

Spolno uvjetovane razlike N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G u populaciji mladih zdravih ispitanika

Sinožić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:625769>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

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



Tea Sinožić

**Spolno uvjetovane razlike N-glikoma ukupnih
plazmatskih proteina i imunoglobulina G u
populaciji mladih zdravih ispitanika**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Olge Gornik Kljaić.

Zahvaljujem se dragoj profesorici i mentorici prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić na potpori i povjerenju tijekom izrade diplomskog rada, kao i na svom pruženom znanju tijekom studija. Velika zahvala Ani Cvetko, mag. med. biochem. na iznimnoj pomoći prilikom izrade praktičnog dijela rada, tijekom pisanja rada te na ukupnom usmjeravanju kroz cijeli proces. Zahvaljujem se i kolegama magistrima Mateju, Dinku i Branimiru za pomoć u izradi praktičnog dijela rada i za ugodnu radnu atmosferu u laboratoriju.

Najveća zahvala, naravno, mojim roditeljima i sestri na podršci i iznimnoj potpori tijekom cijelog studija.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Glikozilacija	1
1.1.1. Biosinteza	2
1.1.2. Biosinteza N-vezanih glikana	3
1.1.3. Biosinteza O-vezanih glikana	7
1.2. Biološka uloga glikana	7
1.2.1. Promjene N-glikozilacije s dobi	8
1.2.2. Promjene N-glikozilacije s dobi u odnosu na spol	9
1.2.3. Promjene N-glikozilacije u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima	10
1.3. Analiza glikanske strukture	11
1.3.1. HILIC-UPLC metoda	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Uzorci	15
3.2. Materijali	15
3.2.1. Anorganske kemikalije	15
3.2.2. Organske kemikalije	16
3.2.3. Biološki materijali	16
3.2.4. Otopine i puferi	16
3.2.5. Laboratorijska oprema i pribor	18
3.3. Protokol pripreme uzoraka	19
3.3.1. Randomizacija uzoraka	19
3.3.2. Izolacija IgG-a, deglikozilacija proteina i označavanje N-glikana	19
3.3.2.1. Izolacija plazmatskog imunoglobulina G uz protein G pločicu	19
3.3.2.2. Deglikozilacija proteina u otopini	21
3.3.2.3. Označavanje, pročišćavanje i ispiranje N-glikana plazme i imunoglobulina G	22
3.4. Analiza uzoraka	23
3.4.1. Analiza N-glikana HILIC-UPLC metodom	23
3.4.2. Statistička analiza podataka	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Kromatogrami N-glikana ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G	26
4.2. Derivirana svojstva glikana	32
4.3. Rezultati	34
4.3.1. Razine glikana u uzorcima ispitanika	34
4.3.2. Razlika razine N-glikana ukupnih plazmatskih proteina obzirom na spol ispitanika	35
4.3.3. Razlika deriviranih svojstava N-glikana ukupnih plazmatskih proteina obzirom na spol ispitanika	38
4.3.4. Razlika razine N-glikana IgG-a obzirom na spol ispitanika	39
4.3.5. Razlika razine deriviranih svojstava glikana IgG-a obzirom na spol ispitanika	41
4.4. Rasprava	42
5. ZAKLJUČAK	45
6. LITERATURA	46
7. SAŽETAK/SUMMARY	48
7.1. Sažetak	48
7.2. Summary	49
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

Fuc	fukoza
Gal	galaktoza
Glc	glukoza
Man	manoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GlcA	glukuronska kiselina
Sia	sijalinska kiselina
Xyl	ksiloza
Asn	asparagin
Ser	serin
Thr	treonin
ER	endoplazmatski retikulum
UDP	uridin-difosfat
GDP	gvanozin-difosfat
CMP	citidin-monofosfat
NTP	nukleozid trifosfat
NDP	nukleozid difosfat
PPi	pirofosfat
Dol-P	dolikol fosfat
Man-6-P	manoza-6-fosfat
IgG	imunoglobulin G
GP	glikanski pik
BMI	engl. <i>body mass index</i> , indeks tjelesne mase
HILIC	engl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama
UPLC	engl. <i>ultra performance liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

1. UVOD

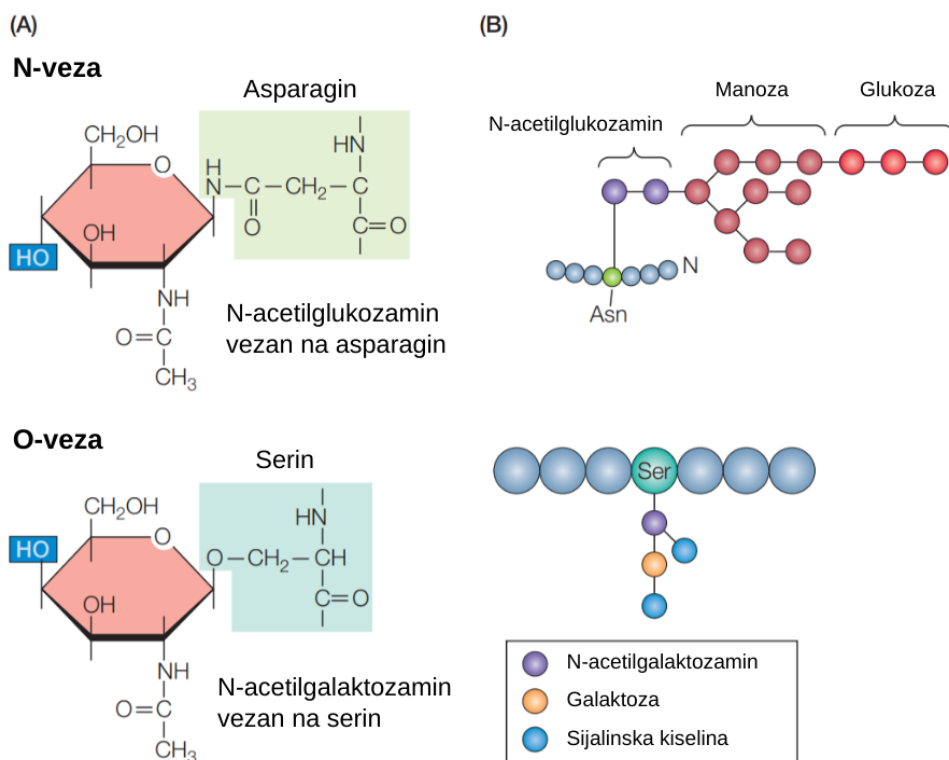
1.1. Glikozilacija

Glikozilacija, enzimski posredovan proces modifikacije proteina (ili lipida) dodatkom ugljikohidrata, jedna je od najčešćih posttranslacijskih modifikacija proteina u eukariotskim stanicama te se odvija kotranslacijski i posttranslacijski. (Cooper, 2019) Glikozilirani proteini nalaze se na površini svih stanica jednostaničnih i višestaničnih organizama, izlučuju se iz stanica, a mogu se nalaziti i u jezgri i citosolu. Glikani su evolucijski odabrani kao idealno sučelje unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora zbog svoje relativne hidrofилnosti, fleksibilnosti, pokretnosti u vodenom mediju i iznimne različitosti. (Varki i sur., 2017)

Glikokonjugat se sastoji od aglikona, proteinske ili lipidne molekule, i glikona, šećerne komponente glikokonjugata građene od jedne ili više oligosaharidnih i polisaharidnih jedinica. Pod glikokonjugate ubrajamo spojeve poput glikoproteina, proteoglikana, glikozilfosfatidilinozitolnih sidra, glikosfingolipida i gangliozida koji se razlikuju prema načinu vezanja aglikona i glikona. (Varki i sur., 2017)

Najčešći monosaharidi koji izgrađuju eukariotske glikane su fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glc), manozna (Man), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), sijalinska kiselina (Sia) i ksiloza (Xyl). Varijacije u broju, tipu, redosljediu i načinu vezanja monosaharida temelj su različitosti glikana. (Lauc i sur., 2014) U usporedbi s nukleotidima i aminokiselinama, gdje tri različita monomera mogu tvoriti najviše šest različitih trimera (zbog linearnosti polimera, proteina i nukleinskih kiselina), tri različita monosaharida mogu teoretski tvoriti između 1 056 i 27 648 jedinstvenih trisaharida. (Varki i sur., 2017)

Glikoproteini su glikokonjugati u kojima je jedan ili više glikana kovalentno vezano glikozidnom vezom na polipeptidni lanac. S obzirom na vrstu glikozidne veze razlikujemo N- i O-vezane glikane (Slika 1). Kod N-vezanih glikana N-acetilglukozamin (GlcNAc) je vezan na dušikov atom bočnog ogranka asparagina (Asn), dok O-vezu čine N-acetilgalaktozamin (GalNAc) i kisikov atom bočnog ogranka serina (Ser) ili treonina (Thr). (Varki i sur., 2017)



Slika 1. (A) Prikaz glikozidnih veza N- i O-vezanih glikana. (B) Prikaz N- i O-vezanih glikoproteina. (preuzeto i prilagođeno iz Cooper, 2019)

1.1.1. Biosinteza

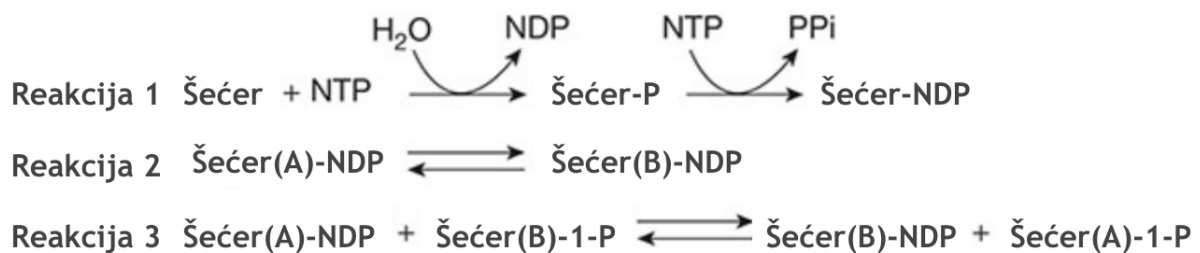
Proteini namijenjeni ugrađivanju u staničnu membranu i sekretorni proteini kotranslacijski se modificiraju u endoplazmatskom retikulumu (ER) nakon čega su usmjereni prema Golgijevom aparatu do *trans*-Golgijeve mreže od kuda se distribuiraju na unaprijed predodređena mjesta u ili izvan stanice. Tijekom cijele sinteze u ER-Golgi putu glikani se mogu sintetizirati s citoplazmatske ili s luminalne strane organela, uz pravilo da će one strukture koje su sintetizirane unutar lumena naposljetku biti okrenute u vanstanični prostor ili se nalaziti unutar sekretorne granule ili lizosoma. (Varki i sur., 2017)

Enzimi koji sudjeluju u reakcijama glikozilacije dijele se na glikozil-transferaze, enzime koji vrše dodavanje šećernih ostataka, i na glikozidaze, enzime koji odstranjuju šećerne ostatke, dok se kao prekursori koriste aktivirani oblici monosaharida (Slika 2). (Cooper, 2019)

Monosaharid	Aktivirani oblik
Glc	UDP-monosaharid
Gal	
GlcNAc	
GalNAc	
GlcA	
Xyl	GDP-monosaharid
Man	
Fuc	CMP-Sia
Sia	

Slika 2. Aktivirani oblici monosaharida (preuzeto i prilagođeno iz Varki i sur., 2017)

Uobičajeno, u procesu aktivacije sudjeluju nukleozid trifosfat (NTP; šećer-NDP) i monosaharid s fosfatom vezanim na anomerni C atom (šećer-1-P) kao što je prikazano u reakciji 3, Slika 3. Reakcija također može biti katalizirana kinazom (reakcija 1, Slika 3) ili aktivirani monosaharid može nastati epimerizacijom ili reakcijom zamjene nukleotida (reakcija 2, Slika 3). (Varki i sur., 2017)

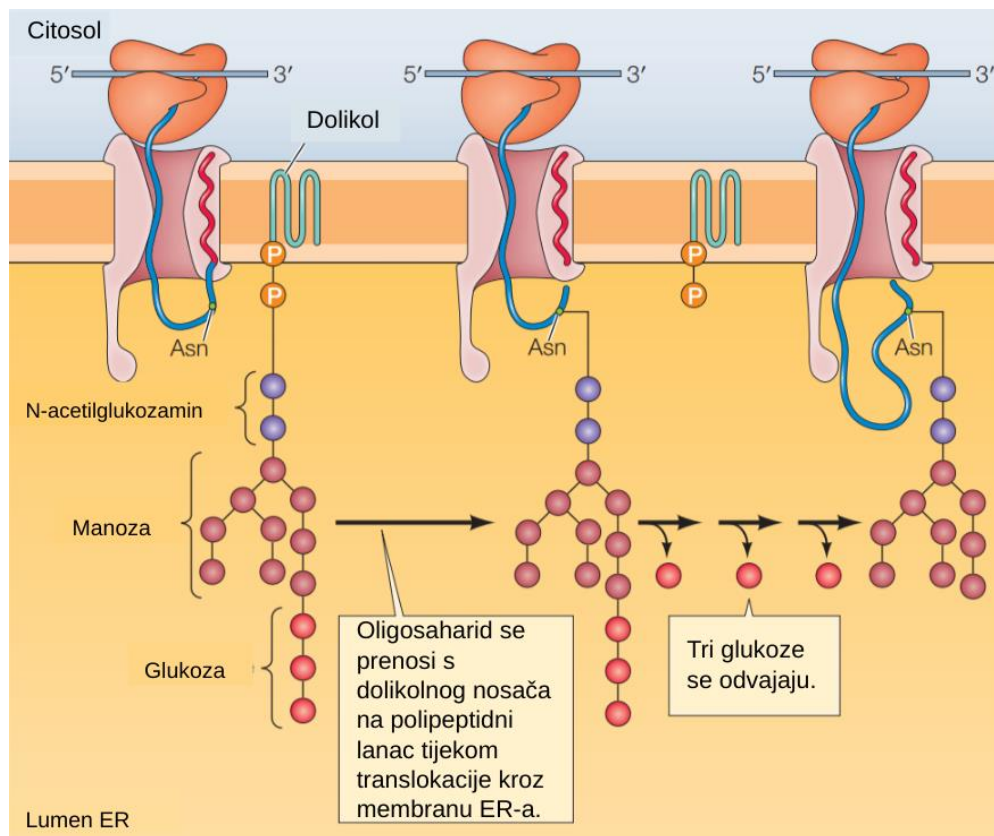


Slika 3. Reakcije nastanka aktiviranih oblika monosaharida (preuzeto i prilagođeno iz Varki i sur., 2017)

1.1.2. Biosinteza N-vezanih glikana

Prva faza biosinteze N-vezanih glikana započinje na membrani hrapavog ER-a, točnije na lipidnom nosaču dolikol-fosfatu (Dol-P). Dolikol-fosfat je usidren u membranu ER-a i na njemu se odvija sinteza osnovnog oligosaharida. Početni korak je vezanje GlcNAc-1-P na Dol-P katalizirano GlcNAc-1-fosfotransferazom pri čemu nastaje struktura Dol-P-P-GlcNAc. Time je omogućeno vezanje sljedećeg GlcNAc i pet manosa, a kao prekursori služe UDP-

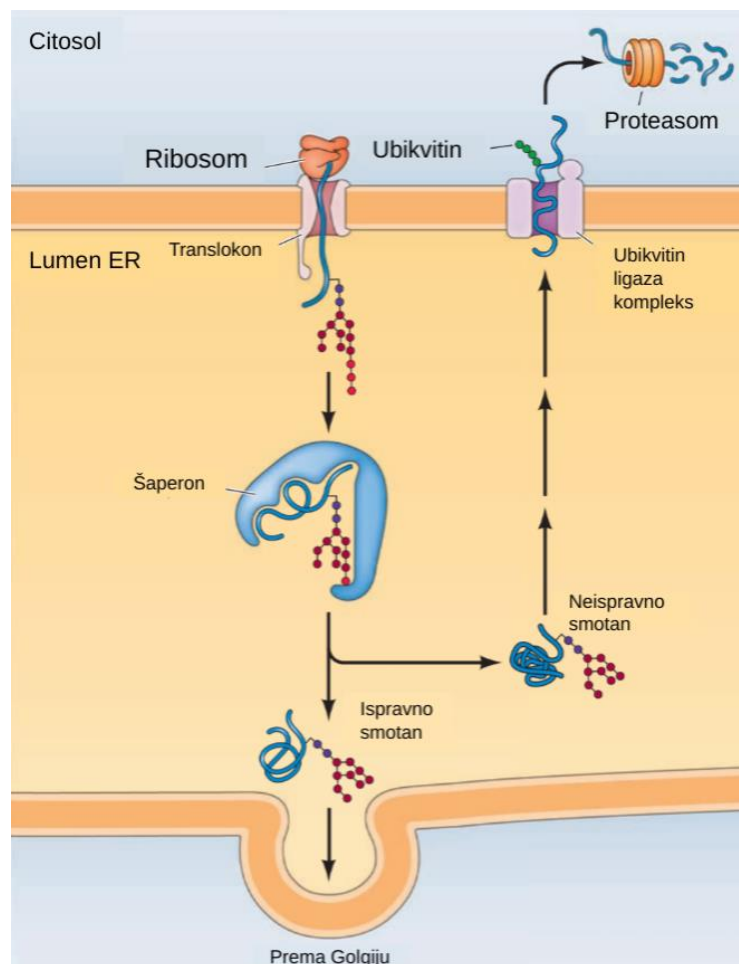
GlcNAc i GDP-Man. Ove se reakcije odvijaju s citoplazmatske strane membrane nakon čega slijedi korak kataliziran flipazom čime se cijela struktura translocira na luminalnu stranu ER-a. Donori idućih 4 manozna i 3 glukoze su Dol-P-Man i Dol-P-Glc, sintetizirani s citoplazmatske strane iz prekursora GDP-Man i UDP-Glc koji se također moraju translocirati na drugu stranu membrane. Konačni produkt je osnovni oligosaharid vezan na dolikol-pirofosfat, a sastoji se od 14 monosaharida, 2 N-acetilglukozamina, 9 manozna i 3 glukoze. (Varki i sur., 2017) Tijekom translokacije proteina, oligosaharid s dolikolnog nosača prenosi se na asparagin u Asn-X-Ser/Thr slijedu (gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina) u polipeptidnom lancu, uz pomoć enzima oligosaharil-transferaze (Slika 4). (Cooper, 2019)



Slika 4. Prijenos osnovnog oligosaharida na polipeptidni lanac i uklanjanje 3 glukoze unutar ER-a (preuzeto i prilagođeno iz Cooper, 2019)

Druga faza sinteze N-vezanih glikana započinje procesiranjem osnovnog oligosaharida glikozil-transferazama i glikozidazama u ER i nastavlja se u Golgijevom aparatu. Prvi korak u procesiranju je uklanjanje glukoznih ostataka uz α -glukozidaze I i II, gdje je α -glukozidaza I specifična za uklanjanje terminalne glukoze, a α -glukozidaza II uklanja dva unutarnja

glukoza ostataka (Slika 4). Kalneksin, kalretikulin i slični glikoproteinski šaperoni odgovorni su za prepoznavanje nepravilno smotanih proteina u ER. (Varki i sur., 2017) Smatanje glikoproteina odvija se istovremeno s reakcijama procesiranja oligosaharida. Šaperonska molekula se veže na glikoprotein nakon uklanjanja glukoza ostataka i provjerava izložene hidrofobne regije, glikoprotein je pravilno smotan ako nema izloženih hidrofobnih regija i nastavlja svoj put prema Golgijevom aparatu. U suprotnom, ako je previše izloženih hidrofobnih regija, protein se ne može pravilno smotati i usmjerava se na ubikvitiranje i razgradnju u proteasomu (Slika 5). (Cooper, 2019)

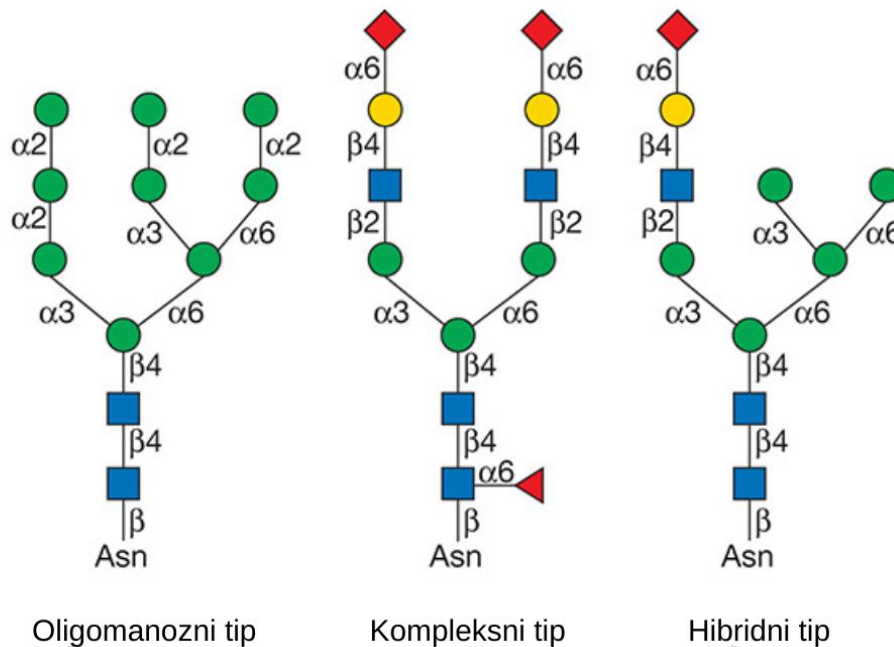


Slika 5. Smatanje glikoproteina uz pomoć šaperonskih molekula (preuzeto i prilagođeno iz Cooper, 2019)

Putujući od *cis*- preko *medijalne* do *trans*-Golgijeve mreže, N-vezani glikoproteini prolaze kroz ekstenzivnu modifikaciju budući da se u ovom organelu nalazi oko 250 enzima odgovornih za procesiranje glikoproteina. Jedna od modifikacija je vezanje N-acetilglukozamin-fosfata na specifični manozni ostatak u *cis*-Golgijevoj mreži nakon čega

slijedi uklanjanje GlcNAc ostatka. Produkt ove reakcije je manozna-6-fosfat (Man-6-P) koji se u *trans*-Golgijskoj mreži prepoznaje uz Man-6-P receptore i predodređuje za uklapanje u lizosome. (Cooper, 2019) Većina N-glikana u Golgijskom aparatu podliježe djelovanju manozidaza, a dolazi i do produžavanja grana glikana, vezanja sržne fukoze i završnog vezanja šećernih ostataka, tzv. *capping*-a, najčešće dodatkom Sia, Fuc, Gal ili GlcNAc. (Varki i sur., 2017)

U konačnici, svi N-glikani imaju istu sržnu sekvencu, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$, a prema ostalim značajkama dijele se u tri osnovna tipa, oligomanozni, hibridni i kompleksni tip (Slika 6). Oligomanozni tip sadrži manji broj (2 do 6) isključivo manoznih ostataka vezanih na sržnu strukturu. Kompleksni tip može imati do šest grana koje započinju s GlcNAc, a najčešće se produžuju s galaktoznim ostacima. Hibridni tip je kombinacija prethodna dva tipa, dolazi do grananja manoznih jedinica i produženja druge grane uz GlcNAc i Gal. (Varki i sur., 2017)



Slika 6. Osnovni tipovi N-glikana. Prikazani monosaharidi su N-acetilglukozamin (plavi kvadrat), manozna (zeleni krug), galaktoza (žuti krug), sijalinska kiselina (crveni kvadrat) i fukoza (crveni trokut). (preuzeto i prilagođeno iz Varki i sur., 2017)

1.1.3. Biosinteza O-vezanih glikana

Za razliku od N-vezanih glikana, O-vezani glikani se sintetiziraju isključivo u Golgijevom aparatu. GalNAc-transferaza katalizira prvi korak u kojem se GalNAc, iz prekursora UDP-GalNAc, veže za hidroksilnu skupinu serina ili treonina u polipeptidnom lancu. (Varki i sur., 2017) Modifikacije koje slijede uključuju sekvencijsko vezanje pojedinih monosaharidnih ostataka. Neki O-vezani glikani se sastoje od malog broja monosaharida, dok su proteoglikani (od kojih su najpoznatiji mucini) primjer ekstenzivne O-glikozilacije, sadrže stotinjak O-vezanih glikana na sržni protein koji se sastoje od stotinjak monosaharidnih jedinica. (Cooper i Hausman, 2010) Osim O-GalNAc glikana, postoji i nekoliko drugih vrsta O-vezanih glikana, O-glukoza, fukoza ili manosa vezani glikani. (Varki i sur., 2017)

1.2. Biološka uloga glikana

Glikozilacija proteina najkompleksnija je posttranslacijska modifikacija i ključna je za sve oblike višestaničnog života. Iako mnoge stanice u ljudskom organizmu mogu funkcionirati bez jezgre, ne postoji niti jedna živa stanica koja može funkcionirati bez prisutnosti glikana na staničnoj površini. Štoviše, znanstvena istraživanja su pokazala da je odsutnost glikozilacije na embrionalnoj razini letalna. (Lauc i sur., 2014; Marek i sur., 1999)

Biološke uloge glikana ugrubo se mogu podijeliti na strukturnu i modulacijsku ulogu, u koju je uključeno i skladištenje hranjivih sastojaka, signalizacijsku ulogu koja uključuje komunikaciju između stanica, adheziju i transmisiju signala te molekularnu mimikriju vlastitih glikana koja može biti iskorištena od strane patogenih mikroorganizama za uspješnu invaziju stanica domaćina. (Varki i sur., 2017)

Najvažnija strukturna uloga je formiranje ekstracelularnog matriksa koji okružuje sve eukariotske stanice, a ima ključnu ulogu u diferencijaciji, proliferaciji, preživljavanju i migraciji stanica, a pretpostavlja se i da su glikani ekstracelularnog matriksa sudjelovali u evoluciji višestaničnih organizama. (Lauc i sur., 2014)

Polimerizirani glikani, škrob i celuloza kod biljaka i glikogen kod životinja, imaju ključnu ulogu u skladištenju hranjivih sastojaka te zbog relativne otpornosti na digestiju enzimima važnu ulogu imaju i kao gradivne komponente. (Varki i sur., 2017)

Glikani imaju brojne biološke uloge u interakcijama između stanica i interakciji stanica i izvanstaničnog matriksa, od kojih je možda najviše istraženo privlačenje, vezanje i dijapedeza limfocita prilikom upale gdje dolazi do vezanja glikoziliranih liganda i selektina. (Varki i sur.,

2017; Lauc i sur., 2014) Važnu ulogu glikani imaju i u procesu reprodukcije, gdje sijalinske kiseline maskiraju glikane spermatozoida kako ih ženski reproduktivni sustav ne bi prepoznao kao strane, a desijalinizacija nakon ulaska omogućuje sazrijevanje spermatozoide i uspostavljanje interakcije s jajnom stanicom. (Lauc i sur., 2014)

Također, mnogi glikani sudjeluju u specifičnim interakcijama između stanica i mikroorganizama, a glikani vezani na topljive glikokonjugate kao što su mucini, vežu mikroorganizme i tako sprječavaju njihovo vezanje za stanice sluznica. (Varki i sur., 2017)

Osim navedenih uloga, glikozilacija imunoglobulina G predstavlja jedno od najvažnijih oružja za borbu protiv mikroorganizama. Varijabilne regije imunoglobulina genski su predodređene, u većini slučajeva, prije kontakta s određenim antigenom, stoga je potrebna aktivacija različitih efektorskih mehanizama pri susretu s različitim mikroorganizmima ili toksinima u čemu ključnu ulogu ima upravo glikozilacija. Dvoantennarni glikan N-vezan na visokokonzervirani Asn 297 ostatak u Fc regiji imunoglobulina G značajno utječe na efektorsko djelovanje IgG-a. Primjerice, prisutnost sržno vezane fukoze na glikanskoj strukturi smanjuje mogućnost vezanja za FcγRIIIa receptore kojim se inače aktivira o antitijelu ovisna stanična citotoksičnost. Nedostatna regulacija ove posttranslacijske modifikacije može dovesti do razvoja autoimunih bolesti ili tumora. Glikozilacija IgG-a utječe i na njegovo pro- ili protuupalno djelovanje. Naime, vezanje sijalinske kiseline na krajeve glikana mijenja proupalno djelovanje IgG-a u protuupalno djelovanje, a galaktozilacija glikana također doprinosi protuupalnom djelovanju imunoglobulina G. (Lauc i sur., 2014)

Zbog svih navedenih uloga, provedena su iscrpna istraživanja osnovnih osobina i prirodnih varijacija N-glikozilacijskih profila ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G te je dokazano da dob, spol, reproduktivni ciklus, okolišni utjecaji i životne navike kao što je primjerice pušenje, pridonose varijaciji ljudskog glikoma. (Knežević i sur., 2010) Također je pokazano kako N-glikozilacijski profili ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G imaju potencijalnu kliničku ulogu u ranom otkrivanju patoloških procesa, kao što su primjerice dijabetes tipa 2 i kardiovaskularne bolesti. (Wittenbecher i sur., 2020)

1.2.1. Promjene N-glikozilacije s dobi

Aminokiselinski slijed u proteinu određen je slijedom nukleotida koji je zadan genskim kodom. Iz tog se razloga, polipeptidne sekvence ne mijenjaju s dobi. S druge strane, glikanske strukture, koje su odgovorne za pravilno smatanje proteina, razgradnju proteina, vezanje na receptore i ostale fiziološki važne procese, rezultat su djelovanja velikog broja enzima koji su

regulirani kompleksnom mrežom velikog broja gena, a podložni su i epigenetičkom utjecaju. (Krištić i sur., 2013) Dokazano je da je u određenom fiziološkom stanju N-glikozilacijski profil osobe visoko stabilan, a sa starenjem ili u bolesti dolazi do promjena u glikozilacijskim procesima i posljedično do zamjetne promjene glikozilacijskog profila osobe. (Ruhaak i sur., 2011)

U više je istraživanja pokazano kako su određene glikanske strukture u snažnoj korelaciji s kronološkom dobi. Najznačajniju korelaciju s kronološkom dobi pokazuju agalaktozilirani glikani s dva ogranka, glikani sa sržno vezanom fukozom, glikani s dva ogranka gdje su oba sijalinizirana te agalaktozilirani i digalaktozilirani glikani. (Knežević i sur., 2010)

Tako se sa starenjem povećava udio agalaktoziliranih glikana, a smanjuje udio glikana sa sržno vezanom fukozom i monosijaliniziranih digalaktoziliranih glikana. Glikani s tri ogranka od kojih su sva tri sijalinizirana pokazuju smanjenje s dobi, dok ista struktura samo sa sržno vezanom fukozom pokazuje pozitivnu korelaciju s povećanjem dobi. Udio glikana s četiri ogranka također se povećava s dobi. (Ruhaak i sur., 2011)

Glikozilacijski profil N-glikana imunoglobulina G pokazuje slične promjene s dobi poput povećanja udjela agalaktoziliranih glikana te smanjenja udjela digalaktoziliranih glikana. Iako su promjene strukturno slične, glikom imunoglobulina G značajnije se mijenja starenjem budući da promatranjem glikana plazme dolazi do uprosječivanja promjena glikozilacije svih pojedinih proteina. Točnije, u 21 od ukupno 24 glikanska pika glikoma IgG-a dokazana je statistički značajna promjena s dobi. Galaktozilacija IgG-a povezuje se s njegovom protuupalnom ulogom, stoga se smanjenje galaktozilacije s dobi (koja tijekom života padne na 50% svoje maksimalne vrijednosti) povezuje s upalnim procesima u starijoj dobi. (Krištić i sur., 2013) Također, smanjenje galaktozilacije povezano je s povećanim indeksom tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) što ide u prilog proupalnog djelovanja IgG-a u razvoju pretilosti kojeg prati kronična upala organizma. (Nikolac Perković i sur., 2014)

1.2.2. Promjene N-glikozilacije s dobi u odnosu na spol

Istraživanja su pokazala kako su promjene glikanskog profila s dobi također i spolno specifične. Dok su neke promjene glikanskog profila, kao što je povećanje udjela agalaktoziliranih glikana i smanjenje udjela digalaktoziliranih glikana karakteristične za oba spola, starenje ima suprotan učinak na fukozilaciju glikana kod žena u odnosu na muškarce. Kod žena je zabilježeno statistički značajno smanjenje udjela glikana sa sržno i antenarno vezanim fukozama, dok je u muškaraca zabilježeno ekvivalentno povećanje glikana s

antenarno vezanim fukozama. Također, za muškarce je karakteristično povećanje udjela monosijaliniziranih glikana na račun smanjenja di- i trisijaliniziranih, a kod žena je sijalinizacija glikana gotovo konstantna tijekom života. (Knežević i sur., 2010)

Općenito, promjene glikanskog profila s dobi značajnije su kod žena i to posebice uspoređujući žene u petom i šestom desetljeću života. Statistički značajne razlike uočene su uspoređujući grupe žena u dobi od 40 do 49 godina s onima u dobi od 50 do 59 godina. Promjene su uočene u razini sijalinizacije, prisutnosti sržno vezane fukoze, stupnju grananja i razini galaktozilacije. Imajući na umu navedenu specifičnu dob, može se zaključiti da su zabilježene promjene posljedica prelaska iz premenopauzalnog u postmenopauzalni period, odnosno da se radi o hormonski uzrokovanim promjenama. (Knežević i sur., 2010) U N-glikozilacijskom profilu imunoglobulina G također su zabilježene značajnije promjene kod žena, osobito u razdoblju između 45 i 55 godina. (Krištić i sur., 2013)

1.2.3. Promjene N-glikozilacije u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima

Osim što su promjene N-glikozilacije povezane s dobi i spolom, mnoge su studije provedene kako bi se istražile promjene glikoma povezane s genskim, različitim fiziološkim i okolišnim čimbenicima te životnim navikama. Rano je pokazano kako pušenje možda u najvećoj mjeri utječe na promjene glikozilacije u odnosu na ostale životne navike. (Knežević i sur., 2009) Uzevši u obzir da je pušenje jedan od važnijih rizičnih faktora koji pridonose preuranjenoj smrtnosti, nije neuobičajeno kako su zabilježene promjene u N-glikozilacijskom profilu pušača iste one koje su povezane s upalnim procesima. Kod pušača se tako primjećuje povećan udio tetraantenarnih i tetragalaktoziliranih struktura, a smanjen udio biantenarnih struktura te struktura sa sržno vezanom fukozom. (Knežević i sur., 2010) Upravo je povećano grananje N-glikana povezano s upalnim procesima. (Gornik i Lauc, 2008)

Pretilost je poznati rizični faktor za razvoj različitih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti i dijabetes tipa 2, a stanje pretilosti praćeno je kroničnom upalom. (Nikolac Perković i sur., 2014) Povećan postotak tjelesne masti i povećan krvni tlak popratni su simptomi pretilosti. Oba se navedena simptoma povezuju sa smanjenim udjelom digalaktoziliranih glikana i povećanim udjelom agalaktoziliranih glikana i sijalinizacijom biantenarnih glikanskih struktura. Lipidni status, odnosno povećane koncentracije lipoproteinskih čestica pokazuju pozitivnu korelaciju s tetragalaktoziliranim glikanskim strukturama prethodno povezanim s upalnim procesima. (Knežević i sur., 2010) Povećanje BMI-ja povezuje se sa smanjenjem galaktozilacije IgG-a, dok su njegove normalne vrijednosti u korelaciji s povećanom galaktozilacijom IgG-a. Povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura IgG-a

kod osoba s povećanim BMI-jem povezuje se s proupalnom ulogom IgG-a. Nepotpuna galaktozilacija dovodi do izlaganja terminalnih GlcNAc struktura koje omogućuju vezanje IgG-a za lektin koji vezuje manozu čime se aktivira sustav komplementa i posljedično dolazi do kronične upale koja karakterizira pretilost. (Nikolac Perković i sur., 2014)

Osim što je dokazana promjena glikozilacijskog profila u kroničnim upalnim stanjima, istraživanja sepse, kao akutnog upalnog stanja, dokazala su prvotno povećanje sijalinizacije plazmatskih proteina praćeno normalizacijom u kasnijim stadijima bolesti. (Gornik i Lauc, 2008) Ipak, najviše je istraživanja posvećeno promjenama glikozilacije u kroničnim upalnim stanjima. Tako je promatranjem N-glikozilacijskih obrazaca plazmatskih proteina moguće predvidjeti rizik od razvoja dijabetesa tipa 2 i razvoja kardiovaskularnih bolesti - razvijene su formule koje za izračun rizika uzimaju u obzir vrijednosti onih glikanskih pikova za koje je dokazana povezanost s razvojem određenih bolesti. Glikani koji su zastupljeni u tim glikanskim pikovima vezani su na proteine koji su uključeni u razne aspekte imunosti i metabolizma kroz signalizaciju, transport i međustanične interakcije. Promjene u glikozilaciji spomenutih plazmatskih proteina utječu na njihovu funkciju pa se iz tog razloga analiza glikanskog profila proteina plazme može povezati s rizikom od razvoja bolesti. (Wittenbecher i sur., 2020) Glikozilacija IgG-a se također povezuje s različitim kroničnim bolestima. Razlog povećanog udjela glikanskih struktura s račvajućim GlcNAc kod osoba s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih događaja je činjenica da se ova glikanska struktura povezuje s proupalnim djelovanjem IgG-a. Račvajući GlcNAc olakšava vezanje IgG-a za Fc γ receptore čime se povećava o antitijelu ovisna stanična citotoksičnost uključena u proupalne procese u organizmu koji su ishodišni mehanizam razvoja kardiovaskularnih događaja. S druge strane, s protuupalnim aktivnostima povezani su povećani udjeli sijaliniziranih struktura i struktura sa sržno vezanom fukozom u glikozilacijskom profilu IgG-a. (Menni i sur., 2018)

1.3. Analiza glikanske strukture

Glikanska struktura ovisi o vrsti i poretku povezanih monosaharida, o konfiguraciji i mjestu stvaranja glikozidnih veza te o mjestu stvaranja spomenutih veza s aglikonom. Također, glikanska struktura ovisi o vrsti stanice u kojoj se glikoprotein sintetizira, a ne smije se zanemariti niti trodimenzionalna struktura koja određuje vezanje s glikan vezujućim proteinima. Analiza svih ovih strukturnih značajki tako zahtjeva niz različitih analitičkih metoda, a odabir metode ovisi o tome želi li se detektirati glikane, odvojiti pojedine vrste

glikana, analizirati sastav monosaharida ili glikozidne veze ili definirati trodimenzionalnu strukturu glikana.

Strukturna karakterizacija glikana plazme ili imunoglobulina G uključuje prvo izolaciju N-glikana s glikoproteina, a zatim odvajanje pojedinih glikana kromatografskom metodom. (Varki i sur., 2017)

1.3.1. HILIC-UPLC¹ metoda

Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC) je separacijska tehnika slična kromatografiji normalnih faza utoliko što je stacionarna faza polarnija od mobilne. (Zauner i sur., 2011) HILIC metoda dijeli karakteristike i s kromatografijom normalnih i obrnutih faza te s ionsko izmjenjivačkom kromatografijom, a koristi se kao metoda izbora za separaciju nenabijenih visoko hidrofilnih molekula koje su previše polarne za retenciju u kromatografiji obrnutih faza, a nisu dovoljno nabijene za retenciju u ionsko izmjenjivačkoj kromatografiji. (Buszewski i Noga, 2011)

Kao stacionarna faza koristi se čista silika ili silika gel modificiran vezanjem amidnih, hidroksilnih ili aaminskih polarnih skupina, a kao mobilna faza često se koriste acetonitril kao slabije polarna organska komponenta i formijatna kiselina kao polarnija vodena komponentna. Preporučeni puferi su acetatne i formijatne amonijeve soli zbog hlapljivosti i dobre topljivosti u organskim otapalima. (Zauner i sur., 2011, Buszewski i Noga, 2011)

Separacijski mehanizam temelji se na različitoj distribuciji analita između acetonitrila, odnosno mobilne faze i vodenog sloja adsorbiranog na hidrofilnu stacionarnu fazu. (Buszewski i Noga, 2011) Promjena gradijenta, odnosno povećanje udjela vodene frakcije mobilne faze do otprilike 50% omogućuje eluiranje analita s kolone različitim retencijskim vremenom. Retencija analita u koloni ovisi o njegovoj hidrofilnosti, a u slučaju glikana ona ovisi o strukturnim značajkama, veličini, naboju, sastavu, glikozidnim vezama i grananju. Najznačajniju razliku pri separaciji glikana čini broj polarnih skupina. (Zauner i sur., 2011)

U vizualizaciji glikana pomaže fluorescentno obilježavanje, a N-vezani oligosaharidi se najčešće obilježavaju s 2-aminobenzamidom. Fluorescentne oznake hidrofobnog su karaktera stoga obilježeni glikani često imaju nešto kraća retencijska vremena u odnosu na svoje native oblike. (Zauner i sur., 2011)

¹ HILIC-UPLC (engl. *hydrophilic interaction ultraperformance liquid chromatography*) - tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC) predstavlja napredak u odnosu na HILIC-HPLC² zbog povećane efikasnosti u razdvajanju analita što rezultira boljom rezolucijom kao i zbog povećane analitičke brzine što omogućuje analizu većeg broja uzoraka. (Zauner i sur., 2011)

² HILIC-HPLC (engl. *hydrophilic interaction high performance liquid chromatography*) - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mnogo je populacijskih studija posvećeno analizi glikanskih profila ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G u ovisnosti o spolu i dobi ispitanika. Međutim, većina je analiza posvećena prvenstveno proučavanju razlike u glikozilaciji između različitih dobnih skupina grupiranih po spolu. Tim je studijama pokazano kako se dob ispitanika svakako mora uzeti u obzir prilikom postavljanja istraživanja budući da starenje utječe na promjenu glikana. Bez korekcije na dob, promjene uočene u nekoj populaciji ne moraju biti rezultat patofizioloških promjena uslijed neke bolesti, već rezultat utjecaja dobi. Dodatni razlog korekcije rezultata u odnosu na dob je činjenica da se većina komorbiditeta počinje razvijati u tridesetim i četrdesetim godinama života kada je utjecaj dobi na glikane već značajan. Iz tog se razloga prilikom istraživanja glikozilacijskih promjena u raznim bolestima i drugim patofiziološkim stanjima najčešće analiziraju uzorci ispitanika starijih od trideset ili četrdeset godina života. Nadalje, mnogo je istraživanja posvećeno komorbiditetima u djece, tijekom predadolescentnog i adolescentnog razdoblja također uzimajući u obzir razlike između spolova budući da se hormonske promjene razlikuju kako kod odraslih, tako i kod djece.

U ovom radu cilj je bio analizirati glikozilacijske razlike između spolova kod mladih zdravih ljudi, budući da su u literaturi takvi podaci rijetki. Za populaciju ljudi u dvadesetim godinama života, koji su sudjelovali u istraživanju, pretpostavilo se da još nije došlo do razvoja kroničnih promjena koje se javljaju sa starenjem i koje bi dovele do promjena u glikanima. Uzevši u obzir da se radi o ljudima koji su prošli adolescentno razdoblje, može se zanemariti i znatniji utjecaj hormonskih promjena prisutnih u adolescenciji. Na taj način su u radu prikazane razlike glikoma ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G uglavnom uzrokovane razlikama između spolova mladih zdravih ispitanika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U istraživanju su korišteni uzorci plazme 88 mladih zdravih ispitanika. Raspon dobi svih ispitanika je od 20 do 33 godine, a u istraživanju je sudjelovalo 42 osobe ženskog i 46 osoba muškog spola. Uzorci su prikupljeni tijekom 2019. godine, a analizirani su u sklopu suradnje s Medicinskim fakultetom u Osijeku.

Tablica 1. Prikaz podataka o ispitanicima čiji su uzorci plazme korišteni u istraživanju.

	Svi ispitanici	Žene	Muškarci
broj ispitanika	88	42	46
minimalna dob	20	22	20
maksimalna dob	33	31	33
medijan dobi	26	26	25

3.2. Materijali

3.2.1. Anorganske kemikalije

Tablica 2. Anorganske kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
KCl, kalijev klorid	Calbiochem
KH ₂ PO ₄ , kalijev dihidrogenfosfat	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄ , dinatrijev hidrogenfosfat	Acros Organics
NaCl, natrijev klorid	Carlo Erba
NH ₄ HCO ₃ , amonijev bikarbonat	Sigma-Aldrich

3.2.2. Organske kemikalije

Tablica 3. Organske kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
Dimetil sulfoksid, DMSO	Sigma
Formijatna kiselina, HCOOH, 98-100%	Emsure
Ledena octena kiselina, CH ₃ COOH, 100%	Emsure
Igepal CA-360	Sigma
Natrijev dodecil sulfat , SDS	Sigma
2-aminobenzamid, 2-AB	Sigma-Aldrich
2-pikolin boran, 2-PB	Sigma-Aldrich
Hladni acetonitril, ACN, 96%	Fluka
Etanol, C ₂ H ₅ OH	Sigma-Aldrich
Hidroksimetil aminometan, TRIS	Sigma Aldrich

3.2.3. Biološki materijali

Tablica 4. Enzimi

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
PNGaza F (peptid N-glikozidaza)	Prozyme

3.2.4. Otopine i puferi

Tablica 5. Otopine i puferi

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
pH Buffer Solution, alkalni standard za pH metar, pH: 9,21 +/- 0,02	Mettler Toledo GmbH
pH Buffer Solution, kiseli standard za pH metar, pH: 4,01 +/- 0,02	Mettler Toledo GmbH

30% octena kiselina u DMSO	Za 3 mL: pomiješati 0,9 mL octene kiseline s 2,1 mL DMSO
Otopina za obilježavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 μ L 30% octene kiseline u DMSO dodati 0,48 mg 2-aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana
4% Igepal	Za 100 mL: u 80 mL ultra čiste vode dodati 4 mL Igepala, otopiti na 65°C i mješaču da do rastapanja, zatim nadopuniti do 100 mL s ultra čistom vodom
2% SDS	Dodati 2 g SDS-a u 100 mL vode
1,33% SDS	Dodati 1,33 g SDS-a u 100 mL vode
10xPBS, phosphate buffer saline	Za 100 mL: dodati 8,0028 g NaCl, 1,3832 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2964 g KH ₂ PO ₄ , 0,1976 g KCl u 80 mL ultra čiste vode, provjeriti pH i titrirati sa standardnom otopinom da pH bude između 6,6 i 6,8, a zatim pretočiti u menzuru od 100 mL te do 100 mL nadopuniti s ultra čistom vodom
5xPBS, phosphate buffer saline	Za 100 mL: 50 mL 10xPBS prelići u menzuru od 100 mL i do 100 mL nadopuniti s ultra čistom vodom
1xPBS, phosphate buffer saline	Za 1 L: 100 mL 10xPBS prelići u menzuru, dodati ultra čiste vode do 900 mL, s NaOH titrirati da pH bude oko 7,4 i nadopuniti s ultra čistom vodom do 1000 mL.
Pufer amonijev formijat, 2M, pH 4,4	Za 500 mL: uliti 300 mL ultra čiste vode u posudu od 500 mL, dodati 37,75 mL formijatne kiseline, ohladiti otopinu, miješati na magnetskom mješaču, polako dodavati oko 75 mL NH ₄ OH do pH 4,2 (početan pH je <2), nakon postizanja sobne temperature otopine dodavati NH ₄ OH do pH 4,4

3.2.5. Laboratorijska oprema i pribor

Tablica 6. Laboratorijska oprema i pribor

OPREMA I PRIBOR	PROIZVOĐAČ
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 2 ml, za 96 uzoraka	Waters
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml, za 96 uzoraka	Waters
Pločice za pročišćavanje glikana	Orochem
Protein G pločica	Bia Separations
AcroPrep 96 GHP 0.45 µm filter pločica, 1 ml	Pall
AcroPrep 96 GHP 0.2 µm filter pločica, 1 ml	Pall
ABgene PCR pločica	ThermoFisher
PCR epruvete u traci (<i>PCR strip tubes</i>)	Kiagen
Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Ranin
Vacuum manifold, vakuumska pumpa	Pall Corporation
Magnetic Stirrer MSH 300, magnetski mješać	Biosan
Bio Vortex V1	Biosan
Shaker, tresilica	GFL
Centrifuga	Centifuge 5804 Eppendorf
pH metar Seven Compact	Mettler Toledo
AB54-S, analitička vaga	Mettler Toledo
Highland, analitička vaga	ADAM
NanoDrop 8000 Spektrofotometar	NanoDrop, Thermo Scientific
Pamučne vaticice za NanoDrop Spektrofotometar	Puritan
Mekani rupčići za NanoDrop Spektrofotometar	Kimwipes

3.3. Protokol pripreme uzoraka

3.3.1. Randomizacija uzoraka

Randomizacija uzoraka napravljena je kako bi se minimalizirao učinak predanalitičkih i analitičkih čimbenika na rezultate analize. Uzorci su randomizirani računalnim programom. Na svaku mikrotitarsku pločicu je, uz uzorke, randomizacijom raspodijeljeno po šest standarda i po dva uzorka slijepe probe (ultra čiste vode). Standardi i slijepe probe obrađeni su i analizirani na isti način kao i uzorci.

3.3.2. Izolacija IgG-a, deglikozilacija proteina i označavanje N-glikana

3.3.2.1. Izolacija plazmatskog imunoglobulina G uz protein G pločicu

Izolacija imunoglobulina G iz uzorka plazme provodi se uz protein G monolitnu pločicu. Pločica sadrži rekombinantni protein koji visoko-specifično veže Fc regiju imunoglobulina G, zbog čega je moguće IgG odvojiti od ostalih proteina plazme. IgG ostaje maksimalno očuvan prilikom izolacije, što omogućava višestruke analize strukture proteina. Dodatna prednost izolacije IgG-a uz protein G pločicu je činjenica da se pločica može koristiti za više izolacija. Uz prikladne uvjete ispiranja, pripreme i pohrane pločice, moguće je obaviti više desetaka izolacija na jednoj pločici.

Priprema uzoraka

Otopljeni uzorci plazme centrifugiraju se 3 minute na 13 400 rpm ili 10 minuta na 3000 rpm. 100 μ L svakog uzorka plazme otpipetira se u mikrotitarsku pločicu zapremnine 2 ml, na odgovarajuća mjesta otpipetira se i po 50 μ L plazma standarda. Uzorci se razrijede dodatkom 1xPBS pufera u omjeru 1:7 i prenesu u 1 mL AcroPrep GHP 0.45 μ m pločicu. Mikrotitarska pločica zapremnine 2 mL postavi se ispod GHP pločice i vakuumskom pumpom se u nju profiltriraju uzorci plazme. Sakupljeni filtrat se postavi na tresilicu do aplikacije na protein G pločicu.

Prekondicioniranje protein G pločice

Prekondicioniranje protein G pločice provodi se u nizu koraka na vakuumskoj pumpi, a tijekom svakog koraka potrebno je paziti da vakuum ne prijeđe 17 inHg. Protein G pločica se postavi na vakuumsku pumpu i u otpad se vakuumira pufer za pohranu (20 % (v/v) etanol u 20 mM TRIS-u i 0.1 M NaCl-u, pH 7.4) te se isprazni kadica za otpad. Otpipetira se po 2 mL ultra čiste vode i vakuumira u otpad, zatim se otpipetira po 2 mL 1xPBS-a i vakuumira u otpad i konačno po 1 mL 0.1 M formijantne kiseline i vakuumira u otpad. Za neutralizaciju se dodaje po 2 mL 10xPBS-a i vakuumira u otpad, a za dovođenje pločice u ravnotežu, dodaje se po 2 mL 1xPBS-a i također vakuumira u otpad, posljednji korak se ponovi dva puta. Kadicu za otpad potrebno je prazniti nakon svakog koraka.

Vežanje IgG-a i ispiranje

Uzorci filtrirane plazme se prenesu na protein G pločicu pazeći da ne dođe do kontaminacije između uzoraka. Pazeći da vakuum na prijeđe 10 inHg, plazma se vakuumira u infektivni otpad, a kadicu za otpad potrebno je oprati 70% etanolom. IgG je sada vezan za protein G pločicu i slijede koraci ispiranja. Otpipetira se po 2 mL 1xPBS-a i vakuumira u otpad pazeći da vakuum ne prijeđe 17 inHg, ovaj se korak ponovi još dva puta.

Elucija IgG-a s pločice

Mikrotitarska pločica zapremnine 2 mL postavi se ispod protein G pločice na vakuumskoj pumpi. Otpipetira se po 1 mL 0.1 M formijantne kiseline i primjeni vakuum (pazeći da ne prijeđe 10 inHg) kako bi se eluirao IgG. U pločicu s eluatom se doda po 170 μ L 1M amonijevog bikarbonata, pufera za neutralizaciju, i promiješa pipetiranjem. Pločica se poklopi s aluminijskom folijom i stavi na tresilicu do mjerenja koncentracije IgG-a.

Regeneracija i pohrana protein G pločice

Prema potrebi, pločica se može regenerirati dodatkom pufera koji se vakuumiraju u otpad na način da vakuum ne prijeđe 17 inHg. Redom se dodaje po 2 mL 0.1 M formijantne kiseline, 2 mL 10xPBS-a, 2 mL 1xPBS-a i po 1 mL pufera za pohranu pločice. Nakon posljednjeg vakuumiranja dodaje se po 1 mL pufera za pohranu u svaku jažicu, pločica se pokriva sa zaštitnim poklopcima i pohranjuje na +4°C.

Mjerenje koncentracije IgG-a i pohrana

Koncentracija izoliranog IgG-a mjeri se pomoću NanoDrop 8000 spektrofotometra uz odgovarajući softverski program koji korisnika provodi kroz sve korake tijekom analize. Instrument je potrebno inicijalizirati i postaviti nulte uvjete s ultra čistom vodom koja služi kao slijepa proba. Nakon toga se postavljaju uzorci u količinama od 2 do 3 μL . Softver rezultate izdaje u mg/mL . Nakon završetka mjerenja instrument se očisti ultra čistom vodom i PR-1 rekondicijskom otopinom, a između mjerenja se ispiru ultra čistom vodom i briše štapićima s pamučnom vaticom (Puritan) i mekim rupčićima (Kimwipes).

Izolirani uzorci IgG-a u mikrotitarskim pločicama se osuše u vakuumskoj centrifugi i pohrane u hladnjak do deglikozilacije.

3.3.2.2. Deglikozilacija proteina u otopini

Deglikozilacija proteina provodi se uz PNGazu F, enzim izoliran iz soja *Flavobacterium meningosepticum*. Enzim specifično kida vezu N-glikana i proteina. Deglikozilacija prethodi označavanju i analizi N-glikana.

Priprema uzoraka

Otopljeni uzorci plazme vorteksiraju se i centrifugiraju 3 minute na 13 400 rpm ili 10 minuta na 3000 rpm. 10 μL svakog uzorka otpipetira se u jažice mikrotitarskih pločica zapremnine 1 mL kako je prethodno predviđeno randomizacijom. Pločice s osušenim eluatima IgG-a izvade se iz hladnjaka na sobnu temperaturu.

Denaturacija

2% SDS, 1,33% SDS, 4% Igepal i 5xPBS izvade se iz hladnjaka kako bi postigli sobnu temperaturu. U svaki se uzorak plazme doda 20 μL 2% SDS-a i promiješa pipetiranjem. U svaki se uzorak osušenog eluata IgG-a doda 30 μL 1,33% SDS-a i promiješa do otapanja. Pločice s uzorcima se zatvore s adhezivnom folijom i inkubiraju 10 minuta u peći na 65°C . Pločice se zatim izvade i ostave 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se ohladile. Svakom se uzorku zatim doda 10 μL 4% Igepala pazeći da se koriste nastavci za pipete odrezanog vrha zato što je Igepal jako viskoznan, promiješa se pipetiranjem. Pločice s uzorcima se zatim stavljaju na tresilicu (blago) na 15 minuta.

Deglikozilacija

Enzimaska mješavina se pripravi s 10 μL 5xPBS-a i 0,12 μL PNGaze F za jedan uzorak. Kako bi se izbjegle moguće greške zbog pipetiranja, po pločici se dodaje još 30 μL 5xPBS-a u mješavinu. Svakom se uzorku dodaje 10 μL enzimske mješavine i resuspendira pipetiranjem. Pločice s uzorcima se zatvore s adhezivnom folijom i inkubiraju 18 sati na 37°C.

3.3.2.3. Označavanje, pročišćavanje i ispiranje N-glikana plazme i imunoglobulina G

Nakon deglikozilacije glikane je potrebno pročititi od ostatka proteina, označiti ih i pripremiti za analizu. Označavanje se provodi reakcijom reduktivne aminacije u kiselim uvjetima s 2-aminobenzamidom (fluorescentnom bojom) i 2-pikolin boranom (reducirajućim agensom) uz DMSO.

Priprema otopine za označavanje

Otopina za označavanje jednog uzorka priprema se dodavanjem 25 μL 30% octene kiseline u DMSO-u u 0,48 mg 2-aminobenzamida te se vorteksira do potpunog otapanja. Tu otopinu se dodaje u 1,12 mg 2-pikolin borana i sve se vorteksira do potpunog otapanja.

Označavanje uzoraka s 2-aminobenzamidom

Otpipetira se 25 μL otopine za označavanje u svaki uzorak i promiješa pipetiranjem. Pločica se zatvori adhezivnom folijom i ostavi 10 minuta na tresilici. Zatim se pločica stavi u peć na 2 sata na 65°C. Nakon isteka dva sata, pločica se izvadi i ostavi hladiti 30 minuta do postizanja sobne temperature. Uzorci su tada spremni za nanošenje na 1 mL AcroPrep GHP 0.2 μm filter pločicu.

Prekondicioniranje GHP filter pločice

Otpipetira se 200 μL 70% etanola u svaku jažicu GHP pločice i vakuumira u otpad. Zatim se otpipetira 200 μL ultra čiste vode u svaku jažicu pločice i vakuumira u otpad, i konačno se otpipetira po 200 μL hladnog 96% ACN-a i također vakuumira u otpad.

Nanošenje označenih N-glikana na GHP pločicu i njihovo pročišćavanje

700 μL hladnog 100% ACN-a se doda u svaki uzorak, pazeći da se poseban nastavak za pipetu koristi za svaki uzorak kako ne bi došlo do kontaminacije, promiješa se pipetiranjem i koristeći isti nastavak pažljivo se prenese ukupan volumen uzorka, koji iznosi oko 800 μL , u odgovarajuću jažicu GHP pločice. Inkubira se 2 minute i zatim se vakuumira u otpad (kod

korištenja vakuumske pumpe potrebno je paziti da vakuum ne prijeđe 2 inHg). Otpipetira se 200 μ L hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu i vakuumira u otpad. Posljednji se korak ponovi još tri puta. Zatim se GHP pločica stavi na vrh pločice za sakupljanje uzoraka, otpipetira se 200 μ L hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu i sve se centrifugira 5 minuta na 1000 rpm.

Eluiranje označenih N-glikana

GHP pločica se postavi iznad čiste ABgene PCR pločice. U svaki se uzorak doda 90 μ L ultra čiste vode i stavi na tresilicu 15 minuta. Zatim se tako položene obje pločice centrifugiraju 5 minuta na 1000 rpm kako bi se skupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Postupak dodatka ultra čiste vode, stavljanja na tresilicu i centrifugiranja se ponavlja, ali se sakuplja druga frakcija eluata u PCR pločicu. Na kraju se provjerava ukupan volumen eluata, koji treba biti 180 μ L te je li se sve eluiralo, odnosno ima li kapljica. PCR pločica se zatvori PCR poklopcima i pohrani u zamrzivač. Pripremljeni N-glikani su spremni za analizu.

3.4. Analiza uzoraka

3.4.1. Analiza N-glikana HILIC-UPLC metodom

N-glikani plazme i imunoglobulina G analiziraju se HILIC-UPLC metodom na Waters Acquity UPLC analizatoru. Analizator se sastoji od pumpe koja propušta mobilnu fazu, kolone, automatskog injektora za uzorak i fluorescentnog detektora s valnom duljinom ekscitacije na 330 nm i emisije na 420 nm. Posebna se kolona koristi za analizu N-glikana plazme, dimenzija 2.1 x 150 mm i punjena česticama veličine 1,7 μ m, i za analizu N-glikana IgG-a, dimenzija 2.1 x 100 mm i punjena česticama veličine 1,7 μ m. Mobilnu fazu u oba slučaja čine 100 mM amonijev formijat, pH 4.4, kao otapalo A i acetonitril kao otapalo B. Protok mobilne faze regulira se programom Empower. Kod analize N-glikana plazme početni uvjeti su sljedeći, protok 0.561 mL/min, 30% otapala A i 70% otapala B, uz temperaturu kolone od 25°C i temperaturu uzoraka od 10°C. Kod analize N-glikana IgG-a početni uvjeti su nešto drugačiji, protok je 0.4 mL/min, 25% otapala A i 75% otapala B, uz temperaturu kolone namještenu na 60°C i temperaturu uzoraka također na 10°C.

Tablica 7. Promjena udjela otapala A i B tijekom kromatografske analize N-glikana plazme

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	%A	%B
0.00	0.561	30.0	70.0
1.47	0.561	30.0	70.0
24.81	0.561	47.0	53.0
25.50	0.250	70.0	30.0
27.00	0.250	70.0	30.0
28.00	0.250	30.0	70.0
31.50	0.561	30.0	70.0
33.00	0.400	0.0	100.0
45.00	0.000	0.0	100.0

Tablica 8. Promjena udjela otapala A i B tijekom kromatografske analize N-glikana IgG-a

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	%A	%B
0.00	0.4000	25.0	75.0
25.00	0.4000	38.0	62.0
26.00	0.4000	100.0	0.0
28.00	0.4000	100.0	0.0
29.00	0.4000	25.0	75.0
34.00	0.4000	25.0	75.0
35.00	0.4000	100.0	0.0
45.00	0.000	100.0	0.0

Nakon završetka analize, podaci se obrađuju u Empower programu. Rezultat analize HILIC-UPLC metodom je kromatogram koji se sastoji od glikanskih pikova koji odgovaraju glikanima prisutnima u uzorku u odnosu na njihovo retencijsko vrijeme prolaska kroz kolonu. Kromatogrami se ručno integriraju i dobivaju se podaci koji se koriste za izračun deriviranih svojstava i statističku analizu. Detaljni prikaz kromatograma, glikanskih struktura u pojedinim glikanskim pikovima i izračun deriviranih svojstava opisani su u poglavlju Rezultati.

3.4.2. Statistička analiza podataka

Integriranjem površina ispod pojedinih pikova u kromatogramu dobiven je relativni udio svakog glikanskog pika u ukupnom sastavu glikana ukupnih plazmatskih proteina ili IgG-a ispitanika. Podaci su analizirani u programu MedCalc 19.2.1. Budući da se radi o velikim uzorcima čije varijable nisu razdijeljene po normalnoj razdiobi (normalnost raspodjele varijabli za svaki glikanski pik provjerena je Shapiro-Wilkovim testom i nije potvrđena kod većine glikanskih pikova), usporedba glikanskih pikova između muškog i ženskog spola provedena je uz Mann-Whitney neparametrijski test za dva nezavisna uzorka. Dobivene p-vrijednosti prilagođene su prema Benjamini-Hochberg metodi kako bi se smanjio broj grešaka prve vrste, odnosno smanjio broj lažno statistički značajnih razlika između dviju uspoređivanih skupina. Prilagođene p-vrijednosti manje od 0.05 mogu se smatrati statistički značajnima. Također, uz usporedbu glikanskih pikova, izračunata su i derivirana svojstva uspoređena istom metodom između dvaju spolova.

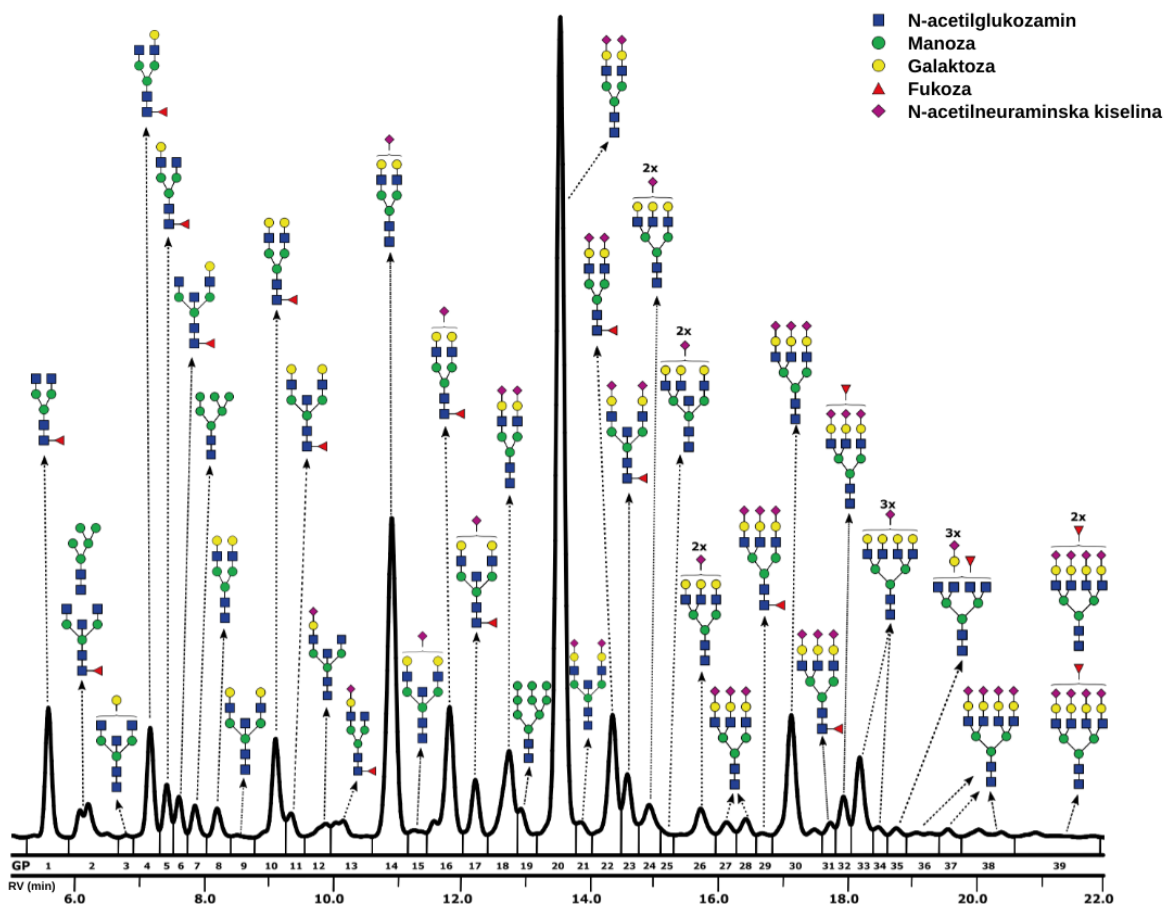
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kromatogrami N-glikana ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G

Kromatogram N-glikana ukupnih plazmatskih proteina ručnom se integracijom razdvaja u 39 pikova (GP1-GP39), a kromatogram N-glikana IgG-a u 24 pika (GP1-GP24). U slučaju glikana ukupnih plazmatskih proteina (Slika 7), uz svaki pik, prikazane su strukture glikana koji su u pojedinom piku najzastupljeniji, dok su kod kromatograma IgG-a (Slika 8), prikazani svi glikani koji se nalaze u pojedinom piku.

Površina ispod svakog kromatografskog pika predstavlja udio određenog glikana u ukupnoj smjesi N-glikana otpuštenih s ukupnih plazmatskih proteina ili IgG-a te se ti podaci koriste za statističku analizu.

Tablica 9 sadrži opis najzastupljenijih glikana u svakom od 39 plazmatskih glikanskih pikova, dok Tablica 10 sadrži sve glikanske strukture koje se nalaze unutar 24 glikanska pika imunoglobulina G.



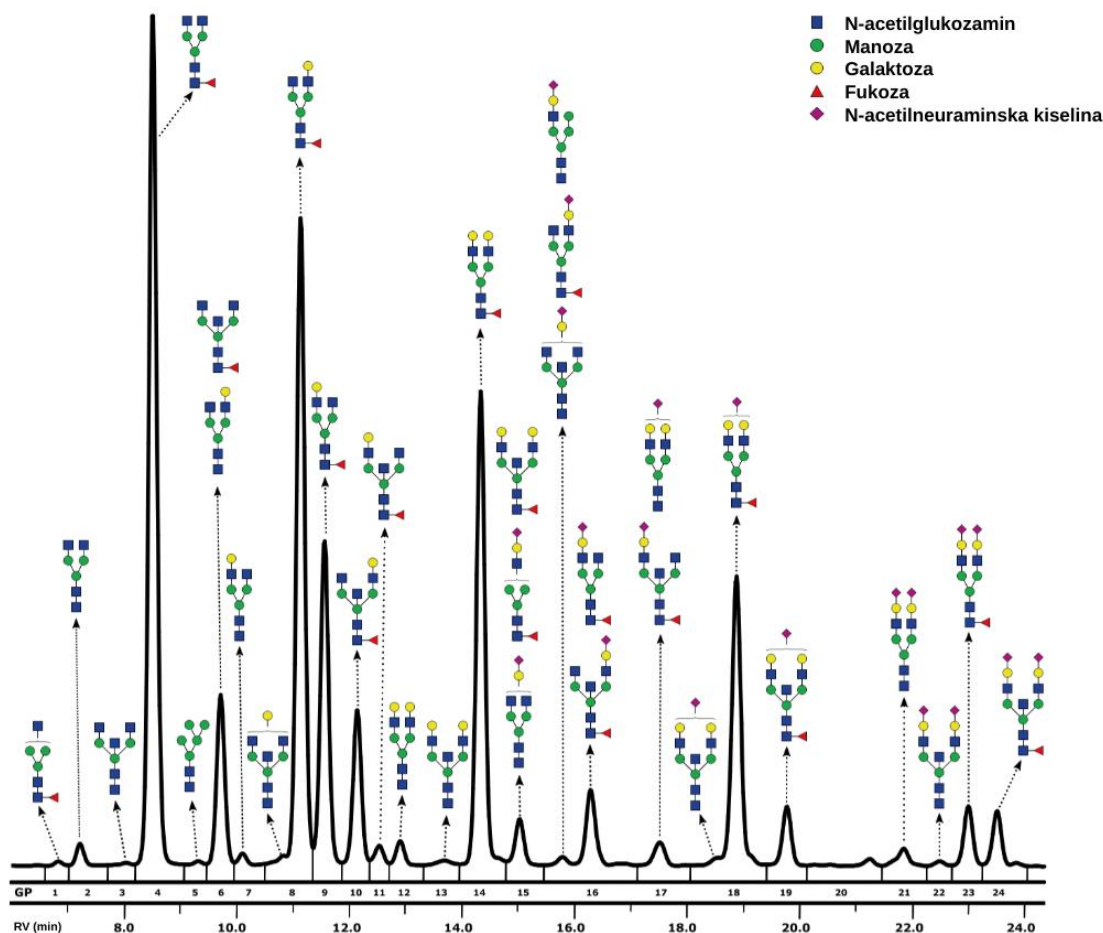
Slika 7. Primjer kromatograma N-glikana otpuštenih s ukupnih plazmatskih proteina te obilježenih s 2-aminobenzamidom dobiven HILIC-UPLC analizom gdje je uz svaki glikanski pik prikazana struktura samo najzastupljenijeg glikana u tom pik. Na apscisi je prikazano vrijeme proteklo od početka analize, a na ordinati intenzitet izmjerene fluorescencije. (preuzeto i prilagođeno iz Pavić i sur., 2018)

Tablica 9. Opis najzastupljenijih glikana za svaki od 39 kromatografskih pikova dobivenih razdvajanjem N-glikana otpuštenih s ukupnih plazmatskih proteina i obilježenih 2-aminobenzamidom te analiziranih HILIC-UPLC metodom. (preuzeto i prilagođeno iz Pavić i sur., 2018)

Glikanska skupina	Kratice strukture	Strukturni opis glikana
GP1	FA2	sržno vezana fukoza, biantenarni
GP2	M5; FA2B	oligomanozni; sržno vezana fukoza, biantenarni, s računjućim N-acetilglukozaminom
GP3	A2BG1	monogalaktozirani, biantenarni, s računjućim N-acetilglukozaminom
GP4	FA2[6]G1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, biantenarni

GP5	FA2[3]G1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, biantenarni
GP6	FA2[6]BG1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP7	M6	oligomanozni
GP8	A2G2	digalaktozilirani, biantenarni
GP9	A2BG2	digalaktozilirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP10	FA2G2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, biantenarni
GP11	FA2BG2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim N- acetilglukozaminom
GP12	A2[3]BG1S1	monogalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP13	FA2[3]G1S1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni
GP14	A2G2S1	digalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni
GP15	A2BG2S1	digalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N- acetilglukozaminom
GP16	FA2G2S1	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni
GP17	FA2BG2S1	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP18	A2G2S2	digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni
GP19	M9	oligomanozni
GP20	A2G2S2	digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni
GP21	A2BG2S2	digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N- acetilglukozaminom
GP22	FA2G2S2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni
GP23	FA2BG2S2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP24	A3G3S2	trigalaktozilirani, disijalinizirani, triantenarni
GP25	A3BG3S2	trigalaktozilirani, disijalinizirani, triantenarni, s račvajućim N- acetilglukozaminom
GP26	A3G3S2	trigalaktozilirani, disijalinizirani,

		triantenarni
GP27	A3G3S3	trigalaktozilirani, trisijalinizirani, triantenarni
GP28	A3G3S3	trigalaktozilirani, trisijalinizirani, triantenarni
GP29	FA3G3S3	sržno vezana fukoza, trigalaktozilirani, trisijalinizirani, triantenarni
GP30	A3G3S3	trigalaktozilirani, trisijalinizirani, triantenarni
GP31	FA3G3S3	sržno vezana fukoza, trigalaktozilirani, trisijalinizirani, triantenarni
GP32	A3F1G3S3	antenarno vezana fukoza, trigalaktozilirani, trisijalinizirani, triantenarni
GP33	A4G4S3	tetragalaktozilirani, trisijalinizirani, tetraantenarni
GP34	A4G4S3	tetragalaktozilirani, trisijalinizirani, tetraantenarni
GP35	A4F1G3S3	antenarno vezana fukoza, trigalaktozilirani, trisijalinizirani, tetraantenarni
GP36	A4G4S4	tetragalaktozilirani, tetrasijalinizirani, tetraantenarni
GP37	A4G4S4	tetragalaktozilirani, tetrasijalinizirani, tetraantenarni
GP38	A4G4S4	tetragalaktozilirani, tetrasijalinizirani, tetraantenarni
GP39	A4F1G4S4; A4F2G4S4	antenarno vezana fukoza, tetragalaktozilirani, tetrasijalinizirani, tetraantenarni; dvije antenarno vezane fukoze, tetragalaktozilirani, tetrasijalinizirani, tetraantenarni



Slika 8. Primjer kromatograma N-glikana otpuštenih s imunoglobulina G te obilježenih 2-aminobenzamidom dobiven HILIC-UPLC analizom u kojem su prikazane strukture svih glikana u pojedinom glikanskom pik. Na apscisi je prikazano vrijeme proteklo od početka analize, a na ordinati intenzitet izmjerene fluorescencije. (preuzeto i prilagođeno iz Pavić i sur., 2018)

Tablica 10. Opis svih glikanskih struktura u 24 kromatografska pika dobivenih razdvajanjem N-glikana otpuštenih s imunoglobulina G i obilježenih 2-aminobenzamidom te analiziranih HILIC-UPLC metodom. (preuzeto i prilagođeno iz Pavić i sur., 2018)

Glikanska skupina	Kratice strukture	Strukturni opis glikana
GP1	FA1	sržno vezana fukoza, monoantennarni
GP2	A2	biantennarni
GP3	A2B	biantennarni, s račvujućim N-acetilglukozaminom
GP4	FA2	sržno vezana fukoza, biantennarni
GP5	M5	oligomanozni
GP6	FA2B	sržno vezana fukoza, biantennarni, s račvujućim N-acetilglukozaminom
GP7	A2G1	monogalaktozilirani, biantennarni

GP8	FA2[6]G1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, biantenarni
GP9	FA2[3]G1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, biantenarni
GP10	FA2[6]BG1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, biantenarni, s račvajućim GlcNac
GP11	FA2[3]BG1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, biantenarni, s račvajućim GlcNac
GP12	A2G2	digalaktozilirani, biantenarni
GP13	A2BG2	digalaktozilirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP14	FA2G2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, biantenarni
GP15	FA2BG2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP16	FA2G1S1	sržno vezana fukoza, monogalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni
GP17	A2G2S1	digalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni
GP18	FA2G2S1	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni
GP19	FA2BG2S1	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP20	Struktura nije određena	Struktura nije određena
GP21	A2G2S2	digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni
GP22	A2BG2S2	digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom
GP23	FA2G2S2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni
GP24	FA2BG2S2	sržno vezana fukoza, digalaktozilirani, disijalinizirani, biantenarni, s račvajućim N-acetilglukozaminom

4.2. Derivirana svojstva glikana

Derivirana svojstva računaju se zbog sličnih strukturnih značajki glikana sadržanih u pojedinim glikanskim pikovima. Ona predstavljaju zastupljenost pojedinih glikozilacijskih značajki, kao što su galaktozilacija, fukoziacija ili sijalinizacija, u glikanskom profilu. Ukupno je 14 deriviranih svojstava izračunato za glikanski profil plazme: udio mono- i biantenarnih struktura (LB), tri- i tetraantenarnih struktura (HB), agalaktoziliranih struktura (G0), udio mono- (G1), di- (G2), tri- (G3) i tetragalaktoziliranih (G4) struktura, udio mono- (S1), di- (S2), tri- (S3) i tetrasijaliniziranih (S4) struktura, udio struktura koje sadrže račvujući GlcNAc (B), struktura koje sadrže sržno vezanu fukožu (CF) i udio struktura koje sadrže antenarno vezanu fukožu (AF) u ukupnom plazmatskom N-glikomu. Za glikanski profil IgG-a izračunato je 6 deriviranih svojstava: udio agalaktoziliranih (G0), mono- (G1) i digalaktoziliranih (G2) struktura, udio sijaliniziranih struktura (S), udio struktura koje sadrže račvujući GlcNAc (B) i struktura koje sadrže sržno vezanu fukožu (CF) u ukupnom N-glikomu imunoglobulina G. Pojedina derivirana svojstva izračunata su kao zbroj određenih inicijalnih, direktno izmjerenih glikanskih pikova kao što je prikazano u Tablici 11.

Tablica 11. Opis deriviranih svojstava i pripadajuće formule za izračun iz inicijalnih, direktno izmjerenih glikanskih pikova. (preuzeto i prilagođeno iz Pavić i sur., 2018)

Derivirana svojstva N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina		
	Strukturno svojstvo	Formula
LB	udio mono- i biantenarnih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	$GP1+GP2+GP3+GP4+GP5+GP6+GP8+G9+GP10+GP11+0.5xGP12+GP13+GP14+GP15+GP16+GP17+GP18+GP20+GP21+GP22+GP23$
HB	udio tri- i tetraantenarnih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	$GP24+GP25+GP26+GP27+GP28+GP29+GP30+GP31+GP32+GP33+GP34+GP35+GP36+GP37+GP38+GP39$
G0	udio agalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	$GP1+GP2$
G1	udio monogalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	$GP3+GP4+GP5+GP6+GP13$
G2	udio digalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih	$GP8+GP9+GP10+GP11+0.5xGP12+GP14+GP15+GP16+GP17+GP18+GP20+GP21+$

	plazmatskih proteina	GP22+GP23
G3	udio trigalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP24+GP25+GP26+GP27+GP28+GP29+GP30+GP31+GP32+GP33+GP34+GP35
G4	udio tetragalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP36+GP37+GP38+GP39
S1	udio monosijaliniziranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	0.5xGP12+GP13+GP14+GP15+GP16+GP17
S2	udio disijaliniziranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP18+GP20+GP21+GP22+GP23+GP24+GP25+GP26+GP27
S3	udio trisijaliniziranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP28+GP29+GP30+GP31+GP32+GP33+GP34+GP35+GP36
S4	udio tetrasijaliniziranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP37+GP38+GP39
B	udio struktura koje sadrže račvujući N-acetilglukozaminom u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP2+GP3+GP6+GP9+GP11+GP15+GP17+GP23
CF	udio struktura koje sadrže sržno vezanu fukozu u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP1+GP2+GP4+GP5+GP6+GP10+GP11+GP13+GP16+GP17+GP22+GP23+GP31+GP34+ GP35
AF	udio struktura koje sadrže antenarno vezanu fukozu u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina	GP27+GP33+GP35+GP39
Derivirana svojstva N-glikoma IgG-a		
G0	udio agalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	GP1+GP2+GP4+GP6
G1	udio monogalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	GP7+GP8+GP9+GP10+GP11+GP16
G2	udio digalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	GP12+GP13+GP14+GP15+GP17+GP18+GP19+GP21+GP22+GP23+GP24
CF	udio struktura koje sadrže sržno vezanu fukozu u ukupnom N-glikomu IgG-a	GP1+GP4+GP6+GP8+GP9+GP10+GP11+GP14+GP15+GP16+GP18+GP19+GP23+GP24

S	udio sijaliniziranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	GP16+GP17+GP18+GP19+GP21+GP22+GP23+GP24
B	udio struktura koje sadrže računajući N-acetilglukozaminom u ukupnom N-glikomu IgG-a	GP6+GP10+GP11+GP13+GP15+GP19+GP22+GP24

4.3. Rezultati

4.3.1. Razine glikana u uzorcima ispitanika

U istraživanju je analizirano ukupno 88 uzoraka plazme dobivenih od 88 ispitanika (Tablica 1). Za svakog ispitanika su analizirani N-glikani ukupnih plazmatskih proteina i N-glikani imunoglobulina G. U Tablici 12 prikazane su razine svakog glikanskog pika prisutnog u kromatogramu razdvojenih N-glikana (dani kao minimum, maksimum i medijan za svaki glikanski pik svih ispitanika).

Tablica 12. Opisna statistika pojedinih glikanskih pikova N-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a svih ispitanika

Plazma	minimum	maksimum	medijan	IgG	minimum	maksimum	medijan
GP1	1,76	8,65	4,00	GP1	0,03	0,17	0,07
GP2	1,26	3,18	1,92	GP2	0,14	1,29	0,41
GP3	0,04	0,16	0,08	GP3	0,07	0,27	0,14
GP4	2,66	6,46	4,67	GP4	8,04	27,46	16,31
GP5	1,21	3,63	2,22	GP5	0,10	0,48	0,18
GP6	0,78	2,05	1,33	GP6	2,29	8,48	3,66
GP7	0,73	2,22	1,12	GP7	0,13	0,83	0,39
GP8	1,20	2,49	1,72	GP8	14,62	23,40	19,32
GP9	0,08	0,19	0,11	GP9	6,90	12,08	9,26
GP10	2,84	7,68	5,15	GP10	3,06	6,49	4,47
GP11	0,72	2,07	1,14	GP11	0,40	0,94	0,60
GP12	0,87	1,77	1,36	GP12	0,29	2,82	0,91
GP13	0,33	1,22	0,59	GP13	0,15	0,40	0,28
GP14	9,96	16,55	12,99	GP14	9,87	24,58	18,05
GP15	0,33	0,99	0,47	GP15	1,12	2,69	1,83
GP16	4,71	8,62	6,18	GP16	2,06	3,89	2,88
GP17	1,16	4,33	1,88	GP17	0,89	2,79	1,39

GP18	2,28	4,55	3,39	GP18	7,30	15,45	10,98
GP19	0,76	1,63	0,99	GP19	1,27	2,59	1,79
GP20	20,24	31,75	24,83	GP20	0,10	0,64	0,29
GP21	0,37	0,73	0,53	GP21	0,76	2,99	1,14
GP22	2,47	4,96	3,69	GP22	0,07	0,27	0,14
GP23	0,85	2,55	1,50	GP23	1,07	2,74	1,82
GP24	1,18	3,27	2,05	GP24	1,09	2,27	1,60
GP25	0,12	0,23	0,17				
GP26	1,26	2,88	1,81				
GP27	0,39	1,90	1,02				
GP28	0,35	1,11	0,62				
GP29	0,10	0,37	0,17				
GP30	2,57	6,95	4,21				
GP31	0,20	0,92	0,41				
GP32	0,81	1,92	1,23				
GP33	1,01	4,52	2,50				
GP34	0,18	0,54	0,30				
GP35	0,14	0,55	0,28				
GP36	0,35	0,80	0,54				
GP37	0,16	0,66	0,36				
GP38	0,47	1,21	0,78				
GP39	0,28	1,59	0,61				

4.3.2. Razlika razine N-glikana ukupnih plazmatskih proteina obzirom na spol ispitanika

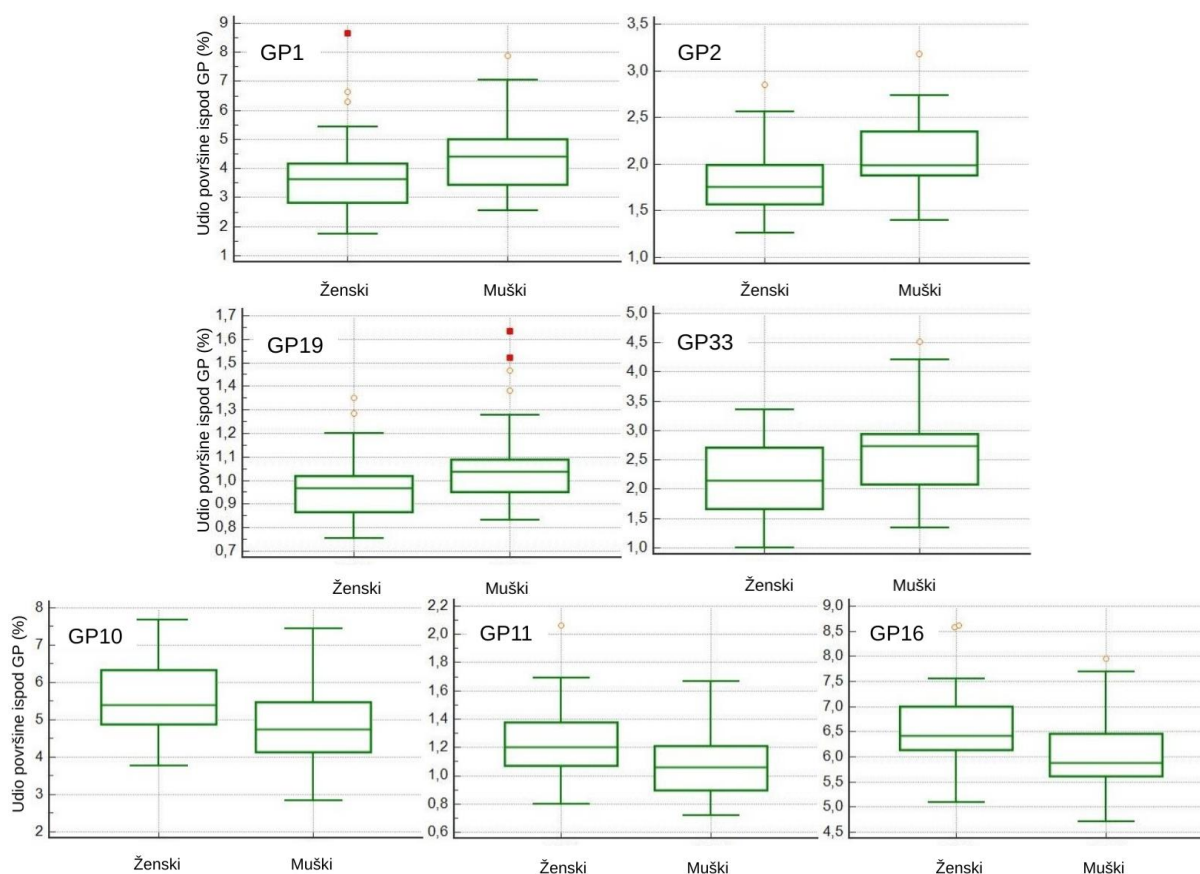
Rezultati svih ispitanika podijeljeni su u dvije skupine s obzirom na spol. Mann-Whitneyevim testom napravljena je usporedba između spolova za svaki glikanski pik kako bi se ustanovilo postoji li statistički značajna razlika. Rezultati statističke analize prikazani su u Tablici 13. Nakon prilagodbe p-vrijednosti prema Benjamini-Hochberg metodi, izdvojeni su oni glikanski pikovi kojima je prilagođena p-vrijednost manja od 0.05 (podebljani u tablici). Statistički značajna razlika između spolova ustanovljena je za glikanske pikove GP1, GP2, GP10, GP11, GP16, GP19 i GP33.

Tablica 13. Rezultati usporedbe glikanskih pikova N-glikana ukupnih plazmatskih proteina između spolova

	MIN		MAX		MEDIJAN		p-vrijednost	prilagođena p-vrijednost
	Ž	M	Ž	M	Ž	M		
GP1	1,76	2,54	8,65	7,89	3,64	4,40	<0,01	0,01
GP2	1,26	1,40	2,85	3,18	1,76	1,99	<0,01	<0,01
GP3	0,04	0,05	0,16	0,14	0,08	0,08	0,48	0,64
GP4	2,66	2,84	6,19	6,46	4,66	4,70	0,54	0,68
GP5	1,21	1,38	3,63	3,55	2,29	2,20	0,48	0,64
GP6	0,78	0,86	1,68	2,05	1,33	1,33	0,93	0,94
GP7	0,84	0,73	2,22	1,66	1,11	1,13	0,56	0,68
GP8	1,28	1,20	2,29	2,49	1,78	1,65	0,30	0,49
GP9	0,08	0,08	0,19	0,17	0,12	0,11	0,01	0,06
GP10	3,77	2,84	7,68	7,43	5,40	4,74	<0,01	0,02
GP11	0,80	0,72	2,07	1,67	1,20	1,06	<0,01	0,02
GP12	1,15	0,87	1,77	1,73	1,39	1,32	0,03	0,10
GP13	0,33	0,36	1,22	0,94	0,62	0,56	0,32	0,49
GP14	9,96	10,10	16,38	16,55	12,95	13,03	0,60	0,71
GP15	0,38	0,33	0,99	0,69	0,49	0,46	0,07	0,16
GP16	5,09	4,71	8,62	7,95	6,42	5,87	<0,01	0,02
GP17	1,30	1,16	4,33	3,46	1,99	1,72	0,01	0,06
GP18	2,57	2,28	4,55	4,45	3,42	3,36	0,44	0,63
GP19	0,76	0,83	1,35	1,63	0,97	1,04	0,01	0,03
GP20	20,24	20,31	29,52	31,75	24,53	25,11	0,11	0,21
GP21	0,42	0,37	0,73	0,69	0,53	0,54	0,36	0,54
GP22	2,76	2,47	4,87	4,96	3,66	3,79	0,65	0,73
GP23	0,85	1,01	2,55	2,13	1,53	1,48	0,13	0,25
GP24	1,45	1,18	3,27	2,94	2,10	1,92	0,05	0,13
GP25	0,13	0,12	0,23	0,22	0,17	0,17	0,78	0,86
GP26	1,40	1,26	2,88	2,82	1,91	1,75	0,05	0,13
GP27	0,39	0,60	1,34	1,90	0,92	1,11	0,02	0,06
GP28	0,38	0,35	1,11	0,84	0,63	0,58	0,05	0,14
GP29	0,12	0,10	0,37	0,30	0,17	0,18	0,51	0,66
GP30	2,57	2,67	6,95	6,48	4,43	4,10	0,03	0,09
GP31	0,20	0,24	0,92	0,63	0,44	0,36	0,01	0,06
GP32	0,84	0,81	1,90	1,92	1,21	1,28	0,37	0,55
GP33	1,01	1,35	3,36	4,52	2,14	2,74	<0,01	0,04

GP34	0,20	0,18	0,54	0,40	0,30	0,29	0,20	0,36
GP35	0,14	0,15	0,44	0,55	0,27	0,30	0,13	0,25
GP36	0,35	0,38	0,66	0,80	0,53	0,54	0,16	0,29
GP37	0,24	0,16	0,53	0,66	0,37	0,36	0,63	0,73
GP38	0,47	0,47	1,02	1,21	0,76	0,82	0,09	0,19
GP39	0,29	0,28	1,07	1,59	0,57	0,62	0,03	0,09

Statistički značajne razlike između spolova grafički su prikazane za svaki od prethodno spomenutih glikanskih pikova (Slika 9). Na grafičkim prikazima vidljivo je da su srednje vrijednosti udjela površine ispod glikanskih pikova GP1, GP2, GP19 i GP33 veće kod muških ispitanika, a pikova GP10, GP11 i GP16 kod ženskih ispitanika.



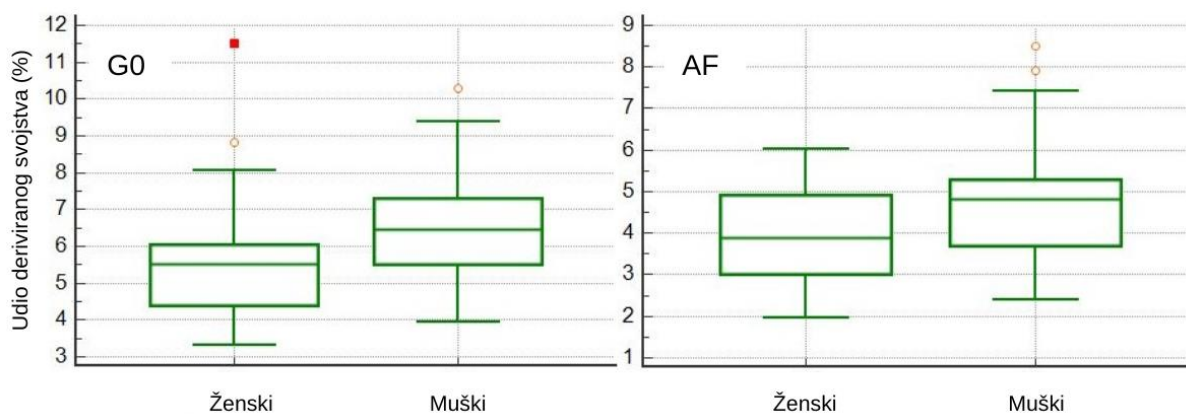
Slika 9. Grafički prikaz usporedbe glikanskih pikova N-glikana ukupnih plazmatskih proteina između spolova za one glikanske pikove za koje je utvrđena statistički značajna razlika.

4.3.3. Razlika razine deriviranih svojstava N-glikana ukupnih plazmatskih proteina obzirom na spol ispitanika

Nakon usporedbe izravno izmjerenih razina N-glikana, napravljena je usporedba derviranih svojstava N-glikana plazme, također Mann-Whitneyevim testom između spolova. Nakon prilagodbe p-vrijednosti, statistički značajna razlika između spolova utvrđena je za udio agalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina (G0) i udio struktura koje sadrže antenarno vezanu fukozu u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina (AF).

Tablica 14. Rezultati usporedbe deriviranih svojstava N-glikana ukupnih plazmatskih proteina između spolova

	MIN		MAX		MEDIJAN		p-vrijednost	prilagođena p-vrijednost
	Ž	M	Ž	M	Ž	M		
LB	75,57	74,38	83,49	84,09	79,94	79,93	0,93	0,94
HB	13,07	13,12	21,56	22,34	17,32	17,12	0,91	0,94
G0	3,31	3,94	11,50	10,30	5,50	6,45	<0,01	<0,01
G1	5,22	6,12	11,87	11,57	8,88	8,76	0,95	0,95
G2	57,45	59,89	71,61	69,82	66,02	64,05	0,07	0,16
G3	11,33	11,63	19,40	19,70	15,03	15,71	0,56	0,68
G4	1,40	1,43	3,06	3,69	2,27	2,42	0,06	0,15
S1	19,86	19,49	27,28	27,21	23,64	22,71	0,02	0,08
S2	34,07	34,28	44,05	22,82	38,83	39,23	0,48	0,64
S3	7,74	7,85	13,18	13,45	10,33	10,19	0,89	0,94
S4	1,05	1,04	2,42	2,89	1,71	1,88	0,06	0,15
B	5,81	6,49	13,73	11,79	8,97	8,44	0,27	0,45
CF	26,08	27,74	44,48	42,97	36,65	35,19	0,27	0,45
AF	1,95	2,39	6,03	8,51	3,90	4,83	<0,01	0,05



Slika 10. Grafički prikaz usporedbe deriviranih svojstava N-glikana ukupnih plazmatskih proteina između spolova za ona svojstva za koje je utvrđena statistički značajna razlika.

Na grafičkim prikazima vidljivo je da su srednje vrijednosti udjela i agalaktoziliranih glikana i glikana sa sržno vezanom fukozom u ukupnom N-glikomu ukupnih plazmatskih proteina veće kod muških ispitanika.

4.3.4. Razlika razine N-glikana IgG-a obzirom na spol ispitanika

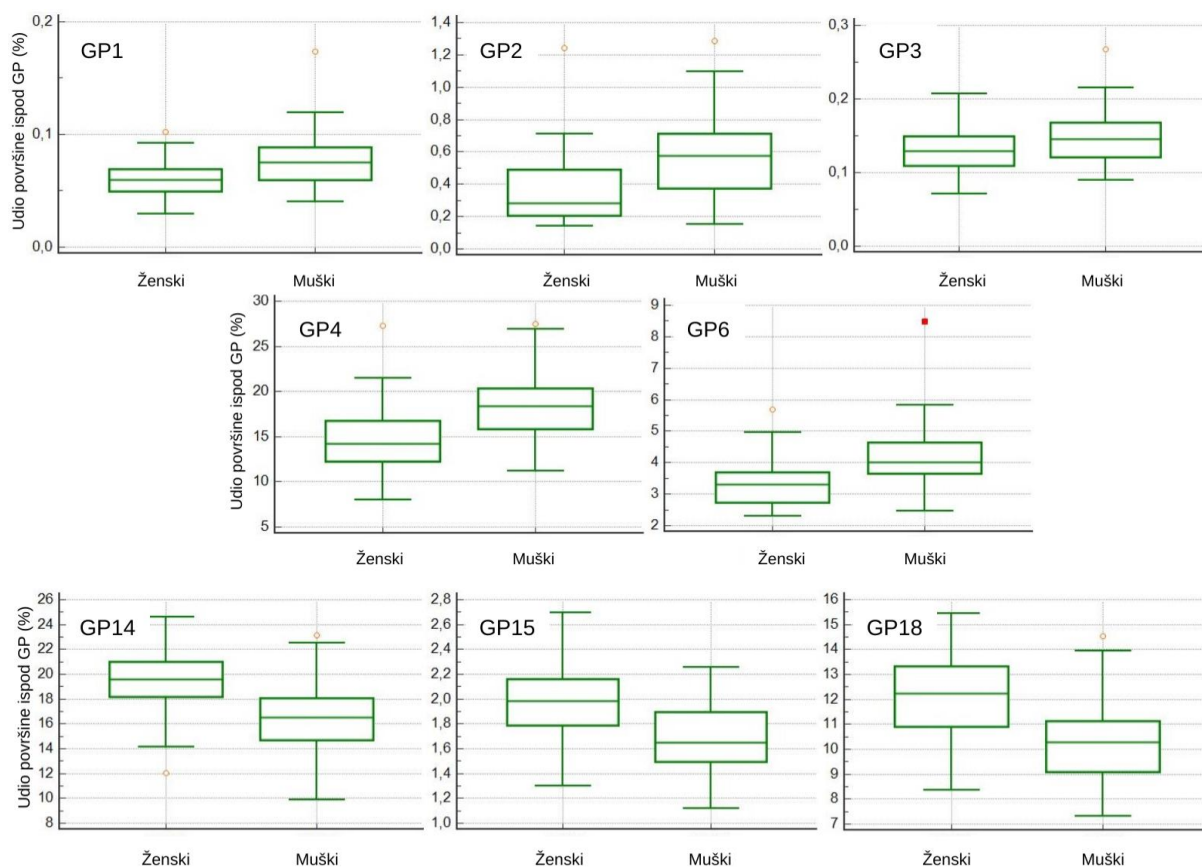
Na isti su način kao i za ukupne proteine, Mann-Whitneyevim testom i prilagodbom p-vrijednosti prema Benjamini-Hochberg metodi, obrađeni podaci glikanskih pikova IgG-a. Cilj analize N-glikana IgG-a bio je detaljnije utvrditi razlike između spolova budući da glikani plazme predstavljaju prosjek glikana svih proteina plazme. Rezultati su prikazani u Tablici 15 s podebljanim statistički značajnim razlikama glikanskih pikova između spolova. Statistički značajna razlika utvrđena je za veći broj glikanskih pikova, točnije za GP1, GP2, GP3, GP4, GP6, GP14, GP15 i GP18, a i dobivene p-vrijednosti znatno su manje nego kod plazmatskih pikova.

Tablica 15. Rezultati usporedbe glikanskih pikova N-glikana IgG-a između spolova

	MIN		MAX		MEDIJAN		p-vrijednost	prilagođena p-vrijednost
	Ž	M	Ž	M	Ž	M		
GP1	0,03	0,04	0,10	0,17	0,06	0,08	<0,01	<0,01
GP2	0,14	0,15	1,24	1,29	0,28	0,57	<0,01	<0,01
GP3	0,07	0,09	0,21	0,27	0,13	0,15	0,02	0,04
GP4	8,04	11,25	27,28	27,46	14,25	18,33	<0,01	<0,01
GP5	0,10	0,10	0,40	0,48	0,18	0,19	0,14	0,22

GP6	2,29	2,47	5,70	8,48	3,31	4,01	<0,01	<0,01
GP7	0,13	0,17	0,83	0,81	0,32	0,44	0,03	0,07
GP8	14,62	16,09	21,88	23,40	18,84	19,84	0,04	0,08
GP9	7,02	6,90	11,78	12,08	9,28	9,23	0,65	0,75
GP10	3,52	3,06	5,96	6,49	4,42	4,51	0,96	0,99
GP11	0,48	0,40	0,77	0,94	0,61	0,60	0,71	0,79
GP12	0,29	0,36	2,82	2,20	0,87	0,97	0,93	0,99
GP13	0,15	0,19	0,40	0,39	0,29	0,27	0,14	0,22
GP14	12,07	9,87	24,58	23,14	19,60	16,48	<0,01	<0,01
GP15	1,30	1,12	2,69	2,25	1,98	1,65	<0,01	<0,01
GP16	2,06	2,13	3,84	3,87	2,95	2,79	0,08	0,15
GP17	0,89	0,94	2,79	2,75	1,42	1,39	0,99	0,99
GP18	8,35	7,30	15,45	14,54	12,22	10,26	<0,01	<0,01
GP19	1,46	1,27	2,59	2,35	1,81	1,75	0,04	0,08
GP20	0,10	0,13	0,55	0,64	0,26	0,31	0,56	0,67
GP21	0,83	0,76	2,68	2,99	1,13	1,14	0,53	0,67
GP22	0,07	0,08	0,21	0,27	0,13	0,14	0,11	0,19
GP23	1,28	1,07	2,74	2,64	1,86	1,79	0,55	0,67
GP24	1,35	1,09	2,27	2,16	1,66	1,50	0,02	0,06

Statistički značajne razlike između spolova za pojedine glikanske pikove prikazane su i grafički na Slici 10. Vidljivo je kako su srednje vrijednosti udjela površine ispod glikanskih pikova GP1, GP2, GP3, GP4 i GP6 veće kod muških ispitanika, dok su kod ženskih ispitanika veće srednje vrijednosti udjela površine ispod GP14, GP15 i GP18.



Slika 11. Grafički prikaz usporedbe glikanskih pikova N-glikana IgG-a između spolova za one glikanske pikove za koje je utvrđena statistički značajna razlika.

4.3.5. Razlika razine deriviranih svojstava N-glikana IgG-a obzirom na spol ispitanika

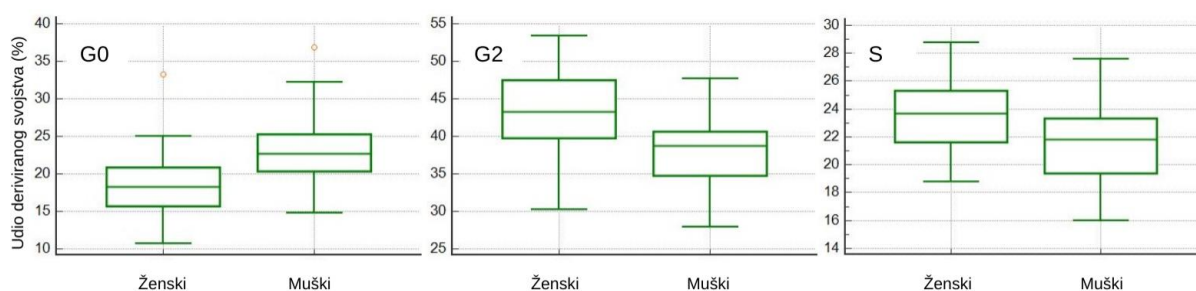
Nakon usporedbe glikanskih pikova, napravljena je i usporedba deriviranih svojstava N-glikana IgG-a istom metodom i uz prilagodbu p-vrijednosti. Rezultati analize prikazani su u Tablici 16 iz koje je vidljivo da je statistički značajna razlika između spolova utvrđena za udio agalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a (G0), udio digalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a (G2) i udio sijaliniziranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a (S).

Tablica 16. Rezultati usporedbe deriviranih svojstava N-glikana IgG-a između spolova

	MIN		MAX		MEDIJAN		p-vrijednost	prilagođena p-vrijednost
	Ž	M	Ž	M	Ž	M		
G0	10,74	14,76	33,30	36,85	18,25	22,69	<0,01	<0,01
G1	31,33	34,08	40,43	41,21	37,43	38,00	0,27	0,41
G2	30,19	27,95	53,32	47,68	43,29	38,74	<0,01	<0,01

CF	88,70	89,23	96,72	96,40	94,30	94,21	0,39	0,56
S	18,77	15,96	28,79	27,57	23,69	21,82	<0,01	<0,01
B	11,86	11,31	18,63	21,23	14,47	14,55	0,46	0,62

Iz grafičkih prikaza usporedbi deriviranih svojstava za koje je utvrđena statistički značajna razlika između spolova daje se zaključiti kako je srednja vrijednost udjela agalaktoziliranih glikana veća u populaciji muških ispitanika, a da su srednje vrijednosti udjela digalaktoziliranih i sijaliniziranih glikana veće u populaciji ženskih ispitanika.



Slika 12. Grafički prikaz usporedbe deriviranih svojstava N-glikana IgG-a između spolova za ona svojstva za koje je utvrđena statistički značajna razlika.

4.4. Rasprava

U ovom diplomskom radu ispitane su spolno uvjetovane razlike N-glikozilacijskih profila ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G. Primijećene su statistički značajne razlike između spolova u glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a, s izraženijim razlikama u glikozilacijskom profilu imunoglobulina G.

U glikanskom profilu ukupnih plazmatskih proteina zapažen je povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura kod pripadnika muške populacije. Razlog povećanog udjela agalaktoziliranih glikana u muškoj populaciji, čije je povećanje u pozitivnoj korelaciji s povećanjem životne dobi, može se povezati s činjenicom da kod muškaraca ne postoji protektivni učinak estrogena koji postoji kod žena. Protektivno djelovanje estrogena putem povećanja udjela galaktoziliranih glikana dokazano je u osoba koje imaju povećan udio estrogena u organizmu (premenopauzalne žene, nadomjesna terapija, muškarci koji primaju testosteron iz kojeg aromatizacijom nastaje estradiol), a povećan udio agalaktoziliranih glikana u muškoj populaciji zabilježen je već s početkom adolescencije. (Ercan i sur., 2017, Pučić i sur., 2012) Stoga je za očekivati da će kod muškaraca u dvadesetim godinama života

već doći do promjena karakterističnih za stariju populaciju koje neće u značajnoj mjeri biti vidljive kod žena do postmenopauzalnog perioda kada one gube protektivni učinak estrogena. Također, uočena je statistički značajna razlika u udjelu struktura s antenarno vezanom fukozom u korist muške populacije. Povećanje udjela glikanskih struktura s antenarno vezanom fukozom s dobi ranije je dokazano kao karakteristično za muškarce, dok kod žena, s povećanjem dobi, dolazi do smanjenja udjela takvih struktura. (Knežević i sur., 2010) Nadalje, statistički značajno, veći udio kod ispitanika muške populacije u odnosu na ženske ispitanike utvrđen je za jednu visoko razgranatu tetraantenarnu glikansku strukturu (GP33). Povećan udio visoko razgranatih glikanskih struktura povezuje se sa starijom životnom dobi i mnogim patofiziološkim stanjima koja se manifestiraju upalnim stanjem (Knežević i sur., 2010, Gornik i Lauc, 2008). Statistički značajna razlika utvrđena je za udio triju digalaktoziliranih glikanskih struktura (GP10, GP11), od kojih je jedna struktura ujedno i monosijalinizirana (GP16), u korist ženske populacije. Ovo se zapažanje može povezati s činjenicom da se udio digalaktoziliranih (i monosijaliniziranih) glikana uobičajeno smanjuje s dobi čime se ponovno upućuje na protektivni učinak estrogena kod žena. (Knežević i sur., 2010)

U glikozilacijskom profilu N-glikana IgG-a uočene su slične promjene. U muškoj je populaciji statistički značajno povećan udio agalaktoziliranih glikana, a u ženskoj digalaktoziliranih glikana. Dok monogalaktozilirani glikani ostaju relativno stabilni tijekom odraslog života, povećanje udjela agalaktoziliranih glikana događa se na račun smanjenja udjela digalaktoziliranih glikana čime se može objasniti zapažena pojava u ovom istraživanju. (Ercan i sur., 2017) Također, u glikozilacijskom profilu IgG-a opažen je statistički značajno veći udio sijalinizacije kod ženskih ispitanika što se pripisuje pozitivnom estrogenskom utjecaju. Povećanjem galaktozilacije glikana, estrogen indirektno povećava sijalinizaciju budući da je za vezanje sijalinske kiseline potrebno prethodno vezanje galaktoze. (Ercan i sur., 2017) Bitno je napomenuti kako se statistički značajna promjena agalaktoziliranih i digalaktoziliranih glikanskih struktura IgG-a reflektira na sličan rezultat u glikanskom profilu ukupnih plazmatskih proteina (udio agalaktoziliranih glikana je statistički značajno povećan u muškoj populaciji u odnosu na žensku, dok su digalaktozilirani glikani povećani u ženskoj populaciji u odnosu na mušku iako ne statistički značajno) zato što većina agalaktoziliranih i digalaktoziliranih glikanskih struktura u glikanskom profilu ukupnih plazmatskih proteina potječe iz imunoglobulina G. (Clerc i sur., 2015)

Općenito su razlike u glikanskim profilima između spolova manje izražene u dječjoj nego u odrasloj populaciji. (Pučić i sur., 2012). Razlog većoj različitosti glikozilacije između spolova

pripisuje se hormonskim utjecajima čije značajnije promjene započinju u adolescentnoj dobi, a teorija je potvrđena i značajnim razlikama u glikozilaciji između žena u premenopauzalnoj i postmenopauzalnoj dobi, budući da tada žene prolaze kroz najveće hormonske promjene tijekom života. (Pučić i sur., 2012, Knežević i sur., 2010) Ovim istraživanjem, provedenim na mladim zdravim ispitanicima, dodatno su osnažene tvrdnje o protektivnom učinku estrogena zbog kojeg su sve promjene povezane s povećanjem životne dobi vidljive u muškoj populaciji već u dvadesetim godinama života, dok će iste promjene u ženskoj populaciji biti vidljive kasnije tijekom života.

5. ZAKLJUČAK

Analizom glikanskih profila ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G kod mladih zdravih ljudi primijećene su značajne razlike u N-glikozilaciji s obzirom na spol.

U glikanskom profilu ukupnih plazmatskih proteina uočen je povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura, struktura s antenarno vezanom fukozom i visoko razgranatih glikanskih struktura kod muške populacije, dok je kod ženske populacije zabilježen povećan udio digalaktoziliranih i monosijaliniziranih glikanskih struktura.

U glikanskom profilu imunoglobulina G zapažen je povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura u korist muške populacije i povećan udio digalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura u korist ženske populacije.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem odgovaraju dosadašnjim zapažanjima opisanim u literaturi - kod mladih zdravih ljudi intenziviraju se razlike u glikozilaciji među spolovima u odnosu na spolne razlike u dječjoj i adolescentnoj populaciji, a potvrđen je i protektivni učinak estrogena. Kod ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju, u muškoj su populaciji opažene promjene karakteristične za stariju životnu dob, dok je u ženskoj populaciji dokazano jasno estrogensko protektivno djelovanje. Ovim istraživanjem pokazane su većinski spolno uvjetovane razlike N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kod mladih zdravih ljudi.

6. LITERATURA

Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*, 2015, 33, 309–343.

Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*, 8th edition. New York, Oxford University Press, 2019, str. 331-341, 383-412.

Ercan A, Kohrt WM, Cui J, Deane KD, Pezer M, Yu EW, Hausman JS, Campbell H, Kaiser UB, Rudd PM, Lauc G, Wilson JF, Finkelstein JS, Nigrovic PA. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight*, 2017, 2, e89703.

Gornik O, Lauc G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis Markers*, 2008, 25, 267–278.

Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wright A, Kolčić I, O'Donoghue N, Bones J, Rudd PM, Lauc G. Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *J Proteome Res*, 2009, 8, 694–701.

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

Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N, Šarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Spector T, Lauc G. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013, 69, 779–789.

Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans - the third revolution in evolution. *Front Genet*, 2014, 5, 1–7.

Marek KW, Vijay IK, Marth JD. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*, 1999, 9, 1263–1271.

Menni C, Gudelj I, Macdonald-Dunlop E, Mangino M, Zierer J, Bešić E, Joshi PK, Trbojević-Akmačić I, Chowienczyk PJ, Spector TD, Wilson JF, Lauc G, Valdes AM. Glycosylation Profile of Immunoglobulin G Is Cross-Sectionally Associated With Cardiovascular Disease Risk Score and Subclinical Atherosclerosis in Two Independent Cohorts. *Circ Res*, 2018, 122, 1555–1564.

Nikolac Perković M, Pučić Baković M, Krištić J, Novokmet M, Huffman JE, Vitart V, Hayward C, Rudan I, Wilson JF, Campbell H, Polašek O, Lauc G, Pivac N. The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 48, 20–25.

Pavić T, Dilber D, Kifer D, Selak N, Keser T, Ljubičić Đ, Vukić Dugac A, Lauc G, Rumora L, Gornik O. N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *J Transl Med*, 2018, 16, 323.

Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, Škledar M, Pivac N, Lauc G, Gornik O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology*, 2012, 22, 975–982.

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

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH. General Principles, Structure and Biosynthesis, Structural Analysis of glycans. U: Essentials of Glycobiology [Internet] 3rd edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.

Wittenbecher C, Štambuk T, Kuxhaus O, Rudman N, Vučković F, Štambuk J, Schiborn C, Rahelić D, Dietrich S, Gornik O, Perola M, Boeing H, Schulze MB, Lauc G. Plasma N-Glycans as Emerging Biomarkers of Cardiometabolic Risk: A Prospective Investigation in the EPIC-Potsdam Cohort Study. *Diabetes Care*, 2020, 43, 661-668.

Zauner G, Deelder AM, Wuhrer M. Recent Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) for Structural Glycomics. *Electrophoresis*, 2011, 32, 3456-66.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Glikozilacija je jedna od najčešćih i najkompleksnijih posttranslacijskih modifikacija proteina u eukariotskim stanicama ključna za sve oblike višestaničnog života. Istraživanja osnovnih osobina i prirodnih varijacija N-glikozilacijskih profila ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G pokazala su da dob, spol, reproduktivni ciklus, okolišni utjecaji i životne navike doprinose varijaciji ljudskog glikoma. U određenom fiziološkom stanju N-glikozilacijski profil osobe visoko je reproducibilan, a sa starenjem ili u bolesti dolazi do promjena u glikozilacijskim procesima i posljedično do zamjetne promjene glikozilacijskog profila osobe. Promjene glikanskog profila su u snažnoj korelaciji s kronološkom dobi, a neke promjene su i spolno specifične.

U ovom radu analizirane su glikozilacijske promjene između spolova mladih zdravih ljudi. Za populaciju ljudi u dvadesetim godinama života, koji su sudjelovali u istraživanju, pretpostavilo se da nije još došlo do razvoja kroničnih promjena koje se javljaju sa starenjem i koje bi dovele do promjene u glikanskom profilu ispitanika. Stoga bi statistički značajne razlike u glikanima zapažene u ovom diplomskom radu trebale uglavnom biti rezultat razlika između spolova.

U istraživanju su korišteni uzorci plazme 88 mladih zdravih ispitanika u dobi između 20 i 33 godine. HILIC-UPLC metodom analizirani su N-glikanski profili ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G. Dobiveni podaci su statistički uspoređeni pomoću Mann-Whitneyevog testa za nezavisne uzorke.

Statistički značajne razlike između spolova primijećene su u glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a, s izraženijim razlikama u glikozilacijskom profilu IgG-a. Najznačajnije razlike u glikanskom profilu ukupnih plazmatskih proteina uključuju povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura, struktura s antenarno vezanom fukozom i visoko razgranatih glikanskih struktura kod muške populacije i povećan udio digalaktoziliranih i monosijaliniziranih struktura kod ženske populacije. U glikanskom profilu imunoglobulina G uočen je povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura u korist muške populacije i povećan udio digalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura u korist ženske populacije.

Dobivenim rezultatima potvrđena su dosadašnja zapažanja u literaturi, a detaljno su pokazane većinski spolno uvjetovane razlike N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kod mladih zdravih ljudi.

7.2. Summary

Glycosylation is one of the most common and complex posttranslational modifications of proteins in eukaryotic cells and is essential for all forms of multicellular life. Studies on basic characteristics and natural variations of N-glycosylation profiles of total plasma proteins and immunoglobulin G have shown that age, sex, reproductive cycle, environmental influences and lifestyle habits contribute to the variation of human glycome. In a given physiological state, the N-glycosylation profile is highly reproducible, however, due to aging or disease, the glycosylation processes are altered and consequently noticeable changes occur in the glycosylation profile. Changes in the glycosylation profile are in a strong correlation with chronological age and some changes also show sex dependence.

This master thesis analysed glycosylation changes based on gender differences in a cohort of young healthy people. Since the majority of comorbidities and chronic health changes, which consequently influence glycans, usually start developing in thirties and/or forties and gradually worsen with age, we made the assumption that participants of this experiment (young healthy people in their twenties) have not yet developed mentioned health issues. Therefore, the glycan changes noticed in this experiment would mostly result from gender differences.

Plasma samples of 88 young healthy attendees, aged between 20 and 33 years were used in the study. Using HILIC-UPLC method, N-glycan profiles of total plasma proteins and immunoglobulin G were analyzed. Obtained data was statistically analyzed according to gender using the Mann-Whitney test for independent samples.

Statistically significant differences were found in glycosylation profiles of total plasma proteins and IgG, with more pronounced differences occurring in the IgG glycosylation profile. The most significant differences found in the glycosylation profile of total plasma proteins include an increase of agalactosylated glycan structures, structures containing antennary fucose and highly branched glycan structures in males and an increase of digalactosylated and monosialylated glycan structures in females. In the glycosylation profile of immunoglobulin G an increase of agalactosylated glycan structures was shown in male population, while an increase of digalactosylated and sialylated glycan structures was shown in the female population.

The obtained results confirm previous literature findings, with this experiment showing detailed, mostly gender-based differences in N-glycome of total plasma proteins and IgG of young healthy people.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Spolno uvjetovane razlike N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G u populaciji mladih zdravih ispitanika

Tea Sinožić

SAŽETAK

Glikozilacija je jedna od najčešćih i najkompleksnijih posttranslacijskih modifikacija proteina u eukariotskim stanicama ključna za sve oblike višestaničnog života. Istraživanja osnovnih osobina i prirodnih varijacija N-glikozilacijskih profila ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G pokazala su da dob, spol, reproduktivni ciklus, okolišni utjecaji i životne navike doprinose varijaciji ljudskog glikoma. U određenom fiziološkom stanju N-glikozilacijski profil osobe visoko je reproducibilan, a sa starenjem ili u bolesti dolazi do promjena u glikozilacijskim procesima i posljedično do zamjetne promjene glikozilacijskog profila osobe. Promjene glikanskog profila su u snažnoj korelaciji s kronološkom dobi, a neke promjene su i spolno specifične.

U ovom radu analizirane su glikozilacijske promjene između spolova mladih zdravih ljudi. Za populaciju ljudi u dvadesetim godinama života, koji su sudjelovali u istraživanju, pretpostavilo se da nije još došlo do razvoja kroničnih promjena koje se javljaju sa starenjem i koje bi dovele do promjene u glikanskom profilu ispitanika. Stoga bi statistički značajne razlike u glikanima zapažene u ovom diplomskom radu trebale uglavnom biti rezultat razlika između spolova.

U istraživanju su korišteni uzorci plazme 88 mladih zdravih ispitanika u dobi između 20 i 33 godine. HILIC-UPLC metodom analizirani su N-glikanski profili ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G. Dobiveni podaci su statistički uspoređeni pomoću Mann-Whitneyevog testa za nezavisne uzorke.

Statistički značajne razlike između spolova primijećene su u glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a, s izraženijim razlikama u glikozilacijskom profilu IgG-a. Najznačajnije razlike u glikanskom profilu ukupnih plazmatskih proteina uključuju povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura, struktura s antenarno vezanom fukozom i visoko razgranatih glikanskih struktura kod muške populacije i povećan udio digalaktoziliranih i monosijaliniziranih struktura kod ženske populacije. U glikanskom profilu imunoglobulina G uočen je povećan udio agalaktoziliranih glikanskih struktura u korist muške populacije i povećan udio digalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura u korist ženske populacije.

Dobivenim rezultatima potvrđena su dosadašnja zapažanja u literaturi, a detaljno su pokazane većinski spolno uvjetovane razlike N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kod mladih zdravih ljudi.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 12 grafičkih prikaza, 16 tablica i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: glikozilacija, plazma, imunoglobulin G, HILIC-UPLC, spol

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

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

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

Dr. sc. Miranda Sertić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2020.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Gender-based differences of N-glycome of total plasma proteins and immunoglobulin G in a cohort of young healthy people

Tea Sinožić

SUMMARY

Glycosylation is one of the most common and complex posttranslational modifications of proteins in eukaryotic cells and is essential for all forms of multicellular life. Studies on basic characteristics and natural variations of N-glycosylation profiles of total plasma proteins and immunoglobulin G have shown that age, sex, reproductive cycle, environmental influences and lifestyle habits contribute to the variation of human glycome. In a given physiological state, the N-glycosylation profile is highly reproducible, however, due to aging or disease, the glycosylation processes are altered and consequently noticeable changes occur in the glycosylation profile. Changes in the glycosylation profile are in a strong correlation with chronological age and some changes also show sex dependence.

This master thesis analysed glycosylation changes based on gender differences in a cohort of young healthy people. Since the majority of comorbidities and chronic health changes, which consequently influence glycans, usually start developing in thirties and/or forties and gradually worsen with age, we made the assumption that participants of this experiment (young healthy people in their twenties) have not yet developed mentioned health issues. Therefore, the glycan changes noticed in this experiment would mostly result from gender differences.

Plasma samples of 88 young healthy attendees, aged between 20 and 33 years were used in the study. Using HILIC-UPLC method, N-glycan profiles of total plasma proteins and immunoglobulin G were analyzed. Obtained data was statistically analyzed according to gender using the Mann-Whitney test for independent samples.

Statistically significant differences were found in glycosylation profiles of total plasma proteins and IgG, with more pronounced differences occurring in the IgG glycosylation profile. The most significant differences found in the glycosylation profile of total plasma proteins include an increase of agalactosylated glycan structures, structures containing antennary fucose and highly branched glycan structures in males and an increase of digalactosylated and monosialylated glycan structures in females. In the glycosylation profile of immunoglobulin G an increase of agalactosylated glycan structures was shown in male population, while an increase of digalactosylated and sialylated glycan structures was shown in the female population.

The obtained results confirm previous literature findings, with this experiment showing detailed, mostly gender-based differences in N-glycome of total plasma proteins and IgG of young healthy people.

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

Thesis includes: 49 pages, 12 figures, 16 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: glycosylation, plasma, immunoglobulin G, HILIC-UPLC, gender

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

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

Toma Keser, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Miranda Sertić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2020.