

# Optimizacija visokoprotodne metode za analizu N-glikozilacije alfa-1 kiselog glikoproteina

---

Ukalović, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

*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:163:385345>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Maja Ukalović**

**Optimizacija visokoprotodne metode za analizu  
N-glikozilacije alfa-1 kiselog glikoproteina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

*Zahvaljujem mentoru dr. sc. Tomi Keseru na ukazanoj prilici, iznimnom strpljenju, razumijevanju i pruženoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem obitelji na podršci i svim pitanjima koja nisu postavili.*

*Hvala prijateljima i kolegama s kojima sam dijelila muke i provela divne studentske dane.*

*Hvala Lovri na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci.*

*Na kraju, posebno zahvaljujem Nini, Marinu i Marici bez kojih bi ovaj studij trajao nepodnošljivo dugo.*

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Glikozilacija.....	1
1.1.2. Uloge u organizmu.....	2
1.2. Struktura i sinteza.....	2
1.2.1. N-vezani glikani.....	3
1.2.2. O-glikani.....	6
1.3. Glikani kao biomarkeri.....	6
1.3.1. Visokoprotodne metode.....	7
1.4. Alfa-1 kiseli glikoprotein.....	9
1.4.1. Biološke uloge.....	9
1.4.2. Struktura i genske varijante.....	9
1.4.2. Glikozilacija AGP-a kao potencijalni biomarker.....	10
1.5. LC-ESI-MS.....	10
2. Obrazloženje teme.....	13
3. Materijali i metode.....	14
3.1. Uzorci.....	14
3.2. Materijali.....	14
3.3. Oprema.....	17
3.4. Metode.....	18
3.4.1. Obogaćivanje precipitacijom.....	18
3.4.2. Redukcija, alkilacija i tripsinizacija.....	18
3.4.3. HILIC-SPE obogaćivanje glikopeptida.....	19
3.4.4. RP-LC-ESI-MS.....	19
3.4.5. Obrada podataka.....	20
4. Rezultati i rasprava.....	20
5. Zaključak.....	31
6. Literatura.....	33
7. Sažetak / Summary.....	35
8. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card.....	

## 1.Uvod

### 1.1. Glikozilacija

Ugljikohidrati su jedna od glavnih skupina biološki važnih makromolekula koje se mogu naći u svim oblicima života. (Lauc i sur., 2014). Kompleksni oligosaharidi (glikani) kovalentno se vežu za proteine i lipide enzimski posredovanim kotranslacijskim i posttranslacijskim procesom modifikacije koji nazivamo glikozilacija. (Lauc i sur., 2014; Varki i sur., 2015). Glikozilacija je ujedno i jedna od najraznovrsnijih posttranslacijskih modifikacija jer se teoretski svaki monosaharid može vezati  $\alpha$ - ili  $\beta$ - vezom na jedan od nekoliko mogućih položaja za drugi monosaharid u lancu ili neku drugu vrstu molekule. Veliki broj različitih glikana nastaje povezivanjem monosaharidnih jedinica koje variraju u broju, redoslijedu i vrsti. Monosaharidi koji najčešće grade životinjske glikane su fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glc), manoza (Man), N-acetilglukozamin (GlcNAc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), sijalinska kiselina (Sia) i ksiloza (Xyl). (Hart i Copeland, 2010; Lauc i sur., 2014; Varki i sur., 2015) Glikom opisuje cjelokupni repertoar glikokonjugata sastavljen od ugljikohidratnih lanaca ili glikana koji su kovalentno povezani s molekulama lipida ili proteina. (Reily i sur., 2019) te je mnogo kompleksniji od proteoma ili genoma. Glikokonjugate možemo razlikovati prema aglikonu (neugljikohidratnom dijelu) te osim glikoproteina koji na peptidnoj okosnici imaju N- ili O- vezane glikane razlikujemo i proteoglikane koji na sržni protein imaju vezan jedan ili više glikozaminoglikana. Glikani u glikozilfosfatidilinozitonim (GPI) sidrima povezuju fosfatidilinozitol i fosfoetanolamin koji je amidnom vezom vezan na karboksilni kraj proteina. Glikosfingolipidi, najzastupljeniji glikolipidi, imaju glikan vezan na C1 hidroksilnu skupinu ceramida te ih najčešće nalazimo u lipidnom dvosloju staničnih membrana. Isti glikan može imati različite funkcije ovisno o tome na koji aglikon je vezan. (Reily i sur., 2019; Varki i sur., 2015).

Za razliku od proteina, glikanske strukture nisu izravno kodirane genomom, već nastaju kao sekundarni genski produkti enzimskim djelovanjem. Uz veliku strukturnu raznolikost, kompleksnosti doprinosi i mikroheterogenost, dinamičke promjene koje se javljaju tijekom razvoja, diferencijacije, metaboličkih promjena, starenja, malignih promjena, upale ili infekcije (Hart i Copeland, 2010) Čak i male varijacije u uvjetima okoliša mogu rezultirati značajnim promjenama u funkcijama glikana koje stvara određena stanica. Promjenjiva i dinamična

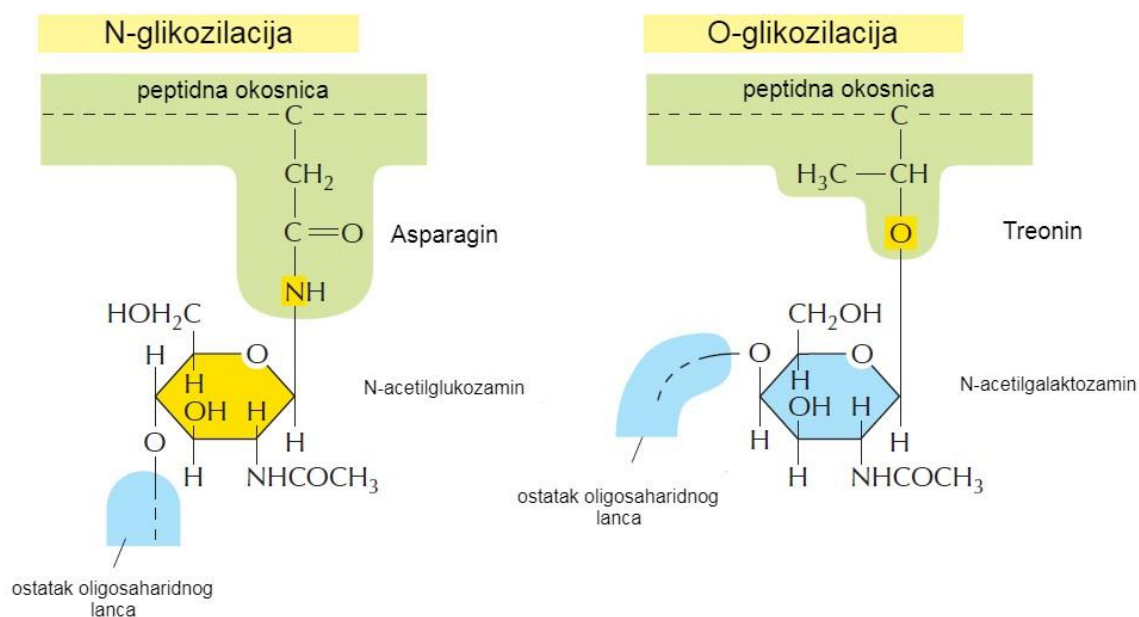
priroda glikozilacije čini glikane značajnim u stvaranju i moduliranju biološke raznolikosti i složenosti organizma. (Varki i sur., 2015)

### **1.1.2. Uloge u organizmu**

Glikozilacija ima ključnu ulogu u mnogim fiziološkim i patofiziološkim staničnim funkcijama, a urođeni poremećaji glikozilacije pružili su uvid u osnovne mehanizme djelovanja i uloge pojedinih glikokonjugata. Interakcije između imunskih stanica i stanična aktivacija regulirane su membranski vezanim glikokonjugatima i njihovim specifičnim receptorima, a antigene krvnih grupa na eritrocitima čine upravo glikanima konjugirani proteini i lipidi. U karcinomima su prisutni onkofetalni antigeni čiji glikani mogu inhibirati apoptozu, utjecati na metastaziranje karcinoma i uzrokovati rezistenciju na kemoterapiju. (Reily i sur., 2019) Raznolike funkcije glikana mogu se jednostavno podijeliti u dvije osnovne kategorije: (1) strukturne i modulatorne funkcije te (2) prepoznavanje od strane glikan vezujućih proteina. (Varki i sur., 2015) Širok raspon glikanskih modifikacija povećava njihovu raznovrsnost u prirodi i često služi za posredovanje raznim biološkim funkcijama. Ugljikohidratni dijelovi glikoproteina imaju važnu ulogu u smatanju proteina u endoplazmatskom retikulu, usmjeravanju proteina u odgovarajuće stanične odjeljke te kao mjesta prepoznavanja u međustaničnim interakcijama jer su površine svih eukariotskih stanica prekrivene debelim slojem kompleksa glikana vezanih na proteine ili lipide kojeg nazivamo glikokaliks. (Cooper i Hausman, 2004; Varki i sur., 2015). Glikani također sudjeluju u interakcijama među organizmima odnosno parazitima, patogenima i simbiotima. (Varki i sur., 2015)

### **1.2. Struktura i sinteza glikoproteina**

S obzirom na mjesto vezanja ugljikohidratnog bočnog lanca razlikujemo N-vezane i O-vezane glikoproteine. Kod N-vezanih glikoproteina ugljikohidratni lanac se veže putem N-acetilglukozamina (GlcNAc) na dušikov atom bočnog ogranka asparagina. O-vezani glikoproteini imaju ugljikohidratni lanac vezan preko N-acetilgalaktozamina (GalNAc) koji je vezan na kisikov atom bočnog ogranka serina (Ser) ili treonina (Thr) (Cooper i Hausman, 2004)

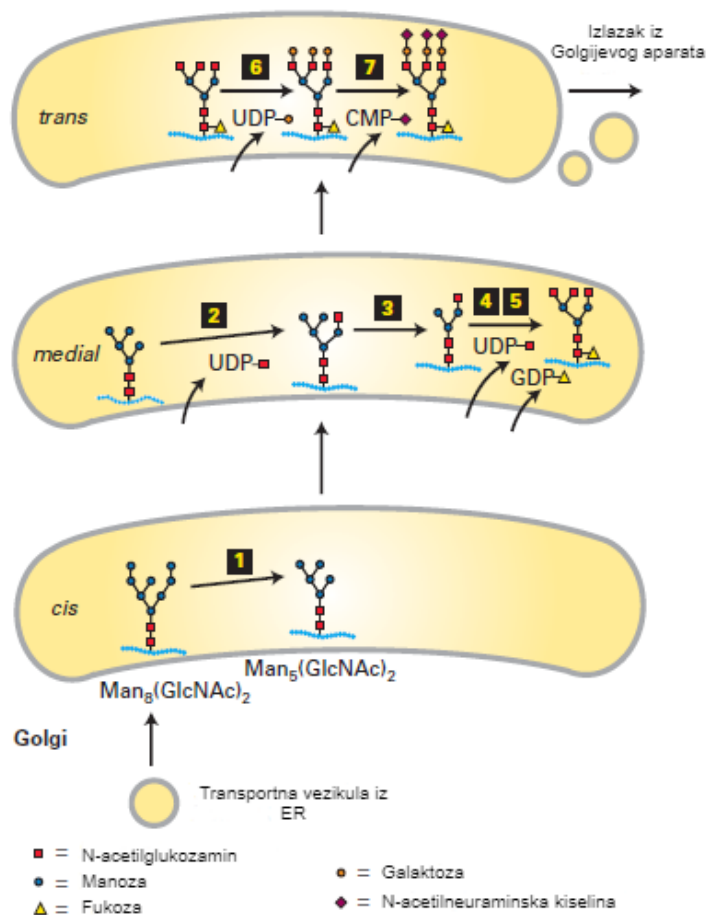


Slika 1. Prikaz N i O vezanih glikana i pripadajućih glikozidnih veza (preuzeto i prilagođeno iz (Alberts, 2017))

### 1.2.1.N-vezani glikani

Biosinteza N-glikana odvija se u endoplazmatskom retikulu (ER) i Golgijevom aparatu (GA). Prva faza je visoko konzervirana te se odvija kotranslacijski i posttranslacijski na luminalnoj strani endoplazmatskog retikula gdje se pomoću dolikol fosfatnog nosača oligosaharidni prekursor prenosi na supstrat, odnosno protein. (Varki i sur., 2015) Oligosaharid je vezan na dolikol (poliizoprenoidni lipid) visoko energetskom pirofosfatnom vezom koja osigurava energiju aktivacije potrebnu za glikozilaciju. (Alberts, 2017) Oligosaharidni prekursor sastavljen je od četrnaest saharidnih jedinica: tri glukoze, devet manoza i dva N-acetilglukoamina ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ ), a prenosi se pomoću oligosaharil transferaze isključivo na asparagin (Asn) tripeptidnog slijeda Asn-X-Thr/Ser u kojem je „X“ bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro). (Lodish i sur., 2016) Prijenos glikana ne događa se na svakom navedenom slijedu (Asn-X-Ser/Thr) zbog utjecaja konformacijskih promjena, drugih ograničenja tijekom smatanja glikoproteina, svojstva aminokiseline „X“ i ostalih faktora koji mogu utjecati na vezanje enzima. (Varki i sur., 2015) Iz tog razloga nije moguće točno predvidjeti obrazac glikozilacije potencijalnih glikozilacijskih mjesta isključivo na temelju aminokiselinskog slijeda. (Lodish i sur., 2016) Druga faza započinje daljnjom doradom N-

glikana glikozidazama i glikoziltransferazama u ER-u, a nastavlja se u GA-u kao što je prikazano na Slici 2. Specifične transferaze dodaju jedan po jedan šećerni ostatak na oligosaharid pomoću nukleotidnih prekursora iz citosola.



Slika 2. Primjer modifikacije N-vezanih oligosaharidnih lanaca glikoproteina u Golgijevom aparatu (preuzeto i prilagođeno iz (Lodish i sur., 2016))

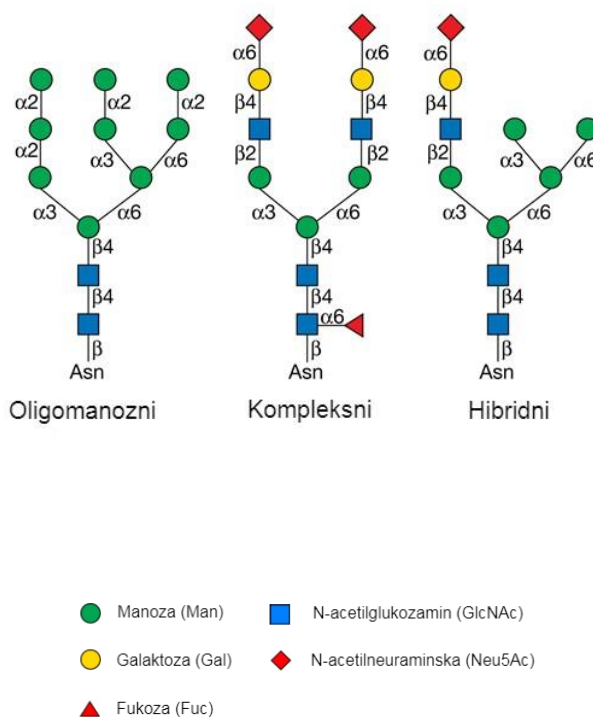
Golgijevi odjeljci međusobno se razlikuju prema enzimima koje sadrže. Lanci ugljikohidrata na glikoproteinima slijedom prolaze kroz odjeljke te produkti nastali u trenutnom odjeljku postaju supstrati za enzime u sljedećem. Nakon transporta iz ER i uklanjanja triju manozu u cis-golgiju (1.korak) protein prelazi u medijalni Golgi gdje se dodaju tri N-acetilglukozamina (2. i 4. korak) uklanjaju se dvije manoze (3. korak) i dodaje jedna fukoza (5. korak). Dorađivanje završava u trans Golgiju dodatkom tri galaktozna ostatka (6. korak) i krajnjim vezanjem N-acetilneuraminske kiseline na svaki galaktozni ostatak (7. korak). (Lodish i sur., 2016)

Modifikacije oligosaharida karakteristične su za pojedinu vrstu, stanicu, protein i



glikozilacijsko mjesto na proteinu, ali osnova od pet od četrnaest šećernih ostataka (originalnog prekursora) očuvana je na svim strukturama membranskih i sekretornih N vezanih oligosaharida. (Lodish i sur., 2016; Varki i sur., 2015) Glikoproteini imaju širok spektar različitih N-glikana, a heterogenost u N-glikanskoj komponenti prisutna je zbog razlika u konformaciji proteina, lokalizaciji glikozil transferaza u pojedinim odjeljcima GA, dostupnosti supstrata glikozidaza, metabolizmu nukleotidnih šećera, brzini transporta glikoproteina kroz lumen ER i blizini tripeptida u odnosu na transmembransku domenu. (Varki i sur., 2015).

### Osnovni tipovi N-glikana



Slika 3. Osnovni tipovi N-glikana (preuzeto i prilagođeno iz (Varki i sur., 2015))

U eukariotskim stanicama postoje tri osnovna tipa N-glikana koji sadrže zajedničku jezgru  $\text{ManGlcNAcAsn}$  ( $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ ): oligomanozni, kompleksni i hibridni tip. Oligomanozni tip na jezgri ima vezane samo manozne jedinice, kompleksni tip sadrži do šest ogranka koji su na jezgru vezani pomoću GlcNAc, dok je hibridni tip kombinacija prethodna dva i sadrži manozne ostatke na  $\text{Man}\alpha 1-6$  ogranku i jedan ili dva GlcNAc na  $\text{Man}\alpha 1-3$  ogranku jezgre. (Varki i sur., 2015)

### 1.2.2. O-glikani

Druga vrsta glikana vezana je preko GalNAc O-glikozidnom vezom na kisik hidroksilne skupine Ser ili Thr. Za razliku od N glikozilacije, O-glikozilacija ne zahtijeva prekursor vezan na lipidni nosač niti reakcije koje uključuju glikozidaze, već su u biosintezi uključeni nukleotidni šećeri koji se iz citoplazme transportiraju u GA. Prvi i ključni korak O-glikozilacije je dodavanje UDP-GalNAc na hidroksilnu skupinu Ser ili Thr na proteinu pomoću GalNAc transferaze koja se nalazi u hrapavom ER ili cis golgijevoj mreži. (Lodish i sur., 2000; Varki i sur., 2015) Nakon što je protein prešao u trans-Golgijske vezikule na GalNAc se dodaje galaktoza pomoću specifične trans-Golgi galaktoziltransferaze. U stanicama kralježnjaka tipično O-vezani oligosaharid završen je dodatkom dvije negativno nabijene sijalinske kiseline (N-acetilneuraminska kiseline) (Lodish i sur., 2000). Svi šećerni nukleotidi koji sudjeluju u O-glikozilaciji sintetizirani su u citosolu iz nukleozid trifosfata i šećernih fosfata te se prenose specifičnim antiportnim proteinima kroz membranu ER-a i GA u njihov lumen, dok dolazi do eksporta slobodnih nukleotida iz lumena (UMP, CMP i GMP). Izmjena u kojoj se ulaskom jednog nukleotidnog šećera u citosol vraća jedan slobodni nukleotid održava se konstanta koncentracija šećernih nukleotida potrebnih za sintezu oligosaharida. (Lodish i sur., 2000) Spektar novosintetiziranih O-glikana ovisi o subcelularnoj lokalizaciji, aktivnosti i specifičnosti glikozil transferaza uključenih u njihovu sintezu (Lodish i sur., 2000; Varki i sur., 2015) Duljina O-glikana varira od samo jednog GalNAc pa i do više od dvadeset šećernih ostataka te osim GalNAc sadrže i Gal, GlcNAc, Fuc i Sia. Mucini su vrsta glikoproteina koja sadrži najveći broj O-GalNAc glikana vezanih na polipeptidnu okosnicu, nalaze na površini epitela gastrointestinalnog, reproduktivnog i respiratornog trakta u kojem štite epitelne stanice od infekcije, fizičkih i kemijskih oštećenja. Gusta O-glikozilacija mucina pruža gotovo potpunu zaštitu od degradacije proteazama, a zbog hidrofilnosti i negativnog naboja O-glikana omogućuju vezanje vode i soli čime pridonose viskoznosti i adhezivnosti mukusa. (Varki i sur., 2015)

### 1.3. Glikani kao biomarkeri

Glikomske promjene nisu prisutne isključivo u pojedinim stanjima, već su obilježje gotovo svake ljudske bolesti. (Shipman i sur., 2020) Glikani imaju posebno velik potencijal kao

biomarkeri jer se sintetiziraju pod zajedničkim djelovanjem različitih proteina, čimbenika bolesti poput genskih varijacija i epigenetskih promjena čime pružaju uvid u cjelokupno stanje organizma. (Shipman i sur., 2020; Shubhakar i sur., 2015) Glikanski profil sekretornih proteina često daje informacije o patofiziološkom statusu stanica koje ih izlučuju, što analizu glikozilacije čini prikladnim dijagnostičkim alatom. Karakteristične promjene glikoma povezane su s raznim bolestima poput karcinoma, neurodegenerativnih i upalnih bolesti. Upravo iz tog razloga povećao se interes za proučavanje promjena glikanskog profila kao biomarkera bolesti, za stratifikaciju pacijenata i personaliziranu medicinu, ali i za korištenje glikomike u cjelogenomskim analizama povezanosti (GWAS engl. *genome wide association studies*). Različiti perspektivni glikomski biomarkeri opisani su za dijabetes MODY tipa (engl. *Maturity Onset Diabetes of the Young*) i imunoglobulina G multiplog mijeloma. Dva glikanska biomarkera koja se rutinski koriste u kliničkoj dijagnostici su ugljikohidratom deficijentan transferin (CDT, engl. *carbohydrate deficient transferrin*) za detekciju alkoholizma i fukozilirani serumski alfa-fetoprotein za ranu dijagnostiku hepatocelularnog karcinoma. Unatoč povećanom interesu za ovo područje postoje značajni izazovi u provođenju studija na velikom broju uzoraka. (Shubhakar i sur., 2015) Iako većina metoda analize glikoma može detektirati značajne promjene u glikozilaciji, nisu prikladne za široku primjenu u kliničkim laboratorijima zbog kompleksnosti pripreme uzorka, visoke cijene i niske protočnosti. (Shipman i sur., 2020)

### 1.3.1 Visokoprotočne metode

Glavni cilj visokoprotočnih ( engl. *high-throughput*) metoda je analizirati veliki broj uzoraka na ekonomičan način u relativno kratkom vremenu. Kako bi visokoprotočna analiza generirala visokokvalitetne glikomske podatke potrebna je metoda koja omogućava reproducibilnu i robusnu pripremu uzoraka te točnu identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih glikanskih struktura. (Lauc i Wuhner, 2017; Shubhakar i sur., 2015). Kompleksnosti strukturalne analize glikana doprinosi veliki broj složenih glikoziliranih proteina s višestrukim glikozilacijskim mjestima, heterogenost glikana vezanih na pojedino glikozilacijsko mjesto, ali i strukturalna kompleksnost glikana (koja proizlazi iz različitog sastava monosaharida, anomera, veznih podjedinica, razgranatosti i vezanju na peptidni dio glikoproteina) (Keser, 2016).

Tri glavne tehnike koje se koriste u analizi glikana: tekućinska kromatografija (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography* ili UPLC, *Ultra-Performance Liquid Chromatography*), masena spektrometrija i kapilarna elektroforeza. U većini slučajeva UPLC i kapilarna elektroforeza omogućavaju relativno pouzdanu kvantifikaciju ali separacija glikana je rijetko potpuna i svaki pik obično sadrži mješavinu signala koje potječu od različitih glikana. Jedna od glavnih poteškoća proteomike i glikomike prilikom istraživanja na većim populacijama je pročišćavanje proteina iz velikog broja uzoraka. Najšire korištena tehnika za tu svrhu je afinitetna kromatografija koja koristi imobilizirane afinitetne ligande. Kako bi se analizirala glikozilacija proteina često je potrebno ukloniti glikane pomoću deglikozilacijskih enzima. Najčešće korišteni enzim je peptidna-N-glikozidaza F koja oslobađa sve glikane vezane na asparagin, osim  $\alpha$ 1,3 sržnih fukoziliranih glikana koji se obično nalaze u biljkama i insektima. Ne postoji prirodni kromofor u molekulama ugljikohidrata zbog čega je razvijen niz tehnika za detekciju glikana. Oligosaharidi se za kvantifikaciju najčešće konjugiraju reduktivnom aminacijom na reducirajućem kraju s fluoroforima kao što su 2-aminobenzojeva kiselina, 2-aminobenzamid, 2-aminopiridin, 1-aminopiren-3,6,8-trisulfonska kiselina. Efikasno fluorescentno označavanje reduktivnom aminacijom zahtjeva suvišak fluorofore i drugih reagensa zbog čega je potrebno pročititi uzorak ekstrakcijom ili gel filtracijom. (Keser, 2016; Shipman i sur., 2020) Analiti se razdvoje tekućinskom kromatografijom ili kapilarnom elektroforezom nakon čega se detektiraju fluorescencijom ili masenom spektrometrijom. Tekućinska kromatografija se često koristi za analizu neutralnih i nabijenih glikana. Glikani se uglavnom razdvajaju pomoću tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (HILIC, engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), ali koriste se i druge metode poput kromatografije visokog pH s anionskim izmjenjivačem i pulsним amperometrijskim detektorom, ionsko izmjenjivačke kromatografije (WAX, engl. *weak anion exchange*) i obrnuto fazne kromatografije. Pomoću HILIC-a glikani se razdvajaju na temelju razlika u hidrofilnosti i hidrofobnosti, a veličina glikana, sastav, vrsta veze i specifičnost ogranaka doprinose krajnjem retencijskom vremenu. Jedna od glavnih prednost HILIC-a je to što omogućuje razdvajanje strukturnih izomera.

Niti jedna analitička tehnika trenutno ne može provesti detaljnu strukturnu analizu u jednom koraku, dok se kombinacijom postojećih metoda može detaljno karakterizirati glikanski profil proteina. (Keser, 2016)

## 1.4. Alfa-1 kiseli glikoprotein

### 1.4.1. Biološke uloge

Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP), koji se također naziva orozomukoid, protein je akutne faze nepoznate uloge koji se sintetizira u jetri i nekim tumorima. Rutinski se određuje nefelometrijski i imunoturbidimetrijski, a referentni interval za odrasle osobe iznosi 0,5-1,2 g/L. (Štraus i Barišić, 2009) AGP, zajedno s albuminom i lipoproteinima je jedan od najvažnijih proteina koji vežu ligande u plazmi. Trodimenzionalna struktura AGP-a sadrži beta nabrane ploče što doprinosi konformaciji pogodnoj za transport liganda zbog čega AGP u fiziološkim uvjetima može vezati više od 300 različitih molekula i lijekova. Najčešći endogeni ligandi koje veže su heparin, IgG3, čimbenik aktivacije trombocita, melatonin, histamin i steroidni hormoni. AGP također veže kisele molekule poput retinoične kiseline i fenobarbitala. Uz navedene egzogene ligande, veže i toksine, lektine i bakterijske lipopolisaharide zbog čega ima protektivnu ulogu u septičkom šoku. (Ceciliani i Pocacqua, 2007) Hepatička prekomjerna ekspresija AGP-a regulirana je putem pro-inflamatornih citokina (IL-1, IL-6), kemokinima i glukokortikoida te se tijekom upale, infekcije i karcinoma koncentracija AGP-a poveća 2-6 puta. (Ceciliani i Pocacqua, 2007; Keser i sur., 2021) Iako je koncentracija AGP-a značajno niža od koncentracije albumina, tijekom akutne faze postaje jedan od najvažnijih proteina koji vežu endogene i egzogene ligande jer je albumin negativan reaktant akutne faze. (Ceciliani i Pocacqua, 2007)

### 1.4.2. Struktura i genske varijante

Molekulska masa AGP-a iznosi 41 do 43 kDa, a ugljikohidrati čine 45% ukupne mase glikoproteina. AGP ima pet N-vezanih glikana kompleksnog tipa na polipeptidnoj okosnici (Asn-33, -56, -72, -93, -103) od kojih svaki može biti biantenarni, triantenarni ili tetraantenarni s različitim stupnjevima fukozilacije i sijalinizacije. Neki glikani mogu biti  $\alpha$ -1,3 fukozilirani te tvoriti strukture poznate kao sijalil Lewis X antigen (Neu5Ac  $\alpha$ 2,3Gal  $\beta$ 1,4(Fuc  $\alpha$ 1,3)GlcNAc-R) (Gornik i Lauc, 2008; Keser i sur., 2021). Sijalinska kiselina u obliku N-acetil neuraminske kiseline čini 10-12% ukupnih monosaharida zbog čega AGP ima nisku izoelektričnu točku (pI=2,8-3,8). (Keser i sur., 2021)

Tri gena na kromosomu 9 kodiraju humani AGP, *AGP-A* koji se u literaturi još naziva i *ORM1* te *AGP-B* i *AGP-B'* koji odgovaraju *ORM2*. *AGP-A* kodira AGP-1 dok su *AGP-B* i *AGP-B'* \*identični po strukturi i kodiraju AGP2 koji se razlikuje od AGP1 za 22 AK. AGP1 je polimorfan protein s tri blisko povezane genske varijante F1, F2 i S koje se međusobno razlikuju u manje od 5 AK (F1 sadrži slijed: Gln-38/Val-174; F2: Gln-38/Met-174 i S: Arg-38/Val-174) te ih označavamo s AGP1\*F1, AGP1\*F2, i AGP1\*S. *AGP-B* i *AGP-B'* kodiraju AGP2\*A. Većina ljudi posjeduje kombinaciju ovih varijanti te je F1+S+A je najčešći fenotip (50%), slijedi ga F1+A (35%) i S+A (15%). (Keser i sur., 2021; Taguchi i sur., 2013)

#### **1.4.2. Glikozilacija AGP-a kao potencijalni biomarker**

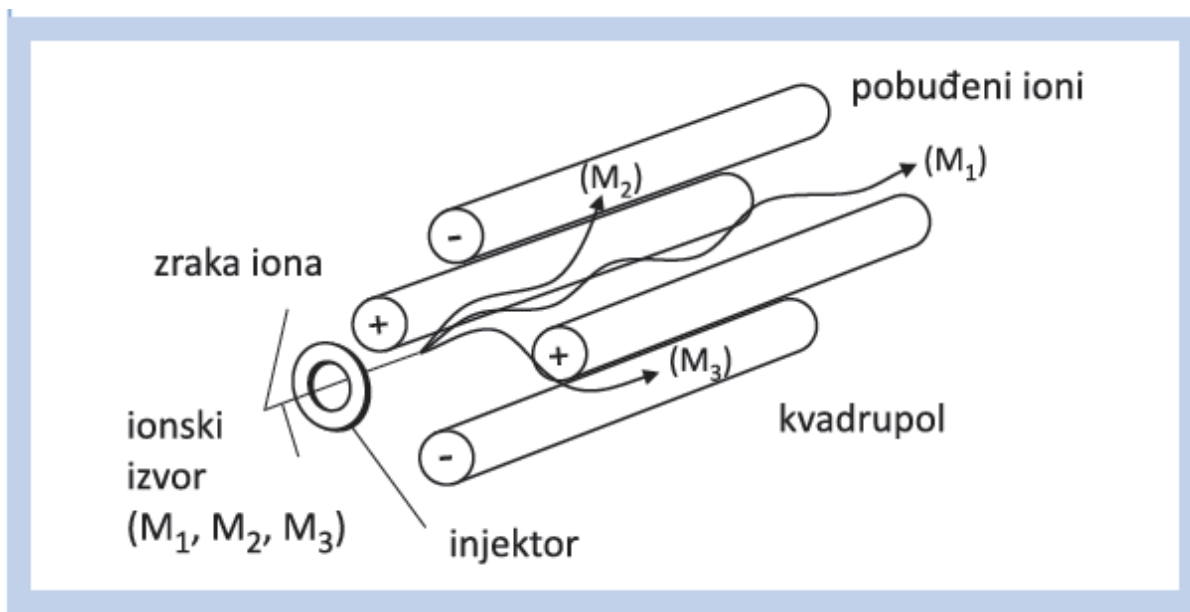
AGP je izuzetno glikoziliran serumski protein čije imunomodulatorne funkcije i funkcije vezanja molekula ovise upravo o njegovoj glikozilaciji. Jedna od zanimljivih značajki AGP-a je da tijekom upale osim povećanja koncentracije dolazi i do strukturnih promjena oligosaharida u pogledu razgranatosti i fukozilacije glikana. (Ceciliani i Pocacqua, 2007; Gornik i Lauc, 2008) Smanjena razgranatost glikana AGP-a prisutna je u akutnoj upali, dok se u kroničnoj upali razgranatost povećava. Također mnoge upalne bolesti karakterizirane su povećanom glikozilacijom ogranaka i povećanim sadržajem sijalinske kiseline. (Keser i sur., 2021) Promjene u glikozilaciji AGP-a pokazale su se specifičnim za određene upalne bolesti što nije karakteristično za druge serumskim proteine. Iz tog razloga AGP je dobar model za analizu glikozilacije te uz IgG vjerojatno najviše proučavani glikoprotein u različitim bolestima. Do promjena u glikozilaciji AGP-a dolazi u širokom spektru patofizioloških stanja kao što su teški reumatoidni artritis, ciroza jetre, hepatitis, astma, diabetes mellitus tipa II i karcinom. (Gornik i Lauc, 2008; Keser i sur., 2021)

#### **1.5. LC-ESI-MS**

Masena spektrometrija (MS) je analitička metoda u kojoj nakon ionizacije uzorka dolazi do raspodjele analita na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Svaki maseni spektrometar sadrži: ulaz za uzorak, izvor ionizacije, maseni analizator, detektor te sustav za obradu podataka pomoću kojeg se dobiva maseni spektar. (Hoffmann i Stroobant, 2007; Skoog i sur., 2014). Masena spektrometrija metoda je odabira za osjetljivu i sveobuhvatnu analizu proteina i

glikoproteina, a u kombinaciji s LC-om omogućuje se prethodno kromatografsko odvajanje glikopeptida. (Kolarich i sur., 2012) Odabirom odgovarajuće metode tekućinske kromatografije koja ne šteti analizi masenim spektrometrom (hlapljivi puferi, stabilan i nizak protok, upotreba polarnih organskih otapala), tekućinski kromatograf može se jednostavno spregnuti s masenim spektrometrom. Odabir izvora iona, analizatora, kombinacije više analizatora (tandemska masena spektrometrija, MS-MS) i detektora ovisi o vrsti analize i kompleksnosti uzorka.

Maseni analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja, a razlikujemo ih prema različitim principima razdvajanja te sukladno tome zahtijevaju drugačije izvore iona i detektore. Kvadrupol je jedan od najčešće korištenih analizatora, sastoji se od četiri elektrode koje su dijagonalno električno povezane pri čemu jedan par ima pozitivan, a drugi negativan polaritet. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti  $m/z$  i u ovisnosti o primijenjenoj struji i električnom polju, a mogu zadržati stabilnu putanju i proći maseni analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule.



Slika 4. Presjek kvadrupola, preuzeto iz (Cindrić i sur., 2009)

Princip rada analizatora vremena leta (TOF, *engl. Time of flight*) temelji se na činjenici da brzina gibanja iona ovisi o masi iona. Svi ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi; manji imaju ioni veću brzinu, veći ioni imaju manju brzinu, a jednaku kinetičku energiju. Separacija iona provodi se s obzirom na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima. Ioni mogu ući aksijalno ili ortogonalno u analizator, koji ih

sakuplja u određenom vremenu, te zatim istovremeno otpušta, a u trenutku otpuštanja uključuje se mjerenje vremena leta do detektora. Analizatori TOF često se hibridiziraju s kvadrupolnim analizatorima, što im daje mogućnost analize MS-MS. (Cindrić i sur., 2009; Hoffmann i Stroobant, 2007). Postoje i druge vrste analizatora kao što su ion ciklotronska spektrometrija masa (FT-ICR-MS, *engl. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*), ionska klopka, sektorski analizatori s magnetnim i električnim poljem. Kako bi se olakšalo određivanje strukture ili kvantitativna analiza, razvijene su različite programske aplikacije i pretraživači baza podataka.

Tekućinski kromatograf i maseni spektrometar su povezani međuspojem koji ima višestruke uloge: otparavanje tekućine, ionizaciju neutralnih molekula i uvođenje analita u ionizator. Niz tehnika ionizacije se koristi u masenoj spektrometriji, a odabir tehnike ovisi o fizikalno kemijskim svojstvima analita i unutarnjoj prenesenoj energiji ionizacijskog procesa. Neke tehnike ionizacije uzrokuju ekstenzivnu fragmentaciju, dok su druge „meke“ i stvaraju samo ione s parnim brojem elektrona najčešće dodavanjem ili oduzimanjem protona.

Više vrsta ionizacije se može koristiti u LC-MS-u, jedna od njih je elektrosprej ionizacija (ESI). ESI je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u spregnutom sustavu LC-MS koji je kompatibilan sa svim analizatorima. Ionizacija (pozitivna ili negativna) i raspršivanje se događaju pri atmosferskom tlaku, a optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C i događa se u struji dušika. U procesu ionizacije mobilna faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru, koja je ujedno i elektroda pod visokim naponom (2-5 kV). Na vršku igle se formira maglica kapljica otapala i uparenog otapala dok kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice te im pruža dodatno ubrzanje. Otparavanjem otapala pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala (ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu), dolazi do smanjenja kapljica. Nakon što se dovoljno smanje, odnosno kada se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile elektrostatskog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine te se kapljice otparavaju ili razbiju na manje kapljice, a analit se kristalizira ili prelazi u plinovitu fazu. Osim ESI postoje i druge metode ionizacije kao što su kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku, elektron ionizacija (EI, *Electron Ionization*), ionizacija kontinuiranim brzim atomskim bombardiranjem analita (CFFAB, *engl. Continuous Flow Fast Atom Bombardment*), matriksom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI,



engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) i druge. (Cindrić i sur., 2009; Hoffmann i Stroobant, 2007)

## 2. Obrazloženje teme

AGP je izrazito glikozilirani serumski protein kod kojeg su promjene u glikozilaciji prisutne u raznim fiziološkim i patofiziološkim stanjima te je uz IgG najproučavaniji model za specifične promjene glikozilacije proteina. Nedavno je razvijena nova ekonomski isplativa visokoprotlačna metoda koja omogućuje precizno i sveobuhvatno određivanje N-glikanskog profila AGP-a iz malog volumena krvnog seruma ili plazme. AGP se obogaćuje iz uzorka precipitacijom seromukoidne frakcije nakon koje slijedi redukcija, alkilacija i tripsinizacija te daljnje obogaćivanje glikopeptida pomoću HILIC-SPE. Dobiveni glikopeptidi analiziraju se obrnuto faznom kromatografijom na nano UPLC uređaju koji je spregnut s elektrosprej ionizatorom i qTOF masenim spektrometrom čime se dobiva detaljni uvid u glikanski profil svakog N-glikozilacijskog mjesta AGP-a. Upotrebom ove metode pokazalo se da je N-glikanski profil AGP-a stabilan kod zdravih pojedinaca te bi promjene u N-glikozilaciji mogle poslužiti kao potencijalni novi biomarker u prepoznavanju osoba s povećanim rizikom za razvoj diabetes mellitusa tipa II. (Keser i sur., 2021) Prilikom korištenja navedene metode na većem broju uzoraka primijećen je smanjen intenzitet signala glikozilacijskog mjesta III u određenom broju mjerenja. Kako bi se utvrdio potencijalan uzrok ovog odstupanja ispitan je utjecaj dva parametara: koncentracije tripsina i udjela ACN-a u koraku obogaćivanja HILIC-SPE-om. Velike glikanske strukture s većim brojem šećernih podjedinica na glikoproteinima sterički ometaju proteaznu aktivnost enzima zbog čega tripsin nije u mogućnosti pokidati peptid na mjestu cijepanja blizu glikoziliranog asparagina. AGP kao glikoprotein s visokim udjelom ugljikohidrata (45%) sadrži N-vezane glikane kompleksnog tipa što ga čini rezistentnim na tripsinizaciju. U svrhu povećanja učinkovitosti digestije prije tripsinizacije koriste se denaturirajući agensi poput surfaktanta koji poboljšavaju razmatanje i topljivost proteina, (Imre i sur., 2005) no postoji mogućnost da ovaj korak u pripremi uzorka nije dovoljan za potpuno cijepanje proteina. Kako bi se utvrdio utjecaj koncentracije tripsina na intenzitet glikozilacijskog mjesta III, uz standardnu metodu (0,4 µg/µL tripsina) korištene su još tri različite koncentracije tripsina (0,08 µg/µL, 2,0 µg/µL, 4,0 µg/µL).

U procesu obogaćivanja pomoću HILIC-SPE glikopeptidi se odvajaju od neglikoziliranih peptida na temelju hidrofilnih svojstava uvjetovanih njihovim glikanskim dijelom. Moguće je da glikopeptidi glikozilacijskog mjesta III zbog najvećeg udjela hidrofobne peptidne sekvence prilikom obogaćivanja HILIC-SPE-om ne stupaju u dovoljno jake hidrofilne interakcije sa stacionarnom fazom, što rezultira njihovom manjom retencijom i smanjenim intenzitetom signala u kasnijoj analizi. Kako bi se ispitalo hoće li povećani udio organskog otapala u mobilnoj fazi povećati afinitet glikanskog dijela glikopeptida prema polarnoj stacionarnoj fazi, što bi rezultiralo povećanim intenzitetom signala nakon analize, uz standardni postupak obogaćivanja s mobilnom fazom sastava 90% ACN-a ispitan je i intenzitet prilikom korištenja mobilne faze sastava 95% ACN-a.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Uzorci

Korišteni su uzorci pomiješane krvne plazme dobivene od velikog broja ispitanika iz prijašnje populacijske studije.

#### 3.2. Materijali

Tablica 1. Anorganske kemikalije.

Kemikalija	Proizvođač
70% Perklorna kiselina	Merck
Fosfotungistična kiselina	Sigma-Aldrich
35% Klorovodična kiselina (HCl)	VWR International
10M Natrijev hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich
2M Amonijev bikarbonat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	Acros Organics

Tablica 2. Organske kemikalije.

Kemikalija	Proizvođač
Acetonitril (ACN)	VWR International

Chromabond® HILIC kuglice	Macherey-Nagel
Ditiotrietol (DTT)	Sigma-Aldrich
Jodoacetamid	Sigma-Aldrich
50mM Octena kiselina	Promega
1,5% RapiGest SF surfaktant	Waters
0,1% Trifluorooctena kiselina (TFA)	Sigma-Aldrich

Tablica 3. Enzimi

Enzim	Proizvođač
TPCK-tretirani tripsin	Promega

Tablica 4. Pripremljene otopine i suspenzije.

Otopine i suspenzije	Priprema
0,75M Perklorna kiselina	Za 10mL otopine: potrebno je dodati 647 $\mu$ L 70% perklorne kiseline i ostatak (9353 $\mu$ L) vode
2% Fosfotungistična kiselina u 2N HCl	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 0,02g fosfotungistične kiseline, 177 $\mu$ L 35% HCl-a i ostatak (823 $\mu$ L) vode
1M HCl	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 88 $\mu$ L 35% HCl-a i ostatak (912 $\mu$ L) vode
0,1N NaOH	Za 10mL otopine: potrebno je dodati 100 $\mu$ L 10N NaOH i ostatak (9900 $\mu$ L) vode
30mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 15 $\mu$ L 2M NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> i ostatak (985 $\mu$ L) vode

15% RapiGest u 30mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Za ~ 0.670 mL otopine: potrebno je dodati 657µL 30mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> u 10µg RapiGest-a koji se nalazi u originalnoj bočici
200mM DTT	Za 0,5mL otopine: potrebno je dodati 0,0154g DTT-a u 0,5mL vode
60mM DTT	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 300µL 200mM DTT-a i ostatak (700µL) vode
160mM Jodoacetamid	Za 1mL otopine: potrebno je dodati 0,0296g jodoacetamida u 1mL vode
4,0 µg/µL Otopina tripsina	Za 0.25mL otopine: 1mg tripsina otopi se u 0.25mL 50mM octene kiseline
2,0 µg/µL Otopina tripsina	Za 0,2 mL otpine: u 100 µL otopine koncentracije 4,0 µg/µL dodaje se 100 µL vode
0,4 µg/µL Otopina tripsina	Za 1mL otopine: u 100 µL 4,0 µg/µL otopine tripsina dodaje se 900 µL vode
0,08 µg/µL Otopina tripsina	Za 0,5 mL otpine: u 100 µL otopine koncentracije 0,4 µg/µL dodaje se 400 µL vode
0,1% TFA	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 1ml TFA u 1000ml vode
50mg/mL Suspenzija Chromabond® HILIC kuglica u 0,1% TFA	Za 10mL suspenzije: potrebno je dodati 0,5g Chromabond® HILIC kuglica u 10mL 0,1% TFA
90% ACN	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 100ml vode u 900ml ACN-a
95% ACN	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 50ml vode u 950ml ACN-a

90% ACN + 0,1% TFA	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 100ml vode u 900ml ACN-a i 1ml TFA
95% ACN + 0,1% TFA	Za 1000ml otopine potrebno je dodati 50ml vode u 950ml ACN-a i 1ml TFA

### 3.3. Oprema

Tablica 5. Laboratorijska oprema i pribor.

Oprema i pribor	Proizvođač
PCR pločice u formatu s 96 jažica	Thermo Scientific
Jouan CT centrifuga	Thermo Scientific
Polipropilenska filter pločica s 96 jažica	Orochem
Vakuumska pumpa	Millipore Corporation
SpeedVac vakuumski koncentrat	Thermo Scientific
Vaga	Ohaus
Mikropipete	Mettler-Toledo Rainin
NanoACQUITY UPLC sustav	Waters
Compact qTOF maseni spektrometar	Bruker Daltonics
CaptiveSpray nanoBooster ionski izvor	Bruker Daltonics
Acclaim PepMap100 C8 (5 mm×300 μm i.d.) pretkolona	Thermo Fisher Scientific
Halo C18 nano-LC (150 mm×75 μm i.d.) kolonu s 2.7μm HALO česticama fuzionirane jezgre	Advanced Materials Technology

### **3.4. Metode**

#### **3.4.1. Obogaćivanje precipitacijom**

Iz dobivenih uzoraka humane plazme, AGP se obogaćuje precipitacijom seromukoidne frakcije. U PCR pločicu s 96 jažica potrebno je dodati 20 $\mu$ L uzorka plazme i 80  $\mu$ L 0,75 M perklorne kiseline čime se postiže koncentracija 0,6M perklorne kiseline. U sljedećem koraku uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 2250g pri temperaturi od 5°C. Supernatant dobiven prvotnim centrifugiranjem potrebno je prebaciti u novu PCR pločicu pomoću 3D isprintanih adaptera centrifugiranjem na 15g tijekom 30 sekundi. U idućem koraku dodaje se 1/10 ( $\approx$ 9 $\mu$ L) volumena 2% fosfotungistične kiseline u 2N HCl i ponovo centrifugira 10 minuta na 2250g pri temperaturi od 5°C. Potom se supernatant ponovno prebacuje u praznu PCR pločicu pomoću 3D adaptera centrifugiranjem na 15g tijekom 30 sekundi. U precipitatu dobivena je seromukoidna frakcija s obogaćenim AGP-om, a u posljednjem koraku potrebno je dodatkom  $\approx$ 30  $\mu$ L 0,1N NaOH precipitatu dobiti bistru otopinu.

#### **3.4.2. Redukcija, alkilacija i tripsinizacija**

Solubiliziranom precipitatu potrebno je dodati 2,5  $\mu$ L otopine 1,5% RapiGest SF surfaktanta nakon čega se stavlja na inkubaciju u peć na 5 minuta pri 60°C. U idućem koraku potrebno je dodati 5 $\mu$ L 60mM ditionitriola (DTT), koji služi kao reducirajuće sredstvo uzorcima koji su prethodno ohlađeni na sobnu temperaturu nakon čega se vraćaju na inkubaciju od 30 minuta pri 60°C. Nakon što se uzorci ponovo ohlade do sobne temperature potrebno je dodati 5 $\mu$ L 160mM jodoacetamida koji djeluje kao alkilirajuće sredstvo nakon čega se stavljaju na tresilicu i inkubiraju 30 minuta u mraku. Višak jodoacetamida potrebno je poništiti dodatkom 1 $\mu$ L 200mM DTT-a. Nužno je podesiti pH vrijednost prije tripsinizacije, dodavanjem 1 $\mu$ L 2M amonijeva bikarbonata. Tripsinizacija započinje dodavanjem 2  $\mu$ L TPCK-tretiranog tripsina, dodane su četiri različite koncentracije tripsina u kvadriplikatu kako bi se odredio njegov utjecaj na apsolutni intenzitet glikozilacijskog mjesta III. Korištene su sljedeće koncentracije: pet puta manja koncentracija od standardne (0,08  $\mu$ g/ $\mu$ L), standardna koncentracija (0,4  $\mu$ g/ $\mu$ L), pet puta veća koncentracija od standardne (2,0  $\mu$ g/ $\mu$ L) i deset puta veća koncentracija od standardne (4,0  $\mu$ g/ $\mu$ L). Nakon dodatka tripsina, uzorci se inkubiraju na 37°C preko noći. Idući dan dodaje se

3 $\mu$ L 1M HCl i inkubira se 45 minuta na 37°C, kako bi se postigao pH  $\approx$  2 potreban za razgradnju surfaktanta RapiGest SF koji bi mogao ometati daljnju analizu.

### 3.4.3. HILIC-SPE obogaćivanje glikopeptida

Tripsinizacijom dobiveni glikopeptidi obogaćeni su pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi uz kromatografiju temeljenu na hidrofilnim interakcijama ( HILIC-SPE, *engl. Hydrophilic interaction chromatography based solid-phase extraction*). U svaku jažicu na polipropilenskoj filter pločici dodaje se 100  $\mu$ L suspenzije Chromabond® HILIC kuglica koja je ranije pripremljena u koncentraciji od 50mg/mL. Pločica za otpad postavljena je ispod filter pločice te su zajedno postavljene iznad vakuumske pumpe pomoću koje se uklanja otapalo. Jažice se kondicioniraju ispiranjem dva puta s 250  $\mu$ L 0,1% TFA nakon čega se stavljaju u početne uvjete ispiranjem još jednim dvostrukim ispiranjem s 250 $\mu$ l 90% acetonitrilom (ACN) i 0,1% TFA. Uzorci se nadalje razrijeđuju sa 450 $\mu$ L ACN (90%) i 0.1% TFA nakon čega ih je potrebno prebaciti u filter pločicu koja se nalazi iznad vakuumske pumpe gdje se dva puta ispiru s 250 $\mu$ l ACN (90%) i 0,1% TFA. U sljedećem koraku se ispod stavlja PCR pločica umjesto pločice za otpad pri čemu se obogaćeni glikopeptidi eluiraju s 200  $\mu$ l 0,1% TFA. Ostatak otapala u eluatu potrebno je ukloniti u SpeedVac vakuumskom koncentratoru nakon čega je uzorke do analize potrebno skladištiti na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Isti postupak obogaćivanja pomoću HILIC-SPE proveden je simultano s 95% ACN-om (umjesto 90% ACN-a) u tetraplikatu kako bi se ispitaio utjecaj na apsolutni intenzitet glikozilacijskog mjesta III.

### 3.4.4. RP-LC-ESI-MS

Nano ACQUITY UPLC sustav spregnut s Compact masenim spektrometrom koji koristi CaptiveSpray nanoBooster ionski izvor korišten se za odjeljivanje glikopeptida na temelju razlike u peptidnom dijelu te omjera mase i naboja ioniziranih glikopeptida. Kako bi se povećala ionizacija glikopeptida ACN je dodan u struju dušika. U idućem koraku se u 6  $\mu$ L uzorka (prethodno resuspendiranog u 20  $\mu$ L vode) dodaje 34 $\mu$ L ultračiste vode i unose se u Acclaim PepMap100 C8 (5 mm $\times$ 300  $\mu$ m i.d.) pretkolonu gdje se ispiru 3 minute s 0,1% TFA pri protoku od 40 $\mu$ L/min. Pomoću Halo C18 nano-LC kolone (150 mm $\times$ 75  $\mu$ m i.d.) s 2.7 $\mu$ m HALO česticama fuzionirane jezgre glikopeptidi se razdvajaju temelju razlika u peptidnoj okosnici, pri čemu se gradijentna elucija provodi na temperaturi kolone od 30°C s brzinom

protoka od 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . tijekom prvih 5 minuta se udio 80% ACN-a poveća od 0% do 20% , a preostalih 11,5 min od 20% do 50%.

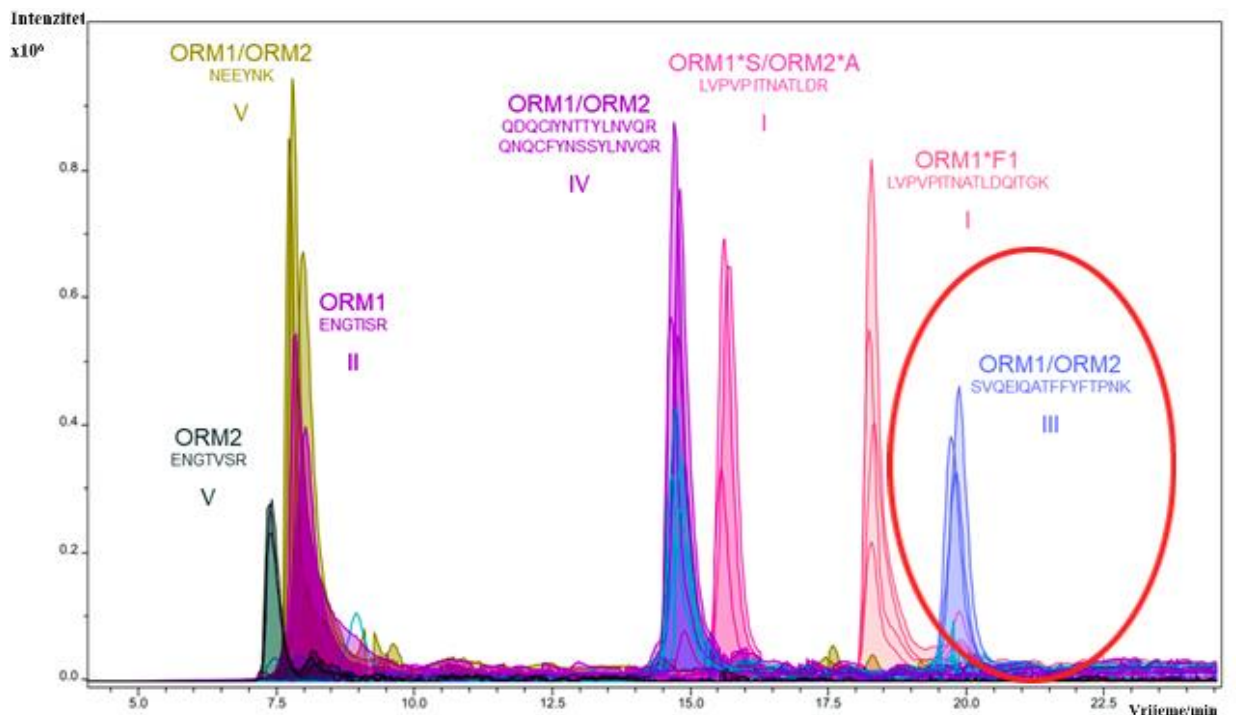
### 3.4.5. Obrada podataka

Prije ekstrakcije podataka datoteke korištene u obradi prebačene su u mzXML oblik koristeći se MSConvert alatom (ProteoWizard verzija 3). Alat LaCyTools (verzija 1.0.11.0.1 b.9) korišten je za automatsku relativnu kvantifikaciju rezultata dobivenih MS-om. Pet najsnažnijih glikopeptidnih signala uzeto je za usklađivanje kromatograma. Na trostruko i četverostruko nabijenim ionima izvršena integracija pikova na način da sadrže najmanje 90% teorijske izotopne distribucije. Omjer signala i šuma ( $>15$ ) integriranog signala točnost mase (između -30 i +30 ppm) i devijacija od teorijske izotopne distribucije ( $<25\%$ ) služili su kao kontrola kvalitete za dokazivanje prisutnosti glikopeptida. Zbrojeni izvučeni signali za trostruko i četverostruko nabijene ione normalizirani su prema ukupnoj integriranoj površini po glikozilacijskom mjestu, kako bi se izbjegla varijacija u jačini signala između uzoraka i glikozilacijskih mjesta te omogućila njihova međusobna usporedba. Za analizu i prikaz statističkih podataka korišten je Microsoft Excel (verzija 2016.).

## 4. Rezultati i rasprava

Primjer rezultata analize LC-ESI-MS visokoprotočne metode za analizu potpunog N-glikoma AGP-a je kromatogram na Slici 5. Cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati utjecaj koncentracije tripsina u koraku digestije i udjela ACN-a u mobilnoj fazi HILIC-SPE prilikom obogaćivanja glikopeptida na intenzitet signala glikozilacijskog mjesta III AGP-a (istaknutog na Slici 5) u svrhu optimizacije metode. Prije analize AGP se obogaćuje precipitacijom seromukoidne frakcije nakon koje slijedi redukcija, alkilacija i tripsinizacija uz prethodno djelovanje surfaktanta. Kako bi se poboljšala osjetljivost metode dobiveni glikopeptidi obogaćuju se pomoću HILIC-SPE, gdje se glikopeptidi odjeljuju na temelju interakcija polarne stacionarne faze i hidrofobne mobilne faze koju čine organsko otapalo i voda. Prilikom same analize u obrnuto faznoj tekućinskoj kromatografiji glikopeptidi se razdvajaju na temelju razlika u peptidnoj sekvenci što na kromatogramu možemo vidjeti kao različita retencijska vremena glikopeptida nakon čega slijedi raspršenje uzorka pomoću elektrosprej ionizatora, ionizacija i identifikacija ioniziranih glikopeptida na temelju omjera  $m/z$ .





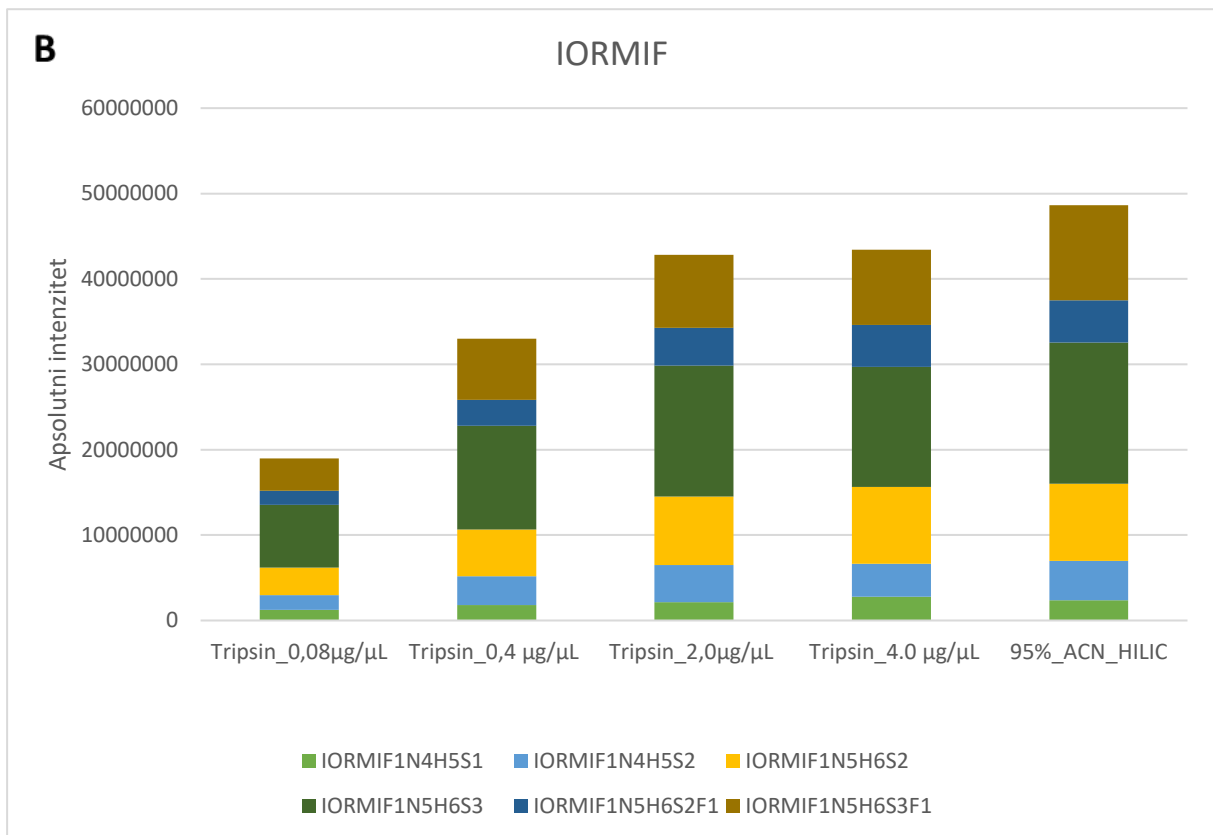
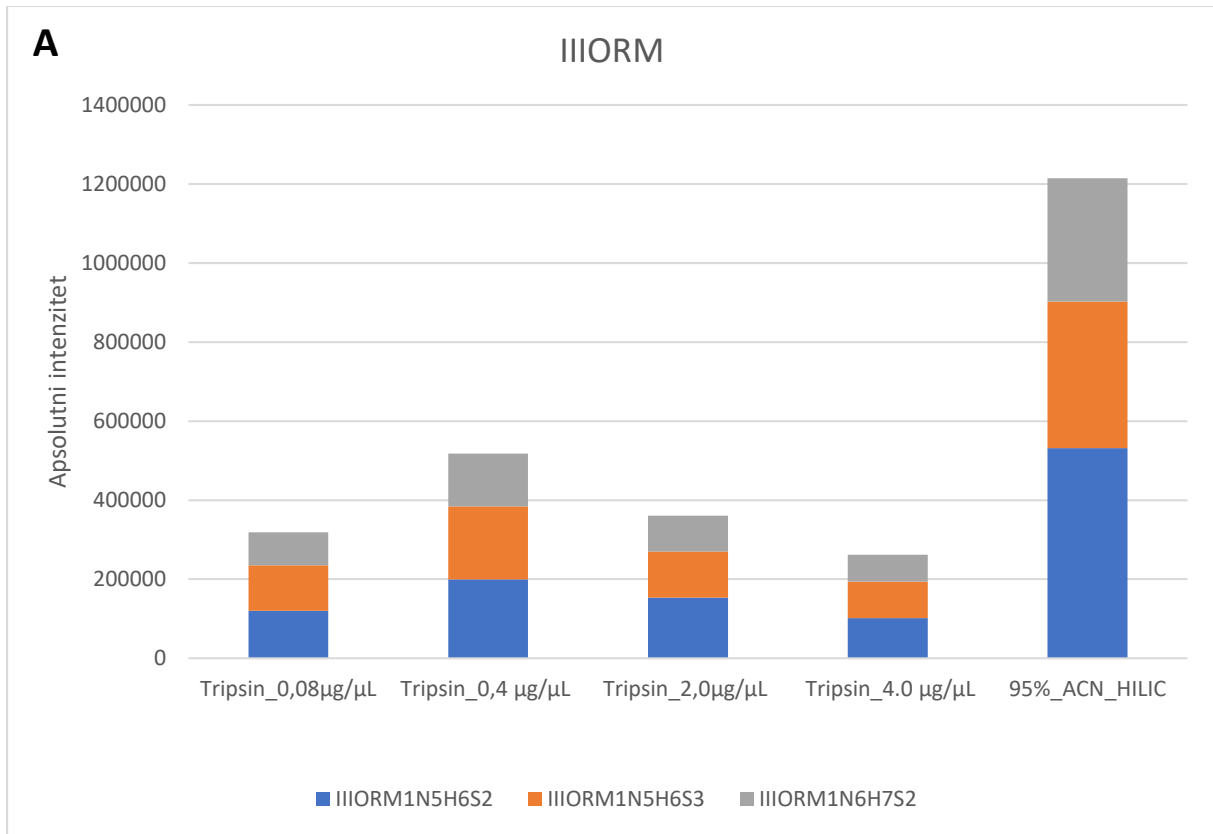
Slika 5. Prikaz kromatograma izoliranih iona za neke od najzastupljenijih glikopeptida AGP-a. Pikovi glikopeptida istog retencijskog vremena prikazani su u istoj boji te su uz glikozilacijska mjesta (označena rimskim brojevima) navedene genske varijante i aminokiselinski sljedovi peptida na kojima se nalaze. Crvenom bojom istaknuto je glikozilacijsko mjesto III.

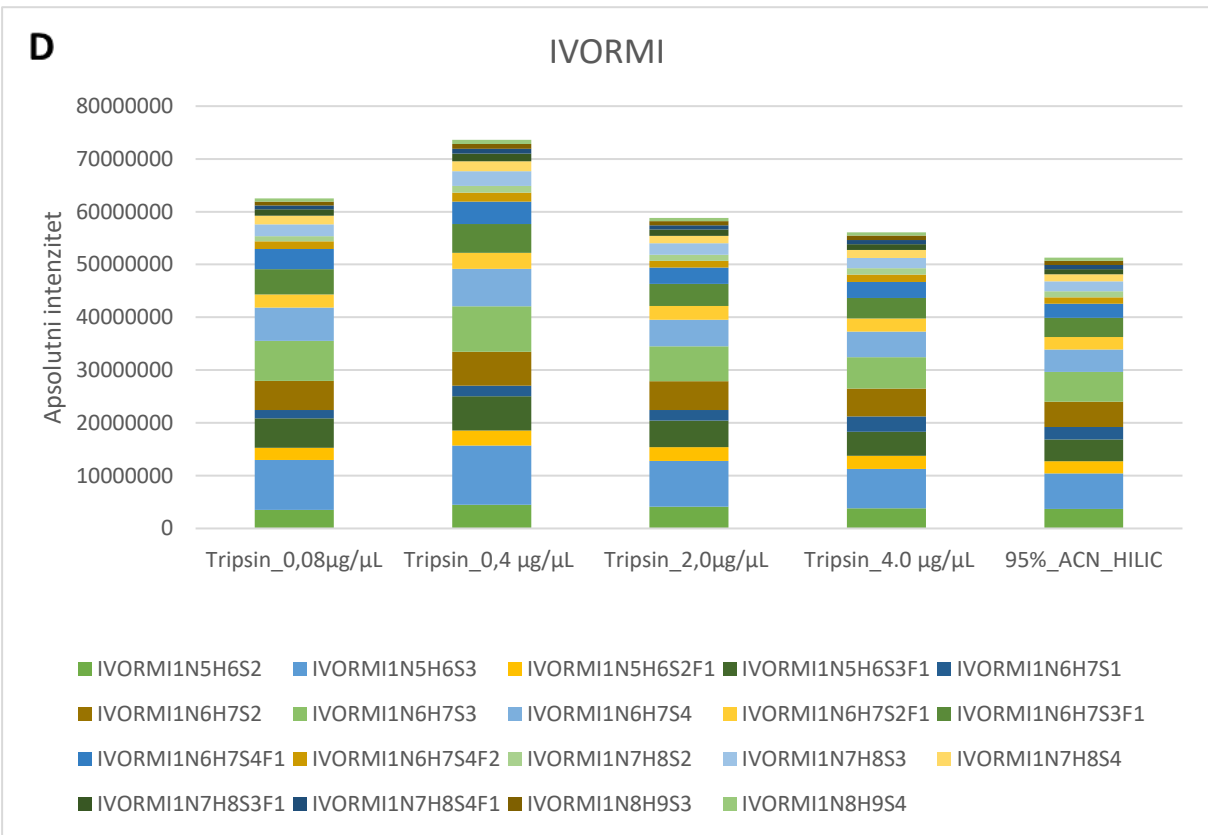
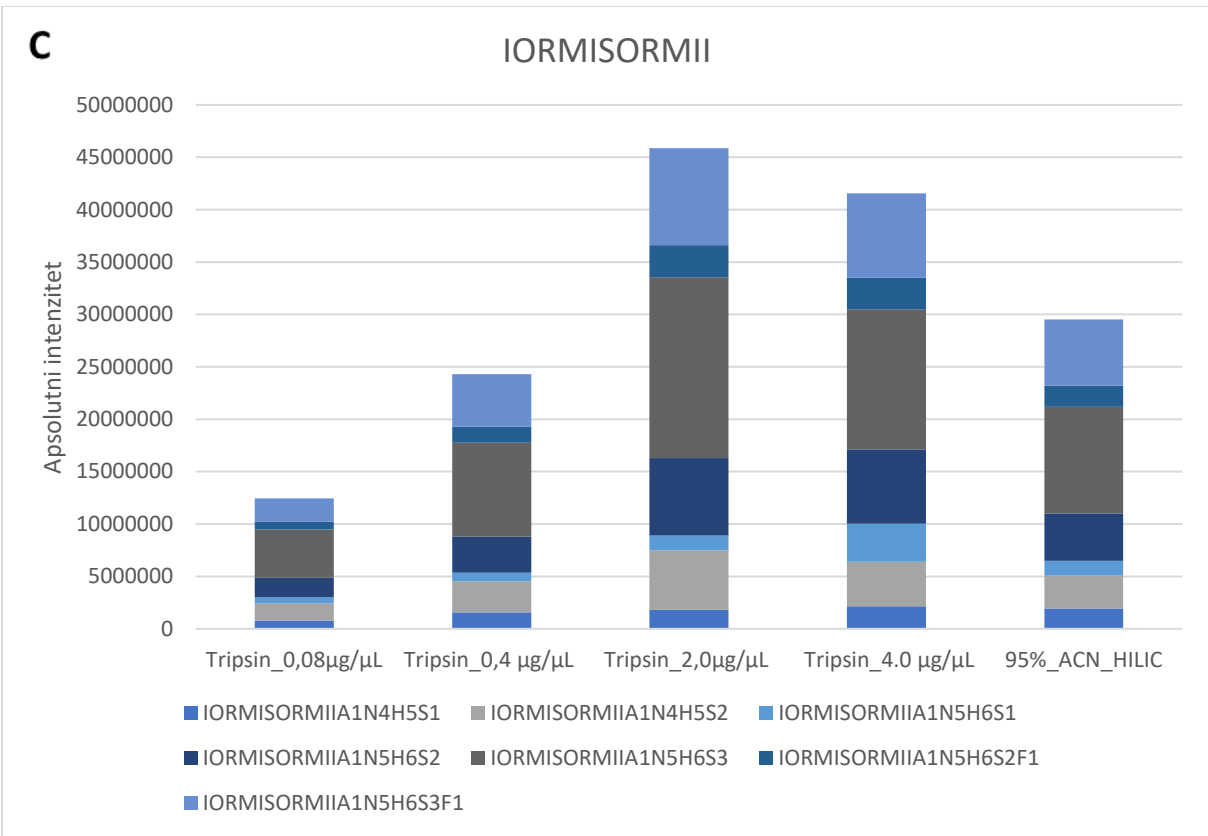
Na kromatogramu Slike 5 glikopeptidi su označeni s obzirom na glikozilacijska mjesta kojima pripadaju uz aminokiselinski slijed peptida na kojem se nalaze. U uzorku su prisutne različite genske varijante AGP-a čija su glikozilacijska mjesta označena s obzirom na gen koji kodira određenu varijantu (*ORM1* ili *ORM2* odnosno *AGP-A*; *AGP-B* i *AGP-B'*). Za određene glikopeptide nije moguće odrediti od koje varijante potječu te su zato glikozilacijska mjesta označena s *ORM1/ORM2*. Iz tog razloga je na kromatogramu prikazano sedam N-glikozilacijskih mjesta iako pojedini AGP sadrži pet glikozilacijskih mjesta.

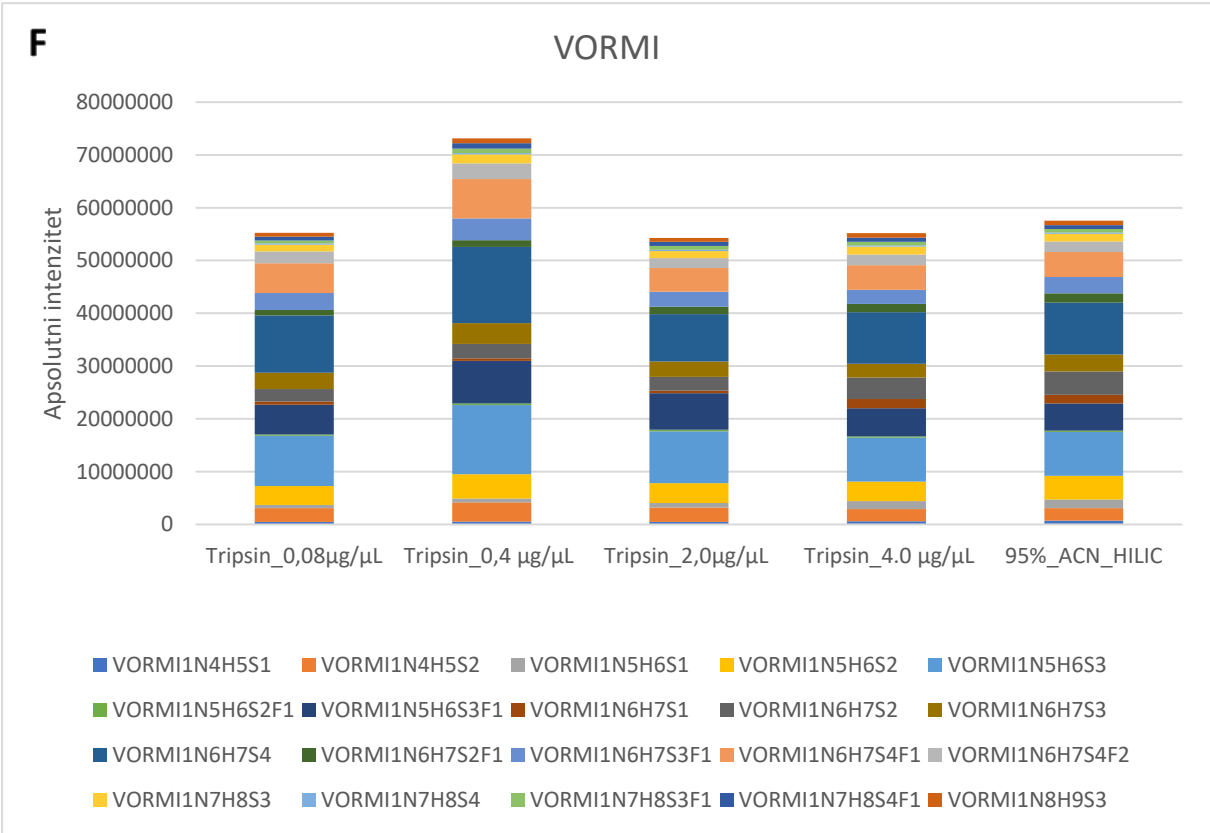
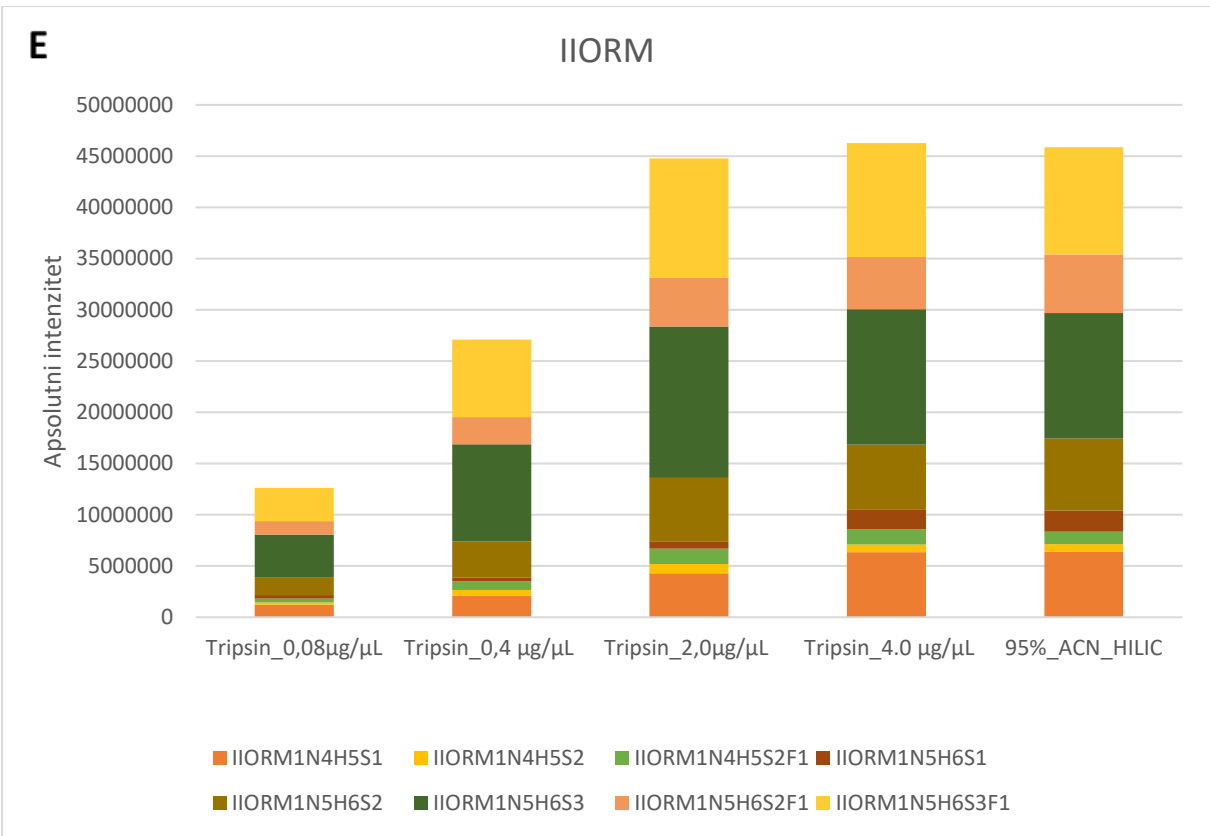
Kako bi se ispitaio utjecaj koncentracije tripsina na apsolutni intenzitet trećeg glikozilacijskog mjesta zbog otpornosti AGP-a na tripsinizaciju uz standardnu koncentraciju tripsina u protokolu (0,4 µg/L) provedena je analiza pri korištenju pet puta manje, pet puta veće i deset puta veće koncentracije (0,08 µg/µL, 0,4 µg/µL, 2,0 µg/µL, 4,0 µg/µL).

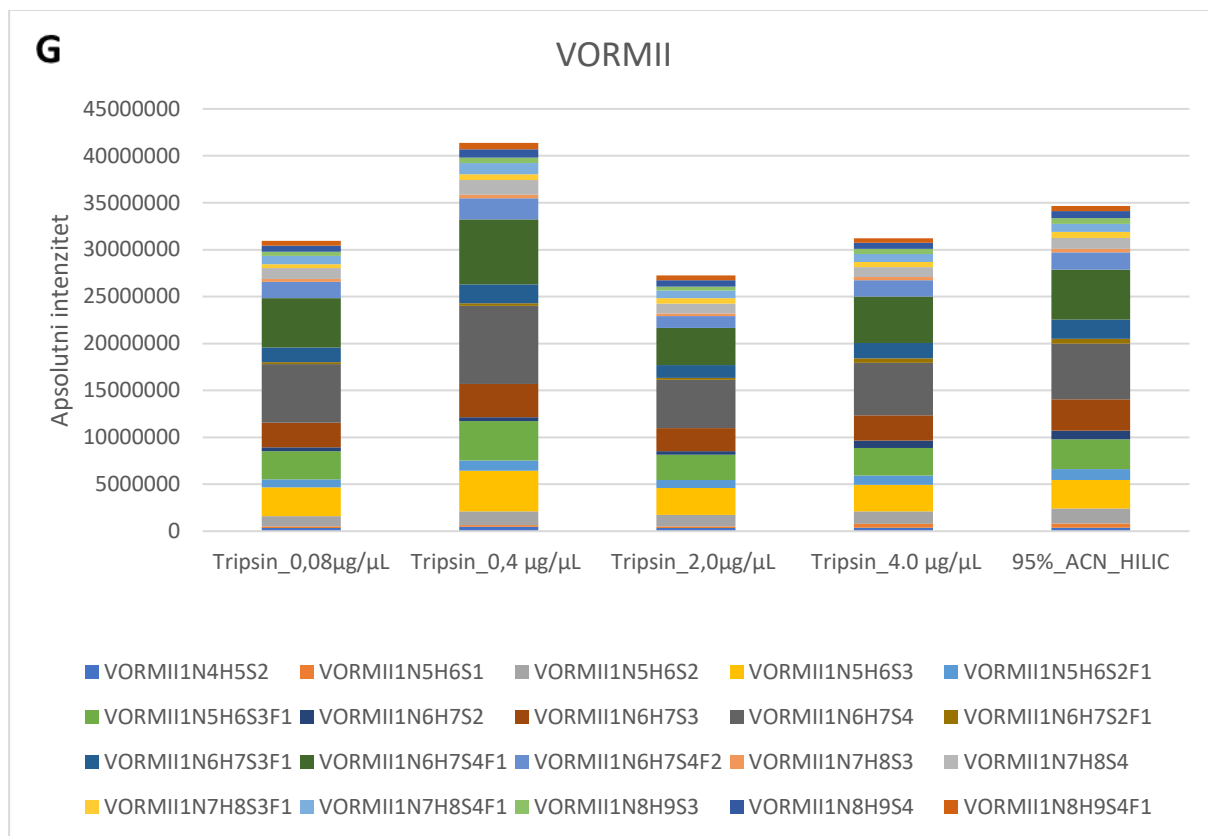
Također, ispitan je i utjecaj koncentracije ACN-a kao mobilne faze u koraku obogaćivanja pomoću HILIC-SPE te je uz standardni postupak (90% ACN) proveden postupak s 95% ACN-om. Sve ispitane izmjene u protokolu izvedene su u kvadruplikatu.

Analizom masenog spektra i integracijom pikova trostruko i četverostruko nabijenih iona te zbrojem signala dobiveni su apsolutni intenziteti signala pojedinih glikopeptida. Apsolutni intenziteti signala glikozilacijskog mjesta dobiveni su kao zbroj srednjih vrijednosti kvadruplikata za glikopeptide koji pripadaju pojedinom mjestu. Podaci su prikazani na Slici 6 pri različitim ranije navedenim uvjetima optimizacije metode i standardne metode.









Slika 6. Grafički prikazi apsolutnih intenziteta sedam glikozilacijskih mjesta, dobivenih pri različitim uvjetima optimizacije metode (korištenjem tripsina u koncentraciji od 0,08 µg/µL, 2,0 µg/µL, 4,0 µg/µL i 95% ACN-a) i standardnom metodom (korištenjem tripsina u koncentraciji od 0,4 µg/µL i 90% ACN-a). Grafički prikazi označeni su slovima A-G uz koja je naveden naziv glikozilacijskog mjesta u naslovu pojedinog prikaza. Glikozilacijska mjesta označena su s ORM kraticom za orozomukoid, ispred koje je rimskim brojevima (I-V) naveden broj glikozilacijskog mjesta, a nakon kratice ORM navedeni rimski bojevi (I,II) i slova (F, S i A) odnose se na gensku varijantu. Intenzitet svakog glikopeptida pripadajućeg glikozilacijskog mjesta označen je različitom bojom. Glikopeptidi su označeni na sljedeći način: ORM, kratica za orozomukoid tj. drugi naziv za alfa-1 kiseli glikoprotein; glikozilacijska mjesta kojima pripadaju označena su u nazivu rimskim brojevima (I-V) ispred ORM; na gensku varijantu se odnose rimski brojevi (I,II) i slova (S,F) nakon naziva ORM; Oznake u nastavku odnose se na ugljikohidrate koji tvore glikane i broj nakon svake oznake predstavlja zastupljenost navedenih jedinica u pojedinom glikanu: N, N-acetilglukozamin; H, heksoza (manoza i galaktoza); F, fukoza, S, sijalinska kiselina.

Iz navedenih rezultata (Slika 6A) vidljivo je da promijenjene koncentracije tripsina nisu utjecale na povećanje apsolutnog intenziteta glikozilacijskog mjesta III, iako je pri povećanoj koncentraciji tripsina došlo do povećanja intenziteta glikozilacijskih mjesta IORMIF, IORMISORMII i IIORM (Slike 6B, 6C i 6E). Iz navedenog se može zaključiti da otpornost na tripsinizaciju nije uzrok smanjene vidljivosti glikozilacijskog mjesta od interesa.

Korištenje 95% ACN rezultiralo je više nego dvostrukim povećanjem apsolutnog intenziteta signala za glikozilacijsko mjesto III u odnosu na standardnu metodu. Za glikozilacijska mjesta IORMIF, IORMISORMII i IIORM (Slike 6B, 6C i 6E) također došlo do povećanja intenziteta signala, ali je manjeg utjecaja u odnosu na IIIORM (Slika 6A). Ovi rezultati ukazuju na značajan utjecaj visokog udjela hidrofobne peptidne sekvence na afinitet glikoproteina prema stacionarnoj fazi.

Relativni intenziteti glikopeptida dobiveni su dijeljenjem apsolutnog intenziteta signala pojedinog glikopeptida sa zbrojem apsolutnih intenziteta signala svih glikopeptida koji pripadaju određenom glikozilacijskom mjestu. Aritmetička sredina relativnih intenziteta pripadajućih glikopeptida predstavlja relativni intenzitet glikozilacijskog mjesta. Za potrebe ovog diplomskog rada preciznost je iskazana kao koeficijent varijacije (CV, engl. *coefficient of variation*) relativnih intenziteta signala dobivenih mjerenjem u tetraplikatu, za sve glikopeptide. CV je omjer standardne devijacije (SD) i srednje vrijednosti te je izražen u postotcima (%). Dobiveni podaci prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Koeficijenti varijacije relativnih intenziteta signala svih glikopeptida dobivenih mjerenjem u tetraplikatu standardnom metodom i pri različitim uvjetima optimizacije. Glikopeptidi su označeni na sljedeći način: ORM, kratica za orozomukoid odnosno drugi naziv za alfa-1 kiseli glikoprotein; glikozilacijska mjesta kojima pripadaju označena su u nazivu rimskim brojevima (I-V) ispred ORM; nakon naziva ORM rimski brojevi (I,II) i slova (F, S i A) odnose se na gensku varijantu; Oznake u nastavku odnose se na ugljikohidrate koji tvore glikane te broj nakon svake oznake predstavlja zastupljenost navedenih jedinica u pojedinom glikanu: N, N-acetilglukozamin; H, heksoza (manoza i galaktoza); F, fukoza, S, sijalinska kiselina.

<i>CV</i>	<b>Tripsin 0,08µg/µL</b>	<b>Tripsin 0,4µg/µL</b>	<b>Tripsin 2,0µg/µL</b>	<b>Tripsin 4,0µg/µL</b>	<b>95%ACN HILIC</b>
<i>IIIORM1N5H6S2</i>	2.9%	3.0%	5.8%	2.6%	18.2%
<i>IIIORM1N5H6S3</i>	4.4%	4.0%	3.7%	0.7%	28.4%
<i>IIIORM1N6H7S2</i>	4.5%	2.4%	5.3%	4.8%	4.3%
<i>IORMIF1N4H5S1</i>	60.8%	53.8%	18.2%	67.6%	49.4%
<i>IORMIF1N4H5S2</i>	13.9%	9.6%	10.9%	8.9%	11.6%
<i>IORMIF1N5H6S2</i>	10.3%	3.1%	11.6%	50.8%	32.2%
<i>IORMIF1N5H6S3</i>	18.3%	20.5%	5.8%	41.4%	41.2%
<i>IORMIF1N5H6S2F1</i>	21.3%	11.4%	10.1%	47.4%	28.4%

<i>IORMIF1N5H6S3F1</i>	23.0%	6.7%	10.9%	38.7%	11.7%
<i>IORMISORMIIA1N4H5S1</i>	19.4%	65.0%	22.2%	46.6%	60.5%
<i>IORMISORMIIA1N4H5S2</i>	13.2%	21.4%	9.1%	15.1%	9.3%
<i>IORMISORMIIA1N5H6S1</i>	38.4%	59.3%	17.0%	134.7%	99.2%
<i>IORMISORMIIA1N5H6S2</i>	14.2%	4.1%	8.6%	39.1%	27.8%
<i>IORMISORMIIA1N5H6S3</i>	13.9%	33.6%	3.5%	41.5%	37.7%
<i>IORMISORMIIA1N5H6S2F1</i>	19.1%	16.9%	5.1%	27.6%	23.4%
<i>IORMISORMIIA1N5H6S3F1</i>	25.0%	18.1%	8.6%	42.9%	29.9%
<i>IVORMI1N5H6S2</i>	17.9%	7.4%	13.1%	40.8%	31.2%
<i>IVORMI1N5H6S3</i>	10.2%	2.6%	2.9%	37.5%	30.0%
<i>IVORMI1N5H6S2F1</i>	19.5%	6.9%	15.6%	34.8%	31.8%
<i>IVORMI1N5H6S3F1</i>	14.5%	1.7%	4.5%	22.5%	20.6%
<i>IVORMI1N6H7S1</i>	56.9%	8.5%	22.2%	105.8%	74.0%
<i>IVORMI1N6H7S2</i>	11.6%	4.1%	7.9%	27.3%	19.4%
<i>IVORMI1N6H7S3</i>	4.4%	2.0%	7.4%	26.6%	20.6%
<i>IVORMI1N6H7S4</i>	8.4%	8.1%	17.9%	42.7%	36.9%
<i>IVORMI1N6H7S2F1</i>	9.0%	2.2%	5.4%	30.9%	22.8%
<i>IVORMI1N6H7S3F1</i>	13.8%	4.3%	9.6%	22.8%	15.1%
<i>IVORMI1N6H7S4F1</i>	14.6%	9.4%	16.7%	28.8%	24.2%
<i>IVORMI1N6H7S4F2</i>	2.8%	5.1%	4.0%	15.9%	7.0%
<i>IVORMI1N7H8S2</i>	34.4%	9.6%	16.4%	47.0%	42.2%
<i>IVORMI1N7H8S3</i>	4.3%	4.3%	2.3%	8.3%	2.1%
<i>IVORMI1N7H8S4</i>	7.3%	2.9%	2.8%	15.4%	10.2%
<i>IVORMI1N7H8S3F1</i>	2.3%	4.7%	5.4%	4.1%	6.7%
<i>IVORMI1N7H8S4F1</i>	2.3%	3.0%	10.5%	2.4%	8.1%
<i>IVORMI1N8H9S3</i>	6.7%	5.8%	17.7%	17.1%	20.5%
<i>IVORMI1N8H9S4</i>	7.0%	4.3%	15.2%	7.1%	8.5%
<i>IORM1N4H5S1</i>	76.2%	16.4%	25.2%	85.3%	62.3%
<i>IORM1N4H5S2</i>	21.1%	8.0%	7.7%	33.4%	29.8%
<i>IORM1N4H5S2F1</i>	34.7%	9.6%	6.8%	33.3%	33.9%
<i>IORM1N5H6S1</i>	99.0%	32.2%	17.0%	149.1%	129.9%

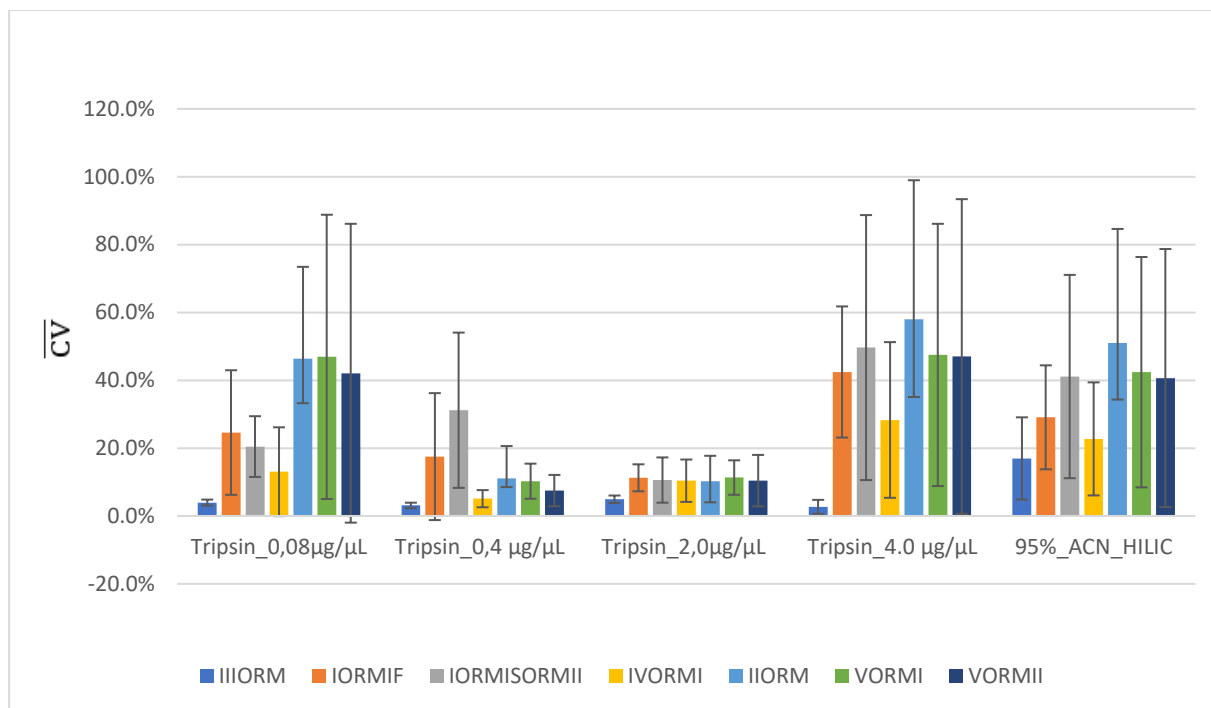


<i>IIORM1N5H6S2</i>	23.6%	8.6%	6.2%	33.0%	34.7%
<i>IIORM1N5H6S3</i>	37.9%	1.2%	3.7%	47.2%	40.8%
<i>IIORM1N5H6S2F1</i>	37.8%	5.4%	3.7%	31.7%	30.3%
<i>IIORM1N5H6S3F1</i>	40.5%	6.8%	11.7%	51.1%	46.1%
<i>VORMI1N4H5S1</i>	56.8%	7.5%	10.0%	64.4%	60.4%
<i>VORMI1N4H5S2</i>	37.6%	5.5%	7.3%	39.3%	31.2%
<i>VORMI1N5H6S1</i>	123.6%	25.0%	11.9%	118.3%	104.5%
<i>VORMI1N5H6S2</i>	19.7%	6.6%	9.2%	22.0%	30.4%
<i>VORMI1N5H6S3</i>	41.0%	6.4%	7.0%	47.3%	38.7%
<i>VORMI1N5H6S2F1</i>	68.7%	11.1%	13.4%	29.1%	32.1%
<i>VORMI1N5H6S3F1</i>	36.8%	11.1%	19.7%	37.0%	29.7%
<i>VORMI1N6H7S1</i>	157.1%	14.4%	13.3%	160.7%	143.9%
<i>VORMI1N6H7S2</i>	91.2%	11.9%	5.3%	95.4%	80.8%
<i>VORMI1N6H7S3</i>	4.1%	2.9%	3.2%	19.9%	18.3%
<i>VORMI1N6H7S4</i>	24.1%	7.8%	17.8%	19.4%	23.6%
<i>VORMI1N6H7S2F1</i>	104.5%	19.3%	7.8%	75.2%	67.9%
<i>VORMI1N6H7S3F1</i>	2.9%	6.8%	8.6%	10.8%	16.2%
<i>VORMI1N6H7S4F1</i>	40.9%	9.5%	21.8%	49.3%	46.2%
<i>VORMI1N6H7S4F2</i>	22.9%	12.3%	19.5%	32.6%	34.1%
<i>VORMI1N7H8S3</i>	24.7%	4.6%	9.4%	44.9%	22.0%
<i>VORMI1N7H8S4</i>	23.2%	9.4%	10.3%	15.4%	15.5%
<i>VORMI1N7H8S3F1</i>	33.3%	13.1%	11.9%	19.0%	14.1%
<i>VORMI1N7H8S4F1</i>	12.6%	12.3%	12.8%	21.3%	22.2%
<i>VORMI1N8H9S3</i>	12.6%	7.6%	6.6%	28.3%	15.9%
<i>VORMIII1N4H5S2</i>	2.2%	10.6%	25.4%	6.2%	9.3%
<i>VORMIII1N5H6S1</i>	149.4%	14.0%	17.8%	159.5%	137.4%
<i>VORMIII1N5H6S2</i>	56.3%	11.5%	15.7%	63.7%	58.5%
<i>VORMIII1N5H6S3</i>	28.7%	4.3%	3.4%	38.0%	30.9%
<i>VORMIII1N5H6S2F1</i>	64.5%	9.0%	11.4%	65.7%	50.1%
<i>VORMIII1N5H6S3F1</i>	16.7%	2.7%	1.5%	26.2%	23.8%
<i>VORMIII1N6H7S2</i>	132.2%	11.1%	25.8%	143.8%	121.4%

<i>VORMIII1N6H7S3</i>	19.8%	1.9%	6.1%	14.3%	20.9%
<i>VORMIII1N6H7S4</i>	37.0%	1.7%	7.4%	45.6%	38.4%
<i>VORMIII1N6H7S2F1</i>	128.4%	10.6%	20.9%	137.4%	109.0%
<i>VORMIII1N6H7S3F1</i>	29.0%	1.9%	10.5%	26.4%	27.6%
<i>VORMIII1N6H7S4F1</i>	36.9%	7.2%	9.6%	44.7%	37.9%
<i>VORMIII1N6H7S4F2</i>	27.8%	16.1%	14.4%	35.3%	29.5%
<i>VORMIII1N7H8S3</i>	6.5%	4.5%	7.0%	14.5%	9.3%
<i>VORMIII1N7H8S4</i>	14.1%	4.9%	2.7%	15.1%	12.3%
<i>VORMIII1N7H8S3F1</i>	28.8%	14.9%	14.0%	27.4%	23.3%
<i>VORMIII1N7H8S4F1</i>	18.9%	2.0%	4.3%	19.3%	18.4%
<i>VORMIII1N8H9S3</i>	36.9%	6.7%	2.8%	40.2%	34.5%
<i>VORMIII1N8H9S4</i>	4.2%	8.9%	3.1%	11.0%	12.0%
<i>VORMIII1N8H9S4F1</i>	3.4%	5.3%	4.5%	6.2%	8.5%

Kako bi se mogao usporediti utjecaj različitih uvjeta optimizacije na preciznost sa standardnom metodom, izračunate su aritmetičke sredine koeficijenta varijacije glikopeptida pripadajućeg glikozilacijskog mjesta. Dobivene vrijednosti su grafički prikazane na Slici 7.

Iz navedenog prikaza vidljivo je da se upotrebom koncentracije tripsina koja je pet puta niža ili deset puta viša od standardne značajno povećava koeficijent varijacije metode u odnosu na standardnu, dok je uz pet puta veću koncentraciju tripsina povećana preciznost metode. Upotrebom 95% ACN izrazito se povećava varijabilnost rezultata uzastopnih mjerenja čime se smanjuje preciznost metode u odnosu na standardnu. Iz tog razloga promjena ovog parametra ne doprinosi krajnjoj optimizaciji metode.



Slika 7. Stupčasti dijagram srednjih vrijednosti koeficijenta varijacije s trakama pogreške koje predstavljaju njihove standardne devijacije za glikozilacijska mjesta označena različitim bojama. Podaci su prikazani pri različitim uvjetima optimizacije metode.

## 5. Zaključak

Prilikom optimizacije visokoprotočne LC-ESI-MS metode za analizu N-glikozilacije alfa-1 kiselog glikoproteina analiziran je utjecaj koncentracije tripsina u koraku digestije i povećanog udjela ACN-a u koraku obogaćivanja na apsolutni intenzitet signala glikozilacijskog mjesta III. Promjena koncentracije tripsina nije utjecala na intenzitet signala glikozilacijskog mjesta od interesa iako je kod nekih glikozilacijskih mjesta došlo do povećanja intenziteta pri korištenju koncentracija tripsina većih od standardne. Također, ova promjena u protokolu (osim u slučaju korištenja 2,0 µg/µL tripsina) povećala je varijabilnost rezultata i smanjila preciznost metode. Povećanje udjela ACN-a u mobilnoj fazi prilikom obogaćivanja pomoću HILIC-SPE pojačalo je intenzitet signala glikozilacijskog mjesta III, ali se preciznost metode također značajno smanjila što u konačnici nije pogodno za optimizaciju metode. Kako bi se metoda mogla optimizirati, u budućem radu potrebno je ispitati druge stacionarne faze koje bi bile prihvatljivije za korištenje prilikom HILIC-SPE obogaćivanja ili neke druge metode

obogaćivanja koje bi uz povećanje intenziteta signala glikozilacijskog mjesta III mogle zadovoljiti uvjete preciznosti metode.

## 6. Literatura

- Alberts B., 2017. Intracellular Membrane Traffic. U: *Molecular Biology of the Cell*. Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, urednici, New York, Garland Science, 2017, str. 716-720.
- Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci*, 2007, 8, 91–108.
- Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Med Flum*, 2009, 45, 218–232.
- Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 305-306.
- Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25, 267–278.
- Hart GW, Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell*, 2010, 143, 672–676.
- Hoffmann E, Stroobant V. Mass Spectrometry: principles and applications, Chichester, John Wiley and Sons, 2007, str. 4-126.
- Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnár-Szölloši E, Kremmer T, Malorni A, Vékey K. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2005, 40, 1472–1483.
- Keser T. 'Influence of genetic and environmental factors on N-glycosylation of immunoglobulin G and total plasma proteins determined by twin study', Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:247536>.
- Keser T, Tijardović M, Gornik I, Lukić E, Lauc G, Gornik O, Novokmet, M. High-Throughput and Site-Specific N-Glycosylation Analysis of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein Offers a Great Potential for New Biomarker Discovery. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20, 100044.
- Kolarich D, Jensen PH, Altmann F, Packer NH. Determination of site-specific glycan heterogeneity on glycoproteins. *Nat Protoc*, 2012, 7, 1285–1298.
- Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. 2014. Glycans – the third revolution in evolution. *Front Genet*, 2014, 5, 1-7.
- Lauc G, Wuhrer M. High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols. New York, Humana Press, 2017, str. 14-21.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC. *Molecular Cell Biology* 8th ed. New York, W. H. Freeman and Company, 2016, str. 601-603, 648.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology* 4th Ed. New York, W. H. Freeman and Company, 2000, str. 712-720.
- Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15, 346–366.
- Shipman JT, Nguyen HT, Desaire H. So You Discovered a Potential Glycan-Based Biomarker; Now What? We Developed a High-Throughput Method for Quantitative Clinical Glycan Biomarker Validation. *ACS Omega*, 2020, 5, 6270–6276.
- Shubhakar A, Reiding KR, Gardner RA, Spencer DIR, Fernandes, DL, Wuhrer M. High-Throughput Analysis and Automation for Glycomics Studies. *Chromatographia*, 2015, 78, 321–333.

- Skoog DA, West DM, Holler FJ, Stanley RC. Fundamentals of analytical chemistry 9th edition. Belmont; Brooks/Cole, 2014, str. 802-814.
- Štraus B, Barišić K. 2009. Proteini. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 189.
- Taguchi K, Nishi K, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Molecular aspects of human alpha-1 acid glycoprotein – structure and function, U: Acute phase proteins, urednici, Janciauskiene S, London, IntechOpen, 2013, poglavlje 6.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P i sur. Essentials of Glycobiology [Internet]. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015-2017.

## 7. Sažetak / Summary

### SAŽETAK

Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) izrazito je glikoziliran serumski protein akutne faze koji sadrži pet vezanih N-glikana kompleksnog tipa na polipeptidnoj okosnici. Promjene u glikozilaciji AGP-a prisutne u raznim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Nedavno je razvijena nova ekonomski isplativa visokoprotočna metoda koja omogućuje precizno i sveobuhvatno određivanje N-glikanskog profila AGP-a iz malog volumena krvnog seruma ili plazme. Navedenom metodom pokazalo se da je N-glikanski profil stabilan kod zdravih pojedinaca, a promjene u njegovoj N-glikozilaciji bi mogle poslužiti kao novi biomarker u prepoznavanju osoba s povećanim rizikom za razvoj diabetes mellitusa tipa II.

AGP se obogaćuje iz uzorka precipitacijom seromukoidne frakcije nakon koje slijedi redukcija, alkilacija i tripsinizacija te daljnje obogaćivanje glikopeptida pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (HILIC-SPE). Dobiveni glikopeptidi analiziraju se obrnuto faznom kromatografijom spregnutom s masenim spektrometrom čime se dobiva detaljan uvid u glikanski profil svakog N-glikozilacijskog mjesta AGP-a. Prilikom provođenja metode na velikom broju uzoraka, kod nekih je primijećen smanjen intenzitet signala glikozilacijskog mjesta III.

Kako bi se utvrdio uzrok navedenog odstupanja ispitan je utjecaj koncentracije tripsina i udjela ACN-a u mobilnoj fazi HILIC-SPE na intenzitet glikozilacijskog mjesta III. Utjecaj tripsina je ispitan zbog otpornosti AGP-a na tripsinizaciju, dok je povećanje udjela ACN-a u mobilnoj fazi razmotreno zbog velikog udjela hidrofobnog peptidnog djela koji bi mogao smanjiti afinitet prema polarnoj stacionarnoj fazi prilikom obogaćivanja ekstrakcijom na čvrstoj fazi.

Promjena koncentracije tripsina nije utjecala na intenzitet signala, dok je povećanje udjela ACN-a u koraku obogaćivanja pojačalo intenzitet signala glikozilacijskog mjesta od interesa. Ove promjene u protokolu (osim prilikom korištenja pet puta veće koncentracije tripsina od standardne) smanjile su preciznost u odnosu na standardnu metodu, što u konačnici nije pogodno za optimizaciju metode. U budućem radu potrebno je ispitati druge stacionarne faze koje bi bile prikladne za korištenje prilikom HILIC-SPE ili neke druge metode obogaćivanja koje bi osim povećanje intenziteta signala glikozilacijskog mjesta III zadovoljile uvjete preciznosti metode u odnosu na standardni postupak.

## SUMMARY

Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) is an acute-phase plasma protein with high carbohydrate content attached in the form of five N-linked complex glycans. Altered glycosylation of AGP occurs in many physiological and pathophysiological conditions. Recently, a cost-effective method for a high-throughput detailed AGP N-glycosylation profiling was developed, which provides site-specific glycosylation information from a small volume of blood serum or plasma. Using the method, it was demonstrated that N-glycan profile of AGP is stable in a healthy individual and that changes in N-glycan profile could help distinguish individuals who are at risk of type 2 diabetes.

AGP is enriched from blood plasma by acid precipitation of seromuroid fraction, after which it undergoes reduction, alkylation and trypsinization to be further enriched using solid-phase extraction (HILIC-SPE). Glycopeptides obtained by this process are then analysed by reversed-phase liquid chromatography paired with electrospray ionization-MS. During the implementation of the method on large cohorts, reduced intensity of glycosylation site III signal was observed in a certain number of measurements.

To determine the cause of irregularity, influence of trypsin concentration and increased concentration of acetonitrile in HILIC mobile phase on intensity of glycosylation site III signal was evaluated. The effect of trypsin was evaluated due to AGP being resistant to conventional tryptic digestion, whereas a higher concentration of ACN was investigated because of an extensive amount of hydrophobic peptide moiety of glycosylation site III which could lower the affinity towards the stationary phase in HILIC-SPE enrichment

The change in trypsin concentration didn't affect the intensity of the signal, whereas a higher concentration of ACN has enhanced the signal intensity of the glycosylation site of interest. These changes in the protocol (except for the trypsin concentration that was five times higher than the standard) have resulted in decreased precision compared to the standard method. This decrease is not suitable for the method optimisation. In further research, other stationary phases that could be suitable for HILIC-SPE enrichment or different enrichment methods should be tested in order to find a method that would also meet the precision criteria while increasing the signal intensity of the glycosylation site III.



## 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

### Optimizacija visokoprotočne metode za analizu N-glikozilacije alfa-1 kiselog glikoproteina

Maja Ukalović

#### SAŽETAK

Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) izrazito je glikozilirani serumski protein akutne faze koji sadrži pet vezanih N-glikana kompleksnog tipa na polipeptidnoj okosnici. Promjene u glikozilaciji AGP-a prisutne u raznim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Nedavno je razvijena nova ekonomski isplativa visokoprotočna metoda koja omogućuje precizno i sveobuhvatno određivanje N-glikanskog profila AGP-a iz malog volumena krvnog seruma ili plazme. Navedenom metodom pokazalo se da je N-glikanski profil stabilan kod zdravih pojedinaca, a promjene u njegovoj N-glikozilaciji bi mogle poslužiti kao novi biomarker u prepoznavanju osoba s povećanim rizikom za razvoj diabetes mellitusa tipa II.

AGP se obogaćuje iz uzorka precipitacijom seromukoidne frakcije nakon koje slijedi redukcija, alkilacija i tripsinizacija te daljnje obogaćivanje glikopeptida pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (HILIC-SPE). Dobiveni glikopeptidi analiziraju se obrnuto faznom kromatografijom spregnutom s masenim spektrometrom čime se dobiva detaljan uvid u glikanski profil svakog N-glikozilacijskog mjesta AGP-a. Prilikom provođenja metode na velikom broju uzoraka, kod nekih je primijećen smanjen intenzitet signala glikozilacijskog mjesta III.

Kako bi se utvrdio uzrok navedenog odstupanja ispitan je utjecaj koncentracije tripsina i udjela ACN-a u mobilnoj fazi HILIC-SPE na intenzitet glikozilacijskog mjesta III. Utjecaj tripsina je ispitan zbog otpornosti AGP-a na tripsinizaciju, dok je povećanje udjela ACN-a u mobilnoj fazi razmotreno zbog velikog udjela hidrofobnog peptidnog djela koji bi mogao smanjiti afinitet prema polarnoj stacionarnoj fazi prilikom obogaćivanja ekstrakcijom na čvrstoj fazi.

Promjena koncentracije tripsina nije utjecala na intenzitet signala, dok je povećanje udjela ACN-a u koraku obogaćivanja pojačalo intenzitet signala glikozilacijskog mjesta od interesa. Ove promjene u protokolu (osim prilikom korištenja pet puta veće koncentracije tripsina od standardne) smanjile su preciznost u odnosu na standardnu metodu, što u konačnici nije pogodno za optimizaciju metode. U budućem radu potrebno je ispitati druge stacionarne faze koje bi bile prikladne za korištenje prilikom HILIC-SPE ili neke druge metode obogaćivanja koje bi osim povećanje intenziteta signala glikozilacijskog mjesta III zadovoljile uvjete preciznosti metode u odnosu na standardni postupak.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 7 grafičkih prikaza, 6 tablica i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: alfa-1 kiseli glikoprotein, N-glikozilacija, HILIC-SPE, LC-MS, optimizacija

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

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

**Dr. sc. Olga Gornik Kljaić**, redovna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

## 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

### Optimization of High-Throughput method for N-Glycosylation Analysis of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein

**Maja Ukalović**

#### SUMMARY

Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) is an acute-phase plasma protein with high carbohydrate content attached in the form of five N-linked complex glycans. Altered glycosylation of AGP occurs in many physiological and pathophysiological conditions. Recently, a cost-effective method for a high-throughput detailed AGP N-glycosylation profiling was developed, which provides site-specific glycosylation information from a small volume of blood serum or plasma. Using the method, it was demonstrated that N-glycan profile of AGP is stable in a healthy individual and that changes in N-glycan profile could help distinguish individuals who are at risk of type 2 diabetes.

AGP is enriched from blood plasma by acid precipitation of seromucoid fraction, after which it undergoes reduction, alkylation and trypsinization to be further enriched using solid-phase extraction (HILIC-SPE). Glycopeptides obtained by this process are then analysed by reversed-phase liquid chromatography paired with electrospray ionization-MS. During the implementation of the method on large cohorts, reduced intensity of glycosylation site III signal was observed in a certain number of measurements.

To determine the cause of irregularity, influence of trypsin concentration and increased concentration of acetonitrile in HILIC mobile phase on intensity of glycosylation site III signal was evaluated. The effect of trypsin was evaluated due to AGP being resistant to conventional tryptic digestion, whereas a higher concentration of ACN was investigated because of an extensive amount of hydrophobic peptide moiety of glycosylation site III which could lower the affinity towards the stationary phase in HILIC-SPE enrichment.

The change in trypsin concentration didn't affect the intensity of the signal, whereas a higher concentration of ACN has enhanced the signal intensity of the glycosylation site of interest. These changes in the protocol (except for the trypsin concentration that was five times higher than the standard) have resulted in decreased precision compared to the standard method. This decrease is not suitable for the method optimisation. In further research, other stationary phases that could be suitable for HILIC-SPE enrichment or different enrichment methods should be tested in order to find a method that would also meet the precision criteria while increasing the signal intensity of the glycosylation site III.

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

Thesis includes: 36 pages, 7 figures, 6 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: alpha-1 acid glycoprotein, N-glycosylation, HILIC-SPE, LC-MS, optimization

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

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.** Senior Teaching Assistant – Postdoctoral Researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Olga Gornik Kljaić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.

