	3902.39803	H8N7F2S3	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2
46b	1422.7512	3	4266.23906	4266.60853	-0.369	4047.43553	H8N7F1S4	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2



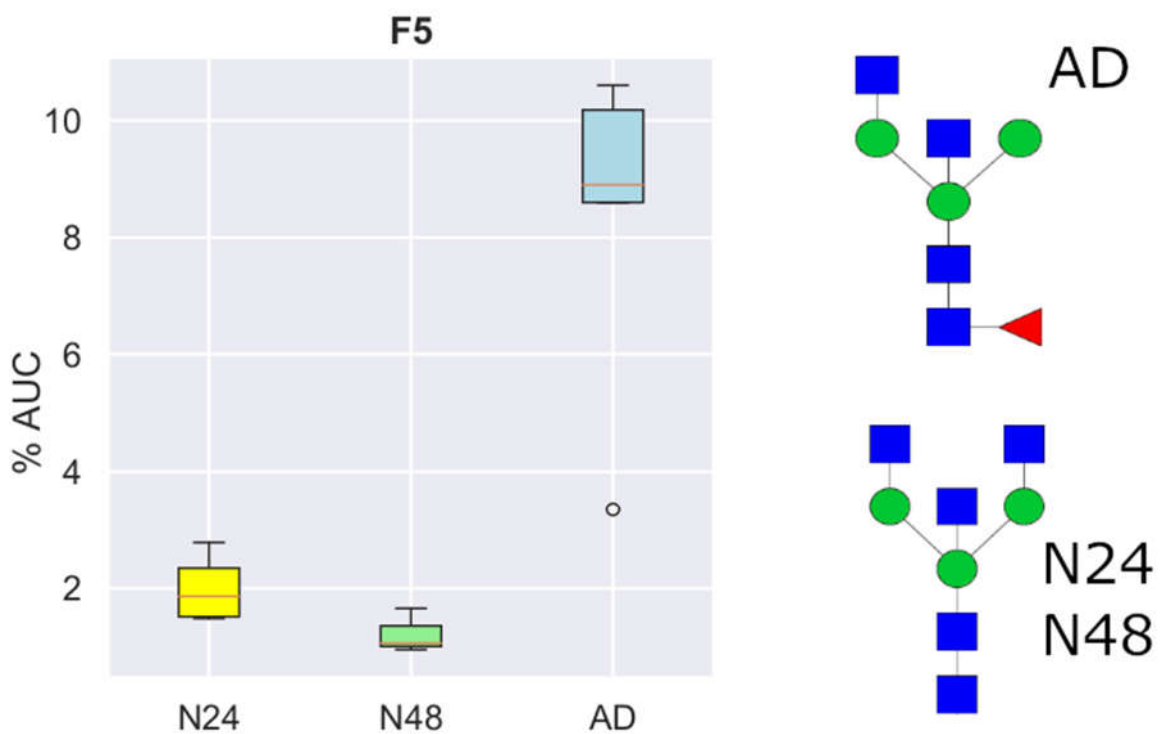
Slika 8.1 Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra



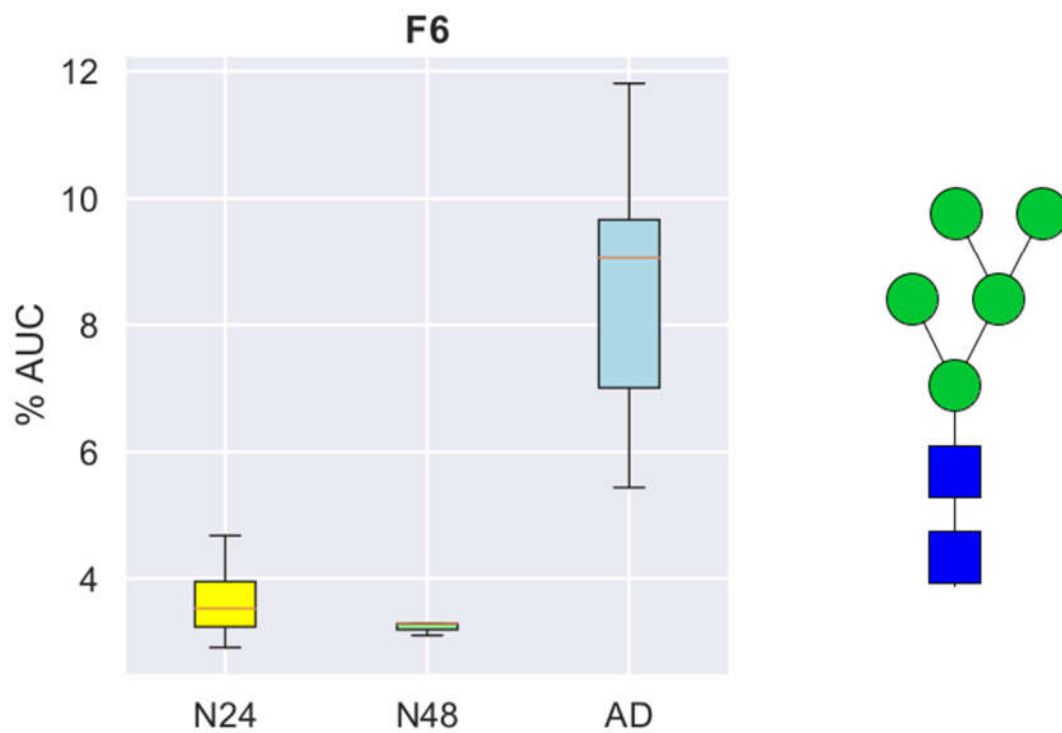
Slika 8.2 Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra



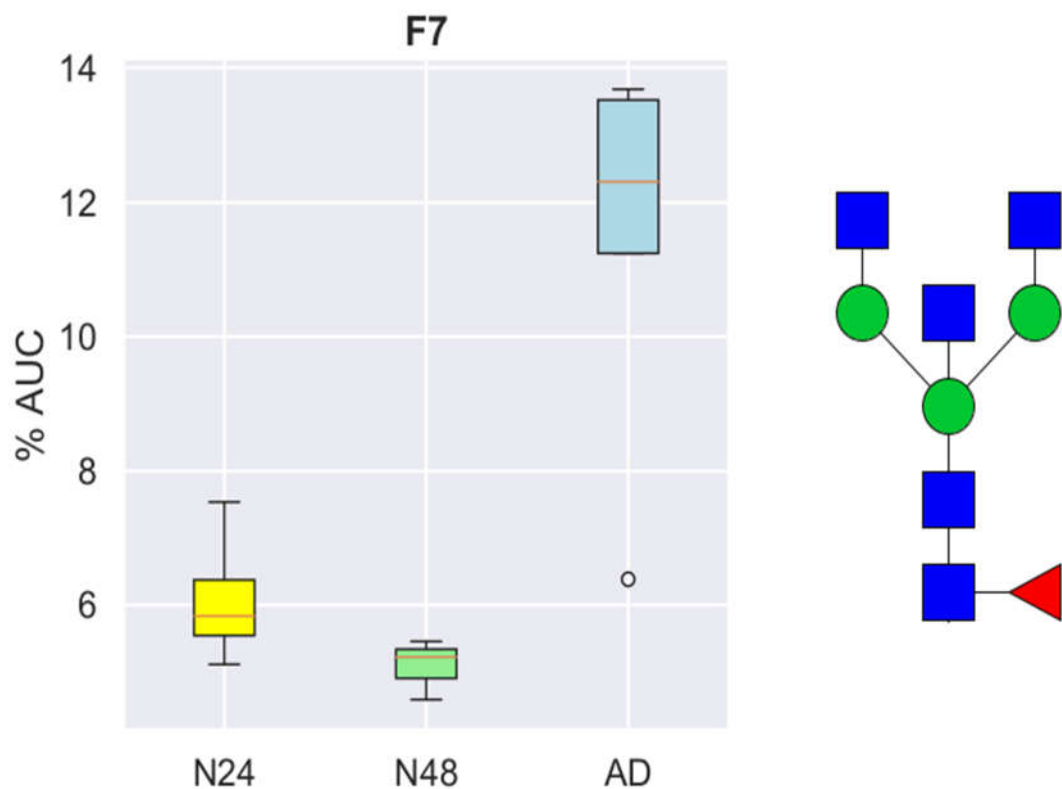
Slika 8.3 Dodatak slici 4.12 – F3 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)



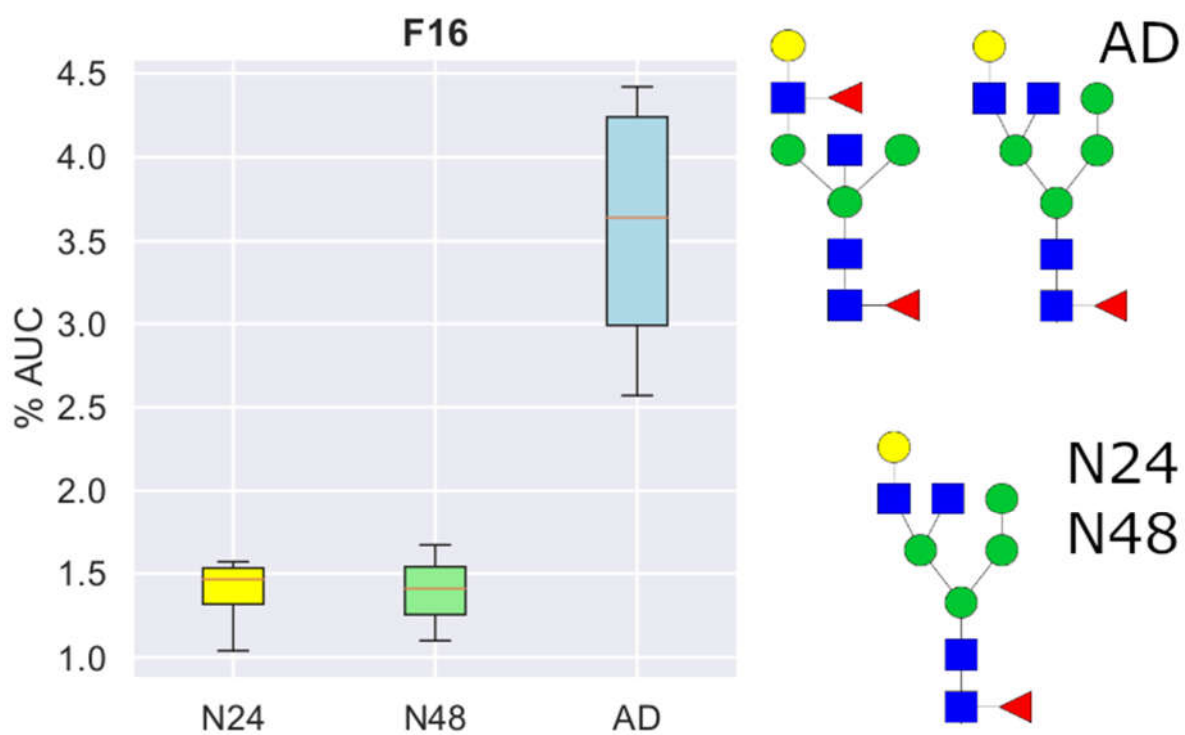
Slika 8.4 Dodatak slici 4.12 – F5 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)



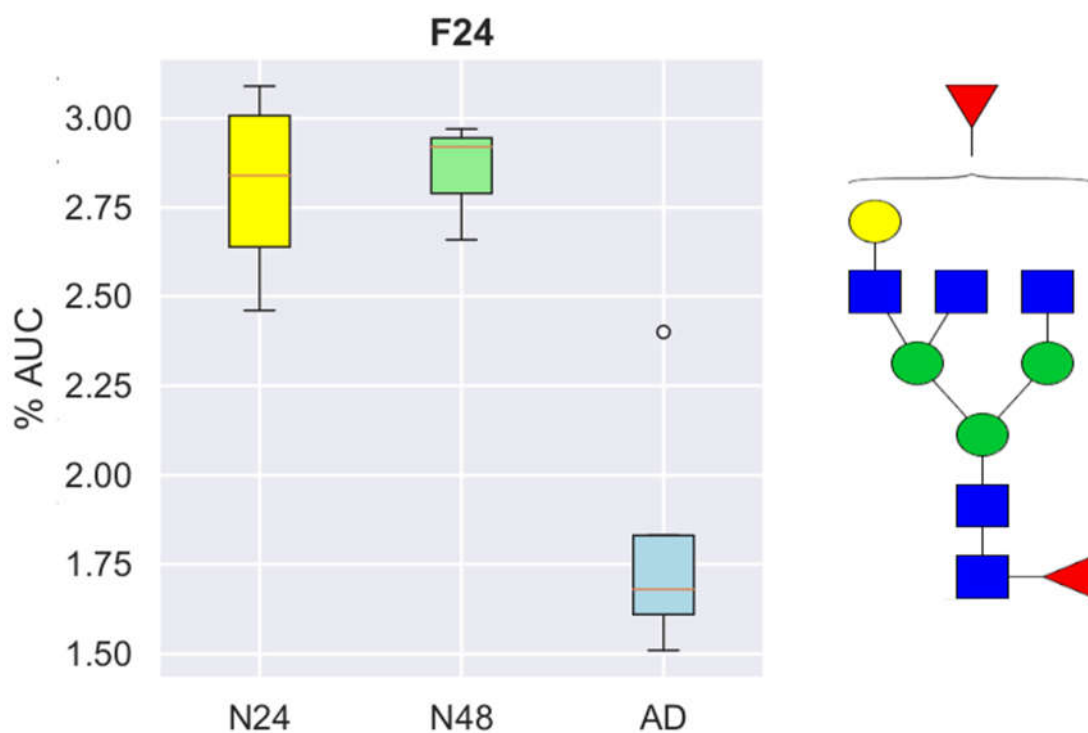
Slika 8.5 Dodatak slici 4.12 – F6 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)



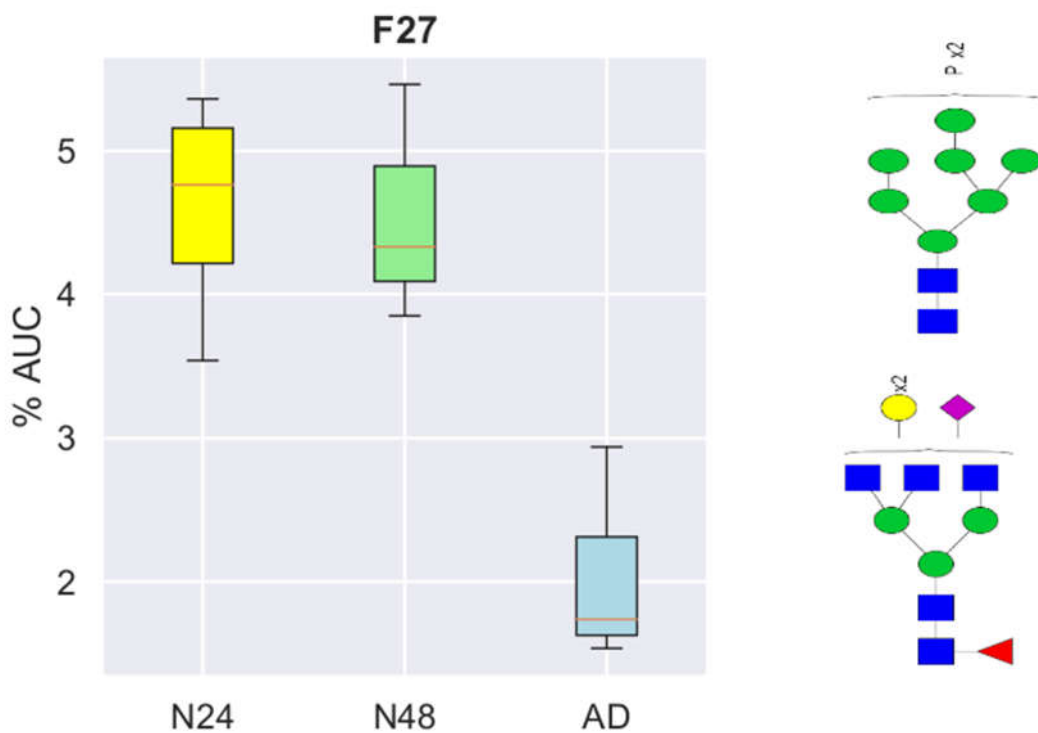
Slika 8.6 Dodatak slici 4.12 – F7 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)



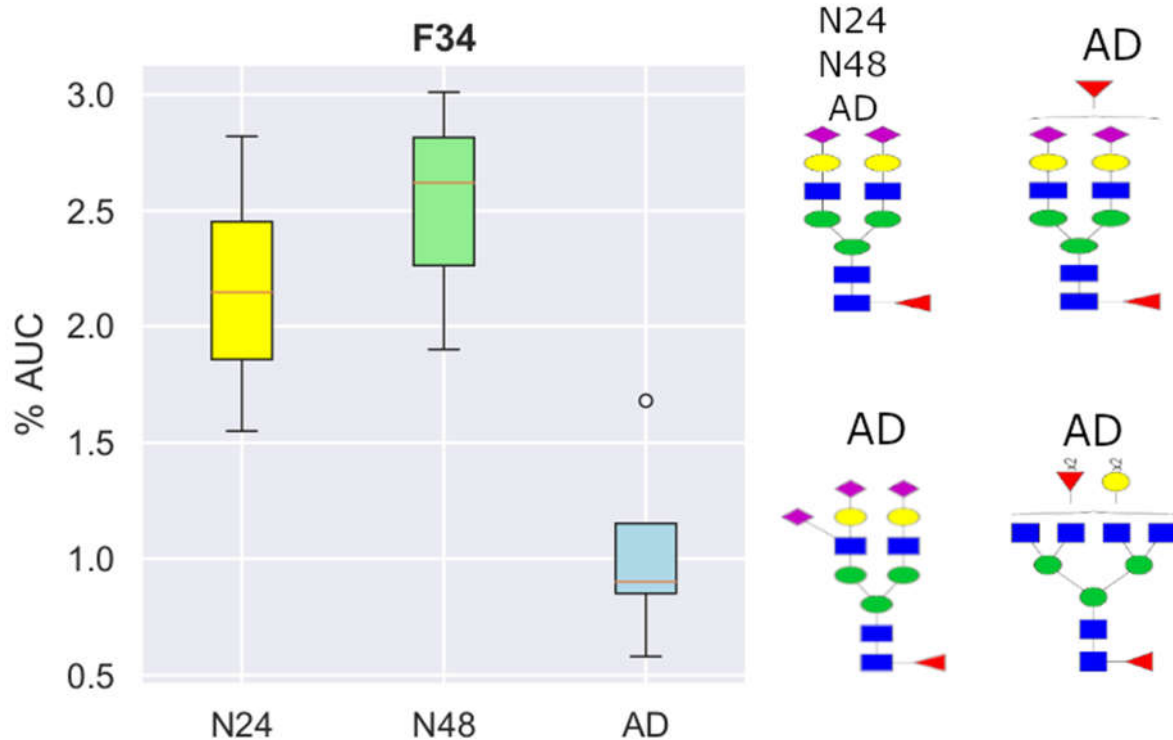
Slika 8.7 Dodatak slici 4.12 – F16 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)



Slika 8.8 Dodatak slici 4.12 – F24 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)



Slika 8.9 Dodatak slici 4.12 – F27 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)



Slika 8.10 Dodatak slici 4.12 – F34 (AD/N24/N48 označavaju skupinu uzoraka)

$$g = \frac{M_1 - M_2}{SD_{\text{pooled}}} \times \left(\frac{N-3}{N-2.25} \right) \times \sqrt{\frac{N-2}{N}}$$

Slika 8.11 Formula korištena pri izračunu i korekciji Hedgesove g vrijednosti. U crvenom Pravokutniku nalazi se korekcijski faktor. N – ukupni broj uzoraka. M1, M2 srednje vrijednosti skupina. SDpooled – ukupna standardna devijacija.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Razvojne promjene N-glikana neuroglikoma korteksa mozga štakora

Matija Salopek

SAŽETAK

Analiza N-glikana tkiva mozga postaje područje sve većeg interesa glikobiologa. Poznato je da N-glikopofil određenog tipa tkiva ovisi o interakcijama unutar kompleksne mreže čimbenika. Jedan od važnih čimbenika je vrijeme, odnosno dob jedinke. U ovom radu, nakon izolacije, pročišćavanja i fluorescentnog obilježavanja reducirajućeg kraja N-glikani korteksa mozga štakora iz 3 različite vremenske točke razvoja (24 i 48 sati postnatalne dobi, odrasla dob) analizirani su ranije razvijenom normalnofaznom kromatografskom metodom uz fluorescencijsku detekciju (HILIC-UPLC-FLR; Klarić i Gudelj, 2017) uz manje modifikacije postupka. Rezultati kromatografske analize podijeljeni su u 48 frakcija, a kompozicije N-glikana u svakoj frakciji određene su interpretacijom ESI(+)-MS/MS spektara. Rezultati pokazuju statistički značajne razlike odraslih i mladih jedinki u frakcijama: **5** (odrasli – dominantna kompozicija: **H3N4F1**, mladi – dominantna kompozicija: **H3N5**), **16** (odrasli: **H4N4F2** i **H5N4F1**, mladi: **H5N4F1**, izostanak **H4N4F2**), **27** (27.1 - odrasli: **H7N2Phos2**, **H6N4F2**, mladi: **H7N2Phos2**; 27.2 **H5N5F1S1**, **H5N4F2S1**), **34** (odrasli: **H5N4F2S2**, **H5N4F1S3**, **H5N4F1S2**, **H5N6F3**, mladi: **H5N4F1S2**). Iz ovog istraživanja nije moguće utvrditi točan utjecaj određene kompozicije/strukture, no nije moguće niti isključiti postojanje modulatorne uloge pojedinih kompozicija prilikom razvoja korteksa mozga štakora.

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

Rad sadrži: 80 stranica, 34 grafička prikaza, 9 tablica i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikani, neuroglikom, HILIC-UPLC, ESI-MS/MS, mozak, štakor

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

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

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Toma Keser, asistent-znanstveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan, 2018

Basic Documentation Card

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

Diploma thesis

N-glycan Profile Changes in Rat Brain Neuroglycome During Brain Development

Matija Salopek

Summary

Brain tissue N-glycans analysis is becoming a field of intensive glycobiochemical research. It has been shown that the N-glycoprofile of a specific tissue types results from a complex network of interactions of various factors, one of which is time – or to be precise – the age of an organism. In this paper after isolation, purification and reducing end fluorescent labeling rat brain cortex N-glycans from 3 different temporal points (24 and 48 h post natum, adult brains) were analysed using a HILIC-UPLC-FLR method reported earlier (Klarić i Gudelj, 2017) with minor protocol modifications. Chromatograms were divided into 48 distinct fractions and N-glycan compositions found in each fraction were elucidated using ESI(+)-MS/MS spectra. Here, we report 4 major statistical differences with possible biological implications in fractions: : 5 (adults–dominant composition(s): H3N4F1, neonates–dominant composition(s): H3N5), 16 (adults: H4N4F2 i H5N4F1, neonates: H5N4F1, absence of H4N4F2), 27 (27.1 - adults: H7N2Phos2, H6N4F2, neonates: H7N2Phos2; 27.2 H5N5F1S1, H5N4F2S1), 34 (adults: H5N4F2S2, H5N4F1S3, H5N4F1S2, H5N6F3, neonates: H5N4F1S2). Furthermore, comprehensive research is needed to help elucidate the exact impact of these structures on brain cortex development in rats and other organisms.

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

Thesis includes: 80 pages, 34 figures, 9 tables i 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycans, neuroglycome, HILIC-UPLC, ESI-MS/MS, brain, cortex, rat

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

Reviewers: **Gordan Lauc Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Ana-Marija Domijan Ph.D. *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Toma Keser Ph.D. *Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September, 2018