

N-glikom i genom u razumijevanju šećerne bolesti tipa 1

Rudman, Najda

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:163:354418>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Najda Rudman

N-GLIKOM I GENOM U RAZUMIJEVANJU ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Najda Rudman

N-GLIKOM I GENOM U RAZUMIJEVANJU ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Najda Rudman

***N*-GLYCOME AND GENOME IN
COMPREHENSION OF TYPE 1 DIABETES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Prof Olga Gornik Kljaić, PhD

Zagreb, 2022.

INFORMACIJE O MENTORU

Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Olge Gornik Kljaić, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s dijabetološkim centrima u Danskoj (Steno Diabetes Center Copenhagen, Copenhagen Diabetes Research Center) i Australiji (Centre for Diabetes Research, Harry Perkins Institute for Medical Research) te Sveučilištem u Kopenhagenu (Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen) i Sveučilištem u Melbourneu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran projektom Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-7769).

ZAHVALE

Najljepše se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici, prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić. Draga Olga, hvala ti što sam dobila priliku svoju znanstvenu karijeru graditi uz tebe, nisam mogla poželjati bolju mentoricu! Hvala ti što si osoba koja otvorenog uma i srca radi ovaj posao te svoj optimizam i strast prema znanosti prenosi na sve oko sebe! Hvala ti što si uvijek bila dostupna! Hvala ti što vodiš, ali ujedno i hodaš uz ljude koje vodiš!

Najljepše se zahvaljujem prof. dr. sc. Gordanu Laucu na cjelokupnoj suradnji, na vjerovanju te na pruženoj podršci i prilikama zbog kojih sam danas tu gdje jesam.

Najljepše se zahvaljujem svim svojim dragim kolegama sa Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju. Draga Jerka, Sanja, Sandra, Gordana i dragi Rajko hvala vam na bezbroj divnih druženja, na obiteljskoj atmosferi, na tome što sada znam što znači ne raditi niti jedan dan u životu kada imaš priliku raditi ono što voliš i tamo gdje voliš. Hvala vam dragi moje kolege!

Najljepše se zahvaljujem Tamari, Tomi, Domagoju, Ani, Marku, Ivoni, Dinku, Mateju i Branimiru što su uz mene bili na ovom putovanju i što su sa mnom popili bezbroj bitnih kava i razglabali o bezbroj nebitnih situacija. Tamara i Toma, hvala vam što ste me uveli u ovo područje, uz vas se nikad nisam osjećala kao netko novi ili u nepoznatom području, hvala vam što ste kao i Olga otvorenog uma i srca!

Najljepše se zahvaljujem svim svojim dragim kolegama iz Genosa na prijateljskoj i profesionalnoj suradnji, što sam mogla učiti od vas te uz vas.

Najljepše se zahvaljujem prof. dr. sc. Igoru Rudanu što me raširenih ruku primio u svoj tim na Sveučilištu u Edinburghu. Hvala Vam na prijateljstvu i profesionalnim savjetima! Hvala Luciji koja mi je otvorila vrata raznih instituta Sveučilišta u Edinburghu. Draga Lucija, hvala što si me učila programiranju, a nakon obavljenog posla planinarenju, penjanju po stijenama i gdje se pije najbolja kava u Edinburghu! Svaki tim bi trebao imati jednu Luciju!

Dear Simran, Professor Morahan and Professor Pociot, thank you for the very successful collaboration! This has been a wonderful journey!

Hvala mojim roditeljima na beskrajnoj potpori i ljubavi. Hvala što ste me uvijek učili da se trud isplati, uz vas je i nemoguće uvijek bilo moguće. Hvala mojim sestrama na životnim raspravama, vi ste mi bile najbolja priprema za ovo putovanje te najdraži suputnici (uz Maria i Luku ;d).

Na kraju, neizmjereno hvala mom suprugu Mariu i mom sinu Luki, vi me uvijek podsjetite koliko vrijedim i s vama je moguće ići samo prema naprijed.

Vaša Najda

SAŽETAK

Šećerna bolest tipa 1 je kronična autoimuna bolest čiji uzrok nastanka još uvijek nije razjašnjen. *N*-glikozilacija proteina plazme povezana je s komplikacijama šećerne bolesti tipa 1, dok je uloga ove ko- i post-translacijske modifikacije proteina u nastanku same bolesti neistražena. S razvojem šećerne bolesti tipa 1 do sada je povezano više od 50 gena, među kojima su i glikoziltransferazni geni. Glavni ciljevi ovog istraživanja su identifikacija *N*-glikana ukupnih proteina plazme i IgG-a karakterističnih za ranu fazu šećerne bolesti tipa 1 te identifikacija gena kojima su *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 regulirani. Istraživanje je uključilo 1917 djece i adolescenata (0,6 – 19,1 godina) čiji su uzorci krvne plazme prikupljeni unutar tri mjeseca od dijagnoze šećerne bolesti tipa 1 kroz Danski registar dječjeg i adolescentnog dijabetesa, kao i 265 zdravih srodnika. *N*-glikani ukupnih proteina plazme i IgG-a analizirani su upotrebom tekućinske kromatografije, dok je genotipizacija 1105 djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 provedena pomoću komercijalnog čipa (ImmunoChip, Illumina Infinium) koji sadrži 183 546 polimorfizama pojedinačnih nukleotida važnih za razvoj bolesti posredovanih imunološkim sustavom. Nakon navedenih analiza provedena je genomska asocijacijska studija. Ovo istraživanje pokazalo je da je šećerna bolest tipa 1 povezana s porastom oligomanoznih *N*-glikana i *N*-glikana s račvujućim *N*-acetilglukozaminom te padom monogalaktoziliranih *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a, kao i s porastom disijaliniziranih *N*-glikana IgG-a. Modeli temeljeni na *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a su pokazali jako dobru diskriminacijsku moć između djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika s AUC > 0,9. Tri prethodno identificirana *N*-glikozilacijska lokusa (*MGAT3*, *MGAT5* i *ST6GALI*) povezana su s razinama *N*-glikana u ovom istraživanju, kao i *C3* lokus na kromosomu 19 koji do sada nije bio povezan s *N*-glikozilacijom. *C3* kodira glavni protein sustava komplementa te su dva *C3* SNP-a (sinonimni i nesinonimni) povezana s razinama Man9 glikana ukupnih plazmatskih proteina. S obzirom da se takav Man9 glikan nalazi na *C3* domeni uključenoj u interakciju patogena i *C3* proteina, promjene u razinama Man9 mogle bi potencijalno interferirati s aktivacijom sustava komplementa u šećernoj bolesti tipa 1. Navedena otkrića pružaju temelje za daljnja istraživanja mehanizama koji reguliraju *N*-glikozilaciju u šećernoj bolesti tipa 1.

KLJUČNE RIJEČI

N-glikani, novodijagnosticirana šećerna bolest tipa 1, prediktivni model, ukupni plazmatski proteini, imunoglobulin G, genomska asocijacijska studija

SUMMARY

Introduction: Type 1 diabetes is a chronic autoimmune disease with an unrevealed cause and is marked by a massive loss and damage of the insulin-producing pancreatic beta-cells. Number of incident cases has been increasing at an annual rate of around 3%. Even though detection of islet autoantibodies can uncover the disease years before clinical diagnosis, it is expensive to continuously monitor their levels, burdensome in young children and is not adequately sensitive nor specific in adults. Since prompt identification of type 1 diabetes can decrease morbidity and aid prevention, development of risk assessment tools is an imperative and many trials, initiatives and networks have been initiated with this aim. Over 50 susceptibility loci have been associated with type 1 diabetes development; of these, the most important one is the major histocompatibility complex. At the same time, a number of different studies also discuss the role of environmental factors in type 1 diabetes development. The correlation of disease incidence with geographical latitude (north-south gradient) has been reported. In addition, differing rates of type 1 diabetes incidence in neighboring populations with the same type 1 diabetes-predisposing *HLA-DQ* genotype frequency have been recorded. Even though a newly established genetic risk score demonstrated good discriminative values, additional biomarkers that could aid the risk assessment would be of utmost importance.

Plasma proteome *N*-glycosylation represents a complex and a tightly regulated co- and post-translational protein modification with different oligosaccharide residues, which impacts the protein function in many instances. Antibodies of the IgG isotype with sialic acid attached as part of their *N*-glycans act as an anti-inflammatory agents instead of pro-inflammatory ones, whereas the removal of core fucose increases their ability to destroy target cells through antibody-dependent cellular cytotoxicity. It is important to stress that glycosylation should not be confused with glycation, which represents a non-enzymatic reaction, such as described for glycated haemoglobin. It has been demonstrated that human plasma *N*-glycome shows remarkably low intra-individual differences under physiological conditions, whereas it is very sensitive to different pathological processes. This characteristic is very important in regards to considering *N*-glycans as diagnostic and prognostic markers. Diabetes classification can be challenging since it depends upon circumstances at the time of diagnosis; e.g. islet autoantibodies have been determined in some individuals diagnosed with type 2 diabetes. It has been shown previously that differentiation between different diabetes types and more so identification of individuals at an increased risk of type 2 diabetes development is possible based on their *N*-glycan profiles. Also, *N*-glycosylation profiling may have advantages relative

to antibody testing in regards to decrease of cost, which may even be additionally decreased upon identification of diagnostically relevant *N*-glycan structures.

In the course of eukaryotic protein *N*-glycosylation in the endoplasmic reticulum block of 14 sugars is cotranslationally relocated to specific asparagine residues, and subsequently modified in the Golgi apparatus. The outcome of this are a myriad of modifications, e.g. branching, galactosylation, core-fucosylation, sialylation etc. Under physiological conditions approximately 3% of glucose is exploited in the hexosamine-biosynthesis pathway (HBP), during which the synthesis of donor molecule for the process of *N*-glycosylation, uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), takes place. The level of glycan branching which is characteristic of glycan complexity (biantennary, triantennary, and tetraantennary structures) is dependent upon the UDP-GlcNAc availability. Increased glucose flux through HBP leads to increased amounts of UDP-GlcNAc and accordingly highly branched glycans. Proportions of complex highly branched serum *N*-glycans have been increased in the adult type 1 diabetes patients with unregulated blood glucose. Also, increased plasma levels of mannose-binding lectin (MBL), which initiates one of the complement pathways once bound to specific sugar residues, have been reported for the type 1 diabetes population. Altered *N*-glycosylation of various T-cell proteins has been implicated in the onset of type 1 diabetes.

Genome-wide association studies (GWASs) of plasma proteome and IgG *N*-glycosylation, in addition to known glycosyltransferase loci, lead to identification of loci containing genes not previously associated with protein glycosylation. Several of these genes (e.g. *IKZF1* and *BACH2*) have formerly been associated with type 1 diabetes. A glycosyltransferase gene, *FUT2*, has been identified as one of the causal candidate genes in type 1 diabetes. Additionally, *MGAT5* and *MGAT1* glycosyltransferase loci have been implicated in type 1 diabetes through its impact on *N*-glycan branching and consequent T-cell activation. Protein glycosylation is a complex process under regulation of a huge network of genes, many of which have still not been identified in humans, albeit they have in a comprehensive study of mouse glycans.

Hence, the present study was undertaken to: (1) determine plasma *N*-glycans representative of the type 1 diabetes onset by comparison of children with type 1 diabetes to their healthy siblings and to *N*-glycan profile formerly determined in adult type 1 diabetes patients with unregulated blood glucose, (2) determine age at diagnosis and gender associated changes of plasma *N*-glycome in children and adolescents with type 1 diabetes and (3) to gain the knowledge of genes regulating plasma and IgG *N*-glycosylation changes accompanying onset of type 1 diabetes. This is the first study of plasma *N*-glycosylation changes at the early phase of type 1 diabetes

and first to correlate genome and *N*-glycome data in type 1 diabetes cases. The hypothesis of the study was that plasma proteome and IgG *N*-glycosylation differs between children newly diagnosed with type 1 diabetes and their healthy siblings and thus could contribute to the type 1 diabetes risk assessment.

Materials and methods: In the primary study plasma samples from 1,917 children and adolescents with type 1 diabetes (median age of 10.2, age range 0.6-19.1 years) were analysed. Samples were obtained within three months of type 1 diabetes diagnosis through the Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes (DanDiabKids). Four age categories representing various ages at diagnosis of type 1 diabetes were defined, namely the very young children, the pre-pubertal children, the pubertal children, and the post-pubertal children. The study population was divided based on gender and over these four age categories. Pubertal status was defined based on age, and different cut-offs were used for female and male participants. Titers of autoantibodies were available for 300 study participants and comprised titers of islet autoantibodies against arginine zinc transporter 8 (ZnT8R), tryptophan zinc transporter 8 (ZnT8W), glutamic acid decarboxylase (GAD), and insulinoma-associated protein 2 (IA-2). Plasma samples from 244 unaffected siblings (median age of 11, age range 2-23 years) were also obtained through the DanDiabKids registry in the follow-up family-based study, which included in total 188 families (samples from children with type 1 diabetes were reanalysed).

In order to separate *N*-glycans, hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography (HILIC-UPLC) on Waters Acuity UPLC instrument was applied. In addition to directly measured chromatographic peaks, derived traits representing specific glycosylation characteristics were also computed. General linear modelling was used to determine association of *N*-glycan proportions with titers and number of different autoantibodies (against IA2, GAD, ZnT8R, ZnT8W), and with gender and age at diagnosis of type 1 diabetes. Logistic mixed model elastic net regression was used to build a disease predictive model and a 10-fold cross validation was used for evaluation. 183,546 single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the commercially available ImmunoChip that covers all major autoimmune diseases were determined for 1105 study participants. In total, 177,022 markers passed the initial sample quality control comprising sample call rate, and concordance check of recorded gender versus genotyped one. SNPs with a genotyping call rate <95% (5% missing) and a minor allele frequency (MAF) <5% were further removed in additional quality control checks. The genotype quality control filtering criteria resulted in 108,428 SNPs retained in the analysis. The mean

genotyping rate in the subjects was 99%. Since disease association and population structure can result in deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and to avoid missing the true association signals, the SNPs were not filtered for deviations from the HWE. Commercial human Complement C3 ELISA Kit (ab108822) was used to measure C3 absorbance on a microplate reader at 450 nm. General linear modelling was used to test correlation between C3 and Man9. A further 455 samples of affected and unaffected children from the registry was used to validate significant SNPs revealed in the discovery phase. Kompetitive Allele Specific PCR (KASP™, LGC Genomics, UK) was used for genotyping of the validation cohort. Linear modelling and additive model for SNPs was used to analyse associations between glycan proportions and individual SNPs.

Results: This study showed that increase in the proportion of plasma and IgG high-mannose and bisecting GlcNAc structures, a decrease in monogalactosylation, and an increase in IgG disialylation is characteristic of the early phase of type 1 diabetes. ZnT8R autoantibody titers correlated with higher IgG digalactosylated glycan with bisecting GlcNAc. Elevation of highly branched plasma *N*-glycan proportions accompanied an increase in the number of different autoantibodies (which represents a better predictor of type 1 diabetes development in comparison to autoantibody titers). Upon onset of puberty most of the significant *N*-glycosylation differences between the genders were observed, which is concordant with previous studies. Still, derived traits depicting plasma and IgG bisecting structures, plasma high-mannose structures, and IgG core fucose differed between genders even before puberty. A notable discriminative power between children with type 1 diabetes and their healthy siblings was yielded with models including age, gender, and *N*-glycans with AUCs of 0.915 and 0.869 for addition of plasma and IgG *N*-glycans, respectively.

Three of the previously established *N*-glycosylation loci (*MGAT3*, *MGAT5*, and *ST6GALI*) were significantly associated with *N*-glycosylation in the discovery cohort, as well as a novel locus on chromosome 19 encoding the C3, the pivotal protein of the complement activation pathway. Two SNPs in high LD with each other ($R^2=0.85$) within the exons of the *C3* were associated with the oligomannose Man9 glycan of total plasma proteins, a nonsynonymous rs1047286 causing p.Pro314Leu and synonymous rs2230203. Measurement of the C3 protein concentration showed that 16% of the Man9 plasma levels was attributed to linear increase in C3 concentrations. In the follow-up cohort, three genetic associations were replicated (*C3*, *MGAT3-SYNGR1-RPL3*, and *ST6GALI*).

Conclusion: Significant changes of plasma proteome and IgG *N*-glycosylation characteristic of the early phase of type 1 diabetes have been identified, and these changes are different from those previously described in adult type 1 diabetes patients with diabetes complications. A type 1 diabetes risk-predictive model was built based on *N*-glycan profiles that could be valuable in risk assessment. Increasing the efficacy of models to determine individuals at risk of disease development would be a noticeable benefit, and *N*-glycan biomarkers may be useful in determining individuals at an increased risk for type 1 diabetes-prevention studies.

Within a population of 1105 new-onset type 1 diabetes cases, this study corroborated the association of plasma protein and IgG *N*-glycosylation with previously identified loci, and revealed a new genetic association of the *C3* gene with *N*-glycosylation, namely with the Man9 glycan of total plasma proteins. Investigating gene-specific polymorphisms and their associated *N*-glycosylation alterations could expose an underlying molecular mechanism still unidentified for the majority of type 1 diabetes-risk associated SNPs. Oligomannose Man9 glycan is located on the domain implicated in pathogen binding on the C3 protein, therefore the identified *N*-glycan alterations might possibly be implicated in the complement activation in type 1 diabetes.

KEYWORDS

N-glycans, early phase of type 1 diabetes, prediction models, total plasma proteins, IgG, genetic association study

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. SVRHA I CILJ RADA..... | 4 |
| 1.2. LITERATURNI PREGLED..... | 5 |
| 1.2.1. Genska podloga u razvoju šećerne bolesti tipa 1..... | 5 |
| 1.2.2. Okolišni čimbenici u razvoju šećerne bolesti tipa 1..... | 8 |
| 1.2.3. N-glikozilacija proteina i šećerna bolest..... | 8 |
| 1.2.4. Heksozamin-biosintetski put i šećerna bolest..... | 10 |
| 1.2.5. N-glikozilacijske promjene u šećernoj bolesti tipa 1..... | 14 |
| 1.2.6. N-glikozilacija i komplikacije šećerne bolesti tipa 1..... | 15 |
| 1.2.7. Korelacija glikoma i genoma te povezanost sa šećernom bolesti tipa 1..... | 16 |
| 2. ISPITANICI, MATERIJALI I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA..... | 17 |
| 2.1. ISPITANICI..... | 18 |
| 2.1.1. Prvotno istraživanje..... | 18 |
| 2.1.2. Validacijsko istraživanje..... | 19 |
| 2.1.3. Obiteljsko istraživanje..... | 19 |
| 2.2. MATERIJALI..... | 19 |
| 2.2.1. Anorganske kemikalije..... | 19 |
| 2.2.2. Organske kemikalije..... | 19 |
| 2.2.3. Enzimi..... | 19 |
| 2.2.4. Otopine i puferi..... | 20 |
| 2.2.5. Instrumenti..... | 22 |
| 2.2.6. Potrošni materijal..... | 22 |
| 2.2.7. Kolone za kromatografiju, pločica za izolaciju IgG-a, filteri..... | 22 |
| 2.3. ANALIZA N-GLIKANA..... | 23 |
| 2.3.1. Izolacija IgG-a..... | 23 |
| 2.3.2. Deglikozilacija, označavanje te pročišćavanje N-glikana..... | 24 |
| 2.3.3. Tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti..... | 24 |
| 2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KOMPONENTE C3 SUSTAVA KOMPLEMENTA..... | 34 |
| 2.5. GENOMSKA ASOCIJACIJSKA STUDIJA..... | 34 |
| 2.6. STATISTIČKA ANALIZA N-GLIKANA..... | 35 |
| 3. REZULTATI..... | 38 |
| 3.1. N-glikozilacija u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1..... | 39 |
| 3.2. N-glikozilacijske razlike između spolova i korelacija s dobi dijagnoze šećerne bolesti tipa 1 | 43 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.3. | Korelacija N-glikozilacije i autoantitijela u šećernoj bolesti tipa 1 | 46 |
| 3.4. | N-glikozilacijski diskriminacijski model novodijagnosticirane šećerne bolesti tipa 1 50 | |
| 3.5. | Korelacija genoma i N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1 | 52 |
| 3.6. | Identifikacija novog gena povezanog s razinama N-glikana ukupnih plazmatskih proteina | 57 |
| 3.7. | IgG N-glikani koreliraju s poznatim N-glikoziltransferaznim lokusima | 57 |
| 3.8. | Validacijska kohorta..... | 59 |
| 4. | RASPRAVA..... | 61 |
| 4.1. | N-glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kod djece i adolescenata s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika | 62 |
| 4.2. | Korelacija genoma i N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kod djece i adolescenata s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika | 66 |
| 4.3. | Korelacija C3 gena i oligomanoznog Man9 glikana s ukupnih plazmatskih proteina u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1 | 66 |
| 4.4. | Korelacija IgG N-glikana s MGAT3 N-glikoziltransferaznim lokusom u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1 | 67 |
| 4.5. | Korelacija N-glikana ukupnih plazmatskih proteina s MGAT5 N- glikoziltransferaznim lokusom u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1 | 68 |
| 4.6. | Korelacija N-glikana IgG-a sa sialiltransferazom ST6GAL1 u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1 | 69 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 71 |
| 6. | POPIS LITERATURE | 75 |
| 7. | ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH DJELA | 90 |

KRATICE

2-AB = 2-aminobenzamid

2-PB = 2-pikolin boran

ADCC = stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

AGP = α -1-kiseli glikoprotein

AUC = površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*)

CI = interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

C3 = gen za komponentu komplementa C3

GAD = dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase*)

GlcNAc = *N*-acetilglukozamin

GP = glikanski pik

GWAS = cjelogenomska asocijacijska studija (engl. *genome-wide association study*)

HbA1c = glikirani hemoglobin

HBP = heksozamin-biosintetski put

HILIC = tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HWE = princip Hardy-Weinbergove ravnoteže (engl. *Hardy-Weinberg equilibrium*)

IA-2A = autoantitijela na tirozin-fosfatazu (engl. *insulinoma-associated protein 2 autoantibodies*)

IgG = imunoglobulin G

LD = neravnoteža vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*)

MAF = frekvencija rijetkog alela (engl. *minor allele frequency*)

MBL = lektin koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*)

MGAT3 = engl. *mannosyl (β -1,4-)-glycoprotein β -1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase*

MGAT5 = engl. *α -1,6-mannosylglycoprotein 6- β -*N*-acetylglucosaminyltransferase*

MODY = šećerna bolest mladih koja se javlja u odrasloj dobi (engl. *maturity-onset diabetes of the young*)

PBS = fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PNGaza F = N-glikozidaza F

ROC = engl. *receiver operating characteristic*

SDS = natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*)

SE = standardna pogreška (engl. *standard error*)

SNP = polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

SPE = ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*)

TRIS = tris(hidroksimetil)aminometan

ST6GAL1 = engl. *ST6 β-galactoside α-2,6-sialyltransferase 1*

SYNGR1 = sinaptogirin 1

UPLC = tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*)

UDP-GlcNAc = uridin difosfat-N-acetilglukozamin

ZnT8R = arginin cink transporter 8

ZnT8W = triptofan cink transporter 8

1. UVOD

Šećerna bolest tipa 1, najučestaliji oblik šećerne bolesti kod djece koji ujedno čini i oko 5 % svih slučajeva šećerne bolesti, je kronična bolest koju karakterizira autoimuna destrukcija β -stanica Langerhansovih otočića gušterače koje luče inzulin te prisutnost jednog ili više autoantitijela (1). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je godišnja stopa rasta broja djece i adolescenata dijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 iznosila oko 3 % (2). Preko 50 genskih lokusa do sada je povezano s razvojem ove bolesti (3), (4), pri čemu se najveći genski rizik povezuje s genima ljudskog leukocitnog antigena (*HLA*, engl. *human leukocyte antigen complex*), odnosno glavnog sustava tkivne podudarnosti (*MHC*, engl. *major histocompatibility complex*) čovjeka (5). Usprkos identifikaciji poligenske osnove, rezultati velikog broja istraživanja ukazuju na važnost okolišnih čimbenika u razvoju ove bolesti (6-8). Iako određivanje autoantitijela gušterače može ukazati na potencijalni razvoj bolesti godinama prije kliničke dijagnoze, njihovo kontinuirano mjerenje je skupo, teže izvedivo kod mlađih ispitanika te nije dovoljno osjetljivo niti specifično kod odraslih ispitanika (9), (10). S obzirom da pravovremeno otkrivanje povišenog rizika za razvoj šećerne bolesti tipa 1 može smanjiti morbiditet i omogućiti prevenciju, razvoj novih modela/alatki koji bi omogućili navedeno je od izuzetne važnosti te su s tim ciljem uspostavljene razne inicijative (11). Iako je nedavno identificirani genski izračun rizika dobre diskriminacijske moći (12), otkrivanje dodatnih biljega šećerne bolesti tipa 1 koji bi mogli pridonijeti određivanju rizika je od iznimne važnosti.

N-glikozilacija je strogo regulirani i izuzetno kompleksni enzimski proces pomoću kojeg se različite oligosaharidne strukture (glikani) dodaju na proteine (13) te koji ima značajan utjecaj na samu funkciju proteina (14). Glikozilacijske promjene opisane su u različitim bolestima i glikani se sve više razmatraju kao potencijalni biomarkeri (15-20). Glikom ukupnih proteina plazme, kao i glikom imunoglobulina G (IgG), se pokazao izuzetno stabilnim unutar pojedinca pod fiziološkim uvjetima (21), (22), a u isto vrijeme izuzetno osjetljiv na različita patofiziološka stanja, što podupire potencijalni dijagnostički i prognostički potencijal glikana kao biomarkera (15), (17), (20). Klasifikacija dijabetesa može biti zahtjevna s obzirom da ovisi o uvjetima u trenutku dijagnoze; npr. kod nekih ispitanika dijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 2 potvrđena su autoantitijela gušterače (23). Razlikovanje između tipova šećerne bolesti te čak i identifikacija pojedinaca s povišenim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 2 moguća je na temelju *N*-glikanskog profila (17), (18), (20), (24). Određivanje *N*-glikanskog profila također se može pokazati kao prednost u usporedbi s određivanjem autoantitijela zbog smanjenja troškova, što može biti i dodatno optimizirano u trenutku pronalaska dijagnostički značajnih *N*-glikanskih struktura.

Cjelogenomske asocijacijske studije (GWAS, engl. *genome-wide association study*) glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a su uz identifikaciju različitih glikoziltransferaza, omogućile i identifikaciju gena koji do tada nisu bili povezani s procesom glikozilacije (25-31). Neki od ovih gena (npr. *IKZF1* i *BACH2*) su povezani s različitim bolestima uključujući šećernu bolest tipa 1 (29). Nadalje, glikoziltransferazni gen za fukoziltransferazu 2 (*FUT2*, engl. *fucosyltransferase 2*) identificiran je kao jedan od potencijalnih uzročnih gena šećerne bolesti tipa 1 (4). Također, gen za *N*-acetilglukozaminiltransferazu V (*MGAT5*, engl. *α -1,6-mannosylglycoprotein 6- β -*N*-acetylglucosaminyltransferase*) povezuje se s patogeneзом šećerne bolesti tipa 1 kroz utjecaj na razgranatost *N*-glikanskih struktura na limfocitima T te njihovu posljedičnu aktivaciju (15). *N*-glikozilacija proteina je regulirana kompleksnom mrežom gena od kojih mnogi još uvijek nisu identificirani kod čovjeka (32), unatoč identifikaciji u istraživanjima mišjeg glikoma (33). Točan uzrok nastanka šećerne bolesti tipa 1 još nije razjašnjen, međutim, očigledno je da kombinacija genskih i okolišnih čimbenika igra veliku ulogu u etiologiji ove bolesti te je stoga nužna njihova daljnja identifikacija i razumijevanje.

1.1. SVRHA I CILJ RADA

Ovo istraživanje obuhvatilo je djecu i adolescente čiji su uzorci krvne plazme uzeti unutar tri mjeseca od dijagnoze šećerne bolesti tipa 1 kroz Danski registar dječjeg i adolescentnog dijabetesa (engl. *Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes/DanDiabKids*) (34). Dosadašnja istraživanja *N*-glikozilacijskih promjena ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a u šećernoj bolesti tipa 1 su provedena na odraslim ispitanicima i povezala su *N*-glikozilacijske promjene s komplikacijama bolesti (16). Imajući na umu manju pojavnost komorbiditeta kod mlađe populacije u usporedbi s odraslim ispitanicima, moguće je preciznije istraživanje promjena specifičnih za šećernu bolest tipa 1. Također, za razliku od dosadašnjih istraživanja, korištenjem uzoraka ispitanika uzetih pri početku bolesti moguće je istraživanje promjena vezanih uz sam početak bolesti te promjena koje bi mogle ukazati na povećani rizik za razvoj ove bolesti. Nadalje, ovo je prvo istraživanje korelacije genoma i *N*-glikoma u šećernoj bolesti tipa 1.

Ciljevi ovog istraživanja su: (1) identifikacija *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a karakterističnih za ranu fazu šećerne bolesti tipa 1 na temelju usporedbe *N*-glikanskog profila novodijagnosticirane djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika, (2) usporedba dobivenih rezultata s *N*-glikanskim profilom prethodno opisanim kod odraslih bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 i nereguliranom glikemijom, (3) identifikacija *N*-glikozilacijskih promjena ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a ovisnih o dobi i spolu kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 te (4) identifikacija gena kojima su *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 regulirani. Očekivani znanstveni doprinos ovog istraživanja je pronalaženje novog modela/alatke za identifikaciju djece s povišenim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 1 na temelju *N*-glikozilacijskih i genskih podataka. Navedeno će predložiti i nove potencijalne mehanizme uključene u nastanak šećerne bolesti tipa 1, što bi doprinijelo razumijevanju razvoja šećerne bolesti tipa 1 te predložiti nove potencijalne terapijske mete.

1.2. LITERATURNI PREGLED

1.2.1. Genska podloga u razvoju šećerne bolesti tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 dijagnosticira se nakon nastupa hiperglikemije (1), uz karakterističnu pojavu autoimunog procesa unutar gušterače (35). Autoimuni proces definiran je prisutnošću autoantitijela na antigene otočića gušterače te obično započinje jako rano s vrhom incidencije u drugoj godini života (36-38). Pojava dva ili više autoantitijela gušterače obilježava trenutak od kojeg 70 % djece napreduje do pojave šećerne bolesti tipa 1 kroz sljedećih 10 godina (39). Predložena je podjela šećerne bolesti tipa 1 na tri razine: (1) asimptomatska faza s prisutnim autoantitijelima i normoglikemijom, (2) asimptomatska faza s prisutnim autoantitijelima i disglukemijom i (3) simptomatska faza s prisutnim autoantitijelima i disglukemijom (35). Preko 50 genskih lokusa do sada je povezano s razvojem ove bolesti (3), pri čemu se najveći genski rizik povezuje s *HLA* regijom (5). Nadalje, povećan rizik za razvoj ove bolesti najčešće se povezuje s polimorfizmima unutar gena za inzulin (*INS*, engl. *insulin gene*), gena za protein tirozin fosfatazu 22 (*PTPN22*, engl. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) te gena za receptor za interleukin 2 (*IL2RA*, engl. *interleukin 2 receptor subunit α*) (3). Rizik za razvoj šećerne bolesti tipa 1 raste kod najbližih srodnika (40), što ukazuje na važnost uloge genske podloge u razvoju ove bolesti.

U svrhu identifikacije genske podloge šećerne bolesti tipa 1 korištena su dva različita pristupa. Djeca rođena u obiteljima s povijesti šećerne bolesti tipa 1 imaju različit rizik razvoja šećerne bolesti tipa 1 ovisno je li bolest prisutna kod majke (2 – 4 %), oca (5 – 8 %), oba roditelja (> 30 %), brata/sestre (5 %), dizigotnih blizanaca (8 %) ili monozigotnih blizanaca (50 % životni rizik od čega 30 % unutar 10 godina od dijagnoze kod blizanca) (41-44). Prvi pristup uključuje praćenje novorođene djece s obiteljskom povijesti šećerne bolesti tipa 1 (45). S obzirom da je šećerna bolest tipa 1 značajno povezana s *HLA-DR3-DQ2* i *HLA-DR4-DQ8* haplotipovima (pojedinačno ili u kombinaciji) (46), drugi pristup uključuje praćenje novorođene djece s povećanim genskim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 1 (47). Praćenje djece s povećanim genskim rizikom razvoja ove bolesti dovelo je do identifikacije povezanosti razvoja dva ili više autoantitijela gušterače s većom vjerojatnosti kasnijeg dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 (39).

Šećernu bolest tipa 1 karakterizira pojava autoantitijela na antigene otočića gušterače jako rano u djetinjstvu, pri čemu je prvo autoantitijelo najčešće na inzulin (IAA, engl. *insulin autoantibodies*) ili na dekarboksilazu glutaminske kiseline (GADA, engl. *glutamic acid decarboxylase autoantibodies*) ili se pak oba antitijela pojavljuju istovremeno (37), (38).

Navedena autoantitijela, skupa s autoantitijelima na tirozin-fosfatazu (IA-2A, engl. *insulinoma-associated protein 2 autoantibodies*) i autoantitijelima na cink transporter 8 (ZnT8A, engl. *zinc transporter 8 autoantibodies*) su važni prediktori razvoja šećerne bolesti tipa 1 s obzirom da je razvoj prvog autoantitijela te naknadni razvoj drugog, trećeg i četvrtog autoantitijela povezan s kliničkim nastupom šećerne bolesti tipa 1 kod svih pacijenata praćenih kroz 20 godina (39). Autoantitijela gušterače povezana su s *HLA-DR-DQ* haplotipovima (48), (49). Kod djece s *HLA-DR3-DQ2* haplotipom prvo autoantitijelo je najčešće GADA (37), (38), dok je kod djece s *HLA-DR4-DQ8* haplotipom češće prisutan IAA kao prvo autoantitijelo (37), (38), (50). Istraživanja ukazuju na potencijalnu ulogu i drugih molekula HLA razreda II u autoimunom procesu (51). Polimorfizmi *INS* gena pridonose genskoj etiologiji šećerne bolesti tipa 1 posebice kod djece s *HLA-DR4-DQ8* haplotipom, s obzirom da su frekvencije *INS* rs689 rizičnog genotipa AA povišene kod djece s IAA (38). *PTPN22* također pridonosi riziku razvoja IAA kao prvog autoantitijela, međutim ne kao i drugog (52). Polimorfizam *CTLA4* gena povezan je s povišenim rizikom za GADA, međutim ne i za IAA (37). Navedene asocijacije su također povezane s *HLA* genotipom djece (52).

Zahvaljajući izvanrednom napretku na području genetike identificirano je više od 50 genskih lokusa koji potencijalno pridonose razvoju šećerne bolesti tipa 1 (4), (53). Osim *HLA* regije na kromosomu 6p21 koja doprinosi otprilike 50 % od ukupnog genskog rizika, ostali lokusi identificirani kroz GWAS-e ispoljavaju male pojedinačne efekte na ukupni genski rizik progresije do šećerne bolesti tipa 1 te je za većinu identificiranih lokusa molekularni mehanizam iza ovih asocijacija nepoznat (54). Podaci prikupljeni kroz meta analize GWAS-a ukazuju da značajne asocijacije mogu biti tagirane s otprilike 100 polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) te da u većini slučajeva tag SNP-ovi (reprezentativni polimorfizmi) nisu uzročne varijante (4), (46), (53). Rangiranje SNP-ova s obzirom na njihove vjerojatne funkcije ukazuje da bi kod nekih kandidatskih uzročnih gena (*IL27*, *BAD*, *CD69*, *PRKCQ*, *CLEC16A*, *ERBB3* i *CTSH*) glavni SNP mogao biti uzročni ili u visokoj neravnoteži vezanosti gena (LD, engl. *linkage disequilibrium*) s uzročnim varijantama te da bi ispitivanje učinka ovih SNP-ova na šećernu bolest tipa 1 moglo biti jednostavno (46).

IL27 kodira citokin interleukin 27, člana interleukin 12-citokinske obitelji (55). IL-27 utječe na diferencijaciju i aktivnost limfocita T te su proupalni, ali i protuupalni učinci IL-27, opisani u autoimunim bolestima (56). Istraživanja na mišjim modelima šećerne bolesti tipa 1 podupiru kompleksnu imunoregulatornu ulogu IL-27 u šećernoj bolesti tipa 1 (57).

BAD je proapoptotski protein, regulator mitohondrijskog puta apoptoze (58) koji kao i IL-27 može imati različite učinke u šećernoj bolesti. Proapoptotski učinci su povezani s citokinima-induciranom disfunkcijom β -stanica gušterače (59), dok fosforilirani BAD u β -stanicama ima ulogu u glukoza-stimuliranoj sekreciji inzulina te nutrijentima-induciranoj ekspanziji β -stanica (60).

Proupalni patogeni učinci su prvotno predloženi za CD69 u nekoliko autoimunih bolesti, međutim novija istraživanja ukazuju na njegov protuupalni učinak (61). CD69 povezan je s regulacijom autoimunih i upalnih učinaka u reumatoidnom artritisu, sistemskom eritemskom lupusu, multiploj sklerozi te autoimunoj bolesti štitnjače, međutim njegova uloga u šećernoj bolesti tipa 1 je nedovoljno istražena (61).

PRCKQ kodira protein kinazu C uključenu u interakciju između limfocita T i antigen-prezentirajućih stanica te koja ujedno utječe na sekreciju citokina iz citotoksičnih limfocita T (62). Ciljanje *PRCKQ* u svrhu spriječavanja autoimunosti je obećavajući pristup ujedno ispitan u psorijazi (63).

CLECI6A je eksprimiran u NK stanicama, limfocitima B, dendritičkim stanicama te u manjoj mjeri u limfocitima T te je potvrđena njegova uloga u regulaciji mitofagije β -stanica (64). Istraživanja su ukazala na vjerojatnost da *CLECI6A* nije uključen u kostimulaciju limfocita T (65) te mogućnost povezanosti polimorfizama ovog gena s drugim kandidatskim genima impliciranim u autoimunost (66).

Prethodna istraživanja su predložila ulogu *ERBB3* u šećernoj bolesti tipa 1 kroz utjecaj na funkciju antigen-prezentirajućih stanica i autoimunost (67), međutim novija istraživanja ukazuju da je *ERBB3* novi regulator apoptoze β -stanica (68). *CTSH* ima važnu ulogu u citokinima-induciranoj apoptozi u β -stanicama te sintezi inzulina (69).

Zajednička genska podloga različitih autoimunih bolesti je čest slučaj te može biti pod utjecajem istog SNP-a koji ispoljava rizik za više od jedne autoimune bolesti (70). Također, SNP može predisponirati pojedinca za jednu bolest i ujedno biti protektivan od neke druge autoimune bolesti ili pak različiti SNP-ovi mogu biti povezani s istom bolesti (70). Šećerna bolest tipa 1 dijeli većinu genskih lokusa s upalnom bolesti crijeva, ali je većina ovih lokusa diskordantna (rizične varijante šećerne bolesti tipa 1 su protektivne kod upalne bolesti crijeva ili su implicirani različiti haplotipovi genskih lokusa), dok se većina genskih lokusa zajedničkih s reumatoidnim artritisom, psorijazom i celijakijom čini konkordantna (46).

1.2.2. Okolišni čimbenici u razvoju šećerne bolesti tipa 1

Incidencija šećerne bolesti tipa 1 povećala se nekoliko puta kroz zadnjih 30 godina (2), (71), što jedino može biti objašnjeno promjenama u okolišu ili životnom stilu. Navedeno je potvrđeno istraživanjima migranata koja ukazuju na stjecanje istovjetnog rizika šećerne bolesti tipa 1 prisutnog kod populacije u koju migriraju (72). U Europi, incidencija šećerne bolesti tipa 1 uvelike se razlikuje među susjednim zemljama kod pojedinaca s genetički sličnim predispozicijama za razvoj ove bolesti, ali različitog socioekonomskog statusa (7). Nadalje, istraživanja su zabilježila razliku u incidenciji ove bolesti između monozigotnih blizanaca (73).

Prospektivna istraživanja djece od rođenja su pomogla u identifikaciji potencijalnih okidača autoimunog procesa gušterače te faktora koji potiču progresiju od pojave autoimunosti do klinički dijagnosticirane šećerne bolesti tipa 1 (37), (38), (74-76). Kandidatni okidači šećerne bolesti tipa 1 uključuju infekcije, dijetu te toksine koji utječu na djecu *in utero*, perinatalno i tijekom ranog djetinjstva te se čini da učinak ispoljavaju većinski kod pojedinaca s genskom predispozicijom za razvoj šećerne bolesti tipa 1 (77). Kod potencijalnih prenatalnih okidača najznačajnije su majčine enterovirusne infekcije te starija životna dob majke pri porodu, dok su među potencijalnim postnatalnim okidačima najznačajnije enterovirusne infekcije, izrazito dobivanje na težini te stresni životni događaji prisutni kod djece (77). Najznačajniji potencijalni promotori progresije od pojave autoimunosti do šećerne bolesti tipa 1 uključuju prekomjernu tjelesnu težinu, pubertet, rezistenciju na inzulin te psihološki stres (77). Točan uzrok nastanka ove bolesti još nije razjašnjen, međutim, očigledno je da kombinacija genskih i okolišnih čimbenika igra veliku ulogu u etiologiji ove bolesti te je stoga nužna njihova daljnja identifikacija i razumijevanje.

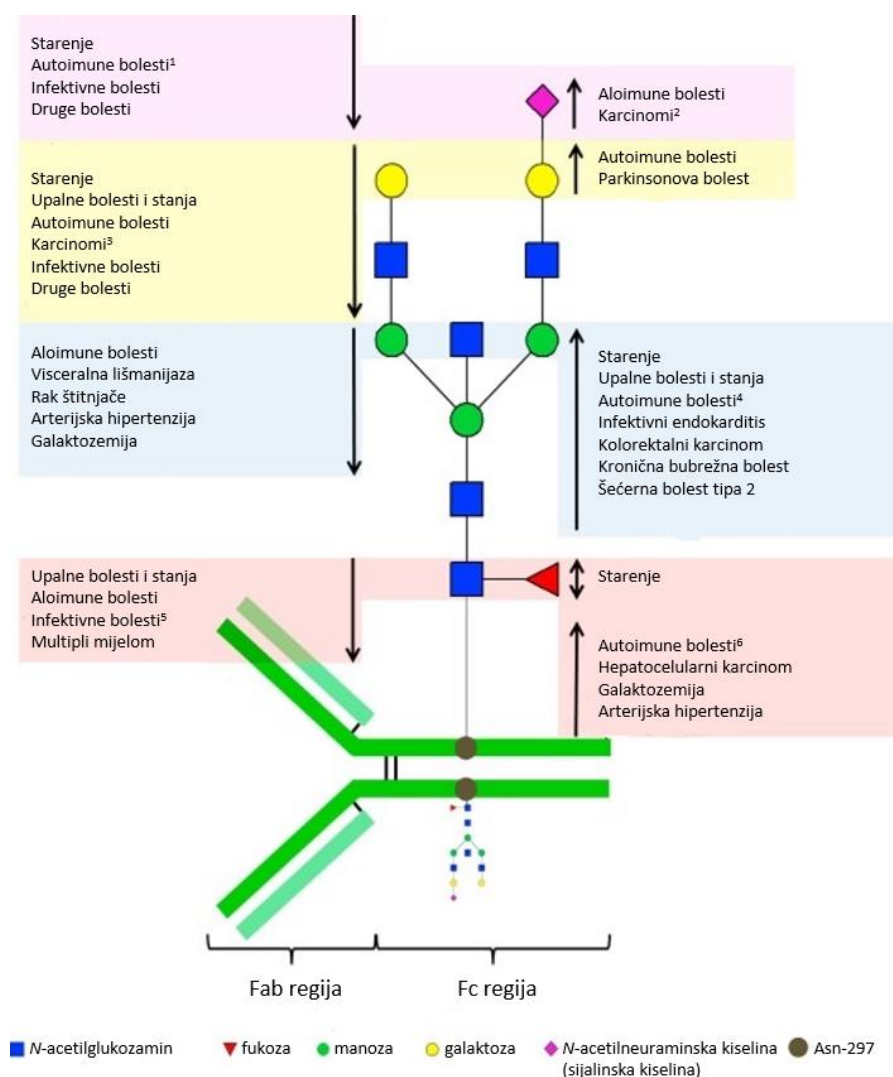
1.2.3. N-glikozilacija proteina i šećerna bolest

Već prije 40 godina pokazano je da su razine specifičnih glikana vezanih na serumske proteine povišene u šećernoj bolesti, od kojih se samo mali postotak mogao objasniti porastom razina glikoproteina s navedenim modifikacijama (78). Navedeno je predložilo direktnu ulogu glikana u patofiziologiji šećerne bolesti, što je naknadno potvrđeno kod nekih specifičnih proteina (79). Važno je naglasiti da su glikozilacija i glikacija dva različita procesa; glikozilacija je kompleksni enzimski proces strogo reguliran mrežom glikoziltransferaza, glikozidaza, transkripcijskih faktora, nukleotidnih šećera i drugih molekula (32). Glikacija, s druge strane, predstavlja neenzimsku reakciju između redukcijskog šećera i proteina (80), kao što je opisano za glikirani hemoglobin (81).

Glikozilacija ima važnu ulogu u brojnim procesima kao što su pravilno smatanje proteina, održavanje stanične strukture, interakcije između receptora i liganda, stanična signalizacija i stanično prepoznavanje (13). Razvoj tzv. visoko-protočnih tehnologija za analizu glikana bio je posebno izazovan zbog kompleksne visoko razgranate strukture karakteristične za glikane (13). Napredak laboratorijskih tehnologija (82-84) omogućio je visoko-protočna istraživanja utjecaja različitih genskih varijanti na glikozilacijske obrasce i njihovu povezanost s mehanizmima bolesti kroz GWAS-e. Geni povezani s *N*-glikozilacijom ljudskih plazmatskih proteina su također povezani sa šećernom bolesti tipa 1, šećernom bolesti tipa 2 i šećernom bolesti mladih koja se javlja u odrasloj dobi uzrokovanoj mutacijama u genu *HNF1A* (*HNF1A-MODY*) (29), (30), (53).

N-glikozilacija je ubikvitarna kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina koja obogaćuje strukturu i funkciju proteina (13), (85), (86). Promjene *N*-glikozilacije plazmatskih proteina opisane su u različitim bolestima, uključujući šećernu bolest tipa 1, šećernu bolest tipa 2, *HNF1A-MODY*, gestacijsku šećernu bolest te inzulinsku rezistenciju (16-18), (20), (24), (87-91). Značajno, rezultati nekoliko od ovih istraživanja ukazuju na mogućnost razlikovanja između različitih tipova šećerne bolesti te čak i identifikacije pojedinaca s povišenim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 2 u budućnosti na temelju *N*-glikanskih profila (17), (18), (20), (24), (90), (91). Jedno od značajnijih otkrića bila je identifikacija promijenjene *N*-glikozilacije glukoznog transportera-2 (*Glut-2*, engl. *glucose transporter-2*) β -stanica gušterače u šećernoj bolesti tipa 2 koja dovodi do ometanja sekrecije inzulina i koja se može ciljati u svrhu sprječavanja šećerne bolesti (79), (92), (93).

Važno svojstvo *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina, kao i *N*-glikoma IgG-a, je izrazita stabilnost tijekom vremena unutar pojedinca pod fiziološkim uvjetima (21), (22), (94), ali u isto vrijeme izuzetna osjetljivost na različite patofiziološke procese (95), (96), što podržava dijagnostički i prognostički potencijal *N*-glikana (slika 1). Glikozilacijske promjene utječu na funkciju proteina. Na primjer, dodatak sijalinske kiseline na postojeću glikansku strukturu mijenja funkciju IgG-a iz proupalne u protuupalnu (97). Također, dodatak sržne fukoze na postojeći glikan IgG-a interferira s vezanjem IgG-a na *Fc γ RIIIa* receptore te smanjuje njegovu sposobnost uništavanja ciljnih stanica kroz proces stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima (*ADCC*, engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (98). Navedeno svojstvo iskoristilo se u terapijske svrhe kod monoklonskih antitijela, s obzirom da nedostatak sržne fukoze povećava njihovu kliničku učinkovitost kroz *ADCC* (99).

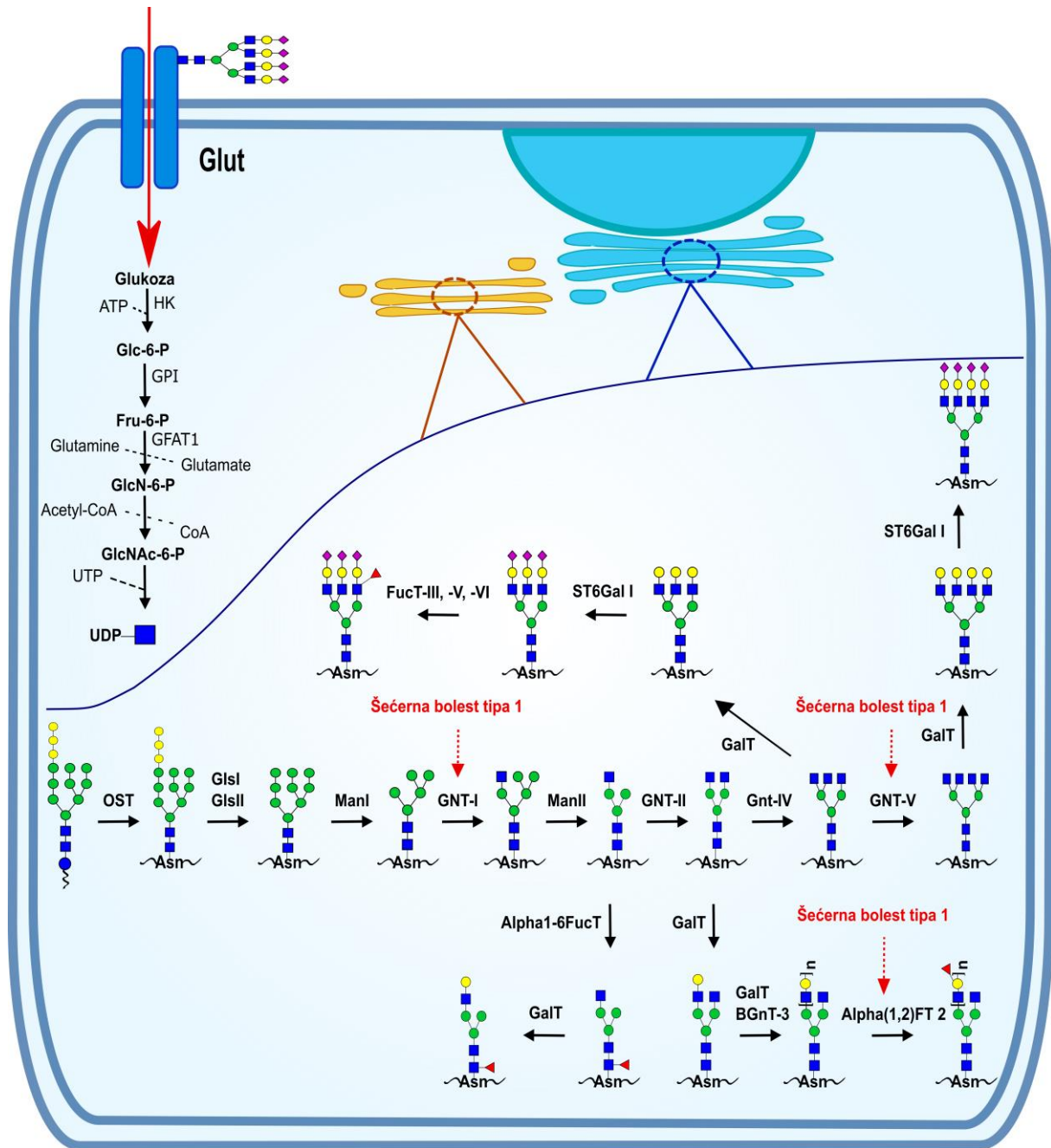


Slika 1. Promjene IgG Fc N-glikozilacije u starenju i bolestima. Označene promjene s godinama odnose se na odraslu populaciju. Strelica prema dolje prikazuje pad, dok strelica prema gore prikazuje rast pripadajućih IgG N-glikozilacijskih svojstava tijekom starenja ili kod pacijenata s određenom bolesti u usporedbi sa zdravim ispitanicima i/ili u aktivnoj fazi bolesti naspram remisijskog stanja. ¹osim u autoimunoj hemolitičnoj anemiji; ²osim u kolorektalnom karcinomu i karcinomu jajnika; ³osim u raku štitnjače i multiplom mijelomu; ⁴osim u osteoartritisu, vaskulitisu povezanom s ANCA antitijelima i autoimunoj hemolitičnoj anemiji; ⁵osim u visceralnoj lišmanijazi i infekciji HIV-om; ⁶osim u sistemskom eritemskom lupusu, ulceroznom kolitisu, i vaskulitisu povezanom s ANCA antitijelima. Preuzeto i prilagođeno iz Gudelj, Lauc i Pezer, 2018. (95)

1.2.4. Heksozamin-biosintetski put i šećerna bolest

Glikozilacija je enzimsko kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina pomoću koje se glikani dodaju na proteine (13). Razlikujemo nekoliko vrsta glikozilacije ovisno o vezi između glikanskog i proteinskog dijela (npr. N-glikozilacija, O-glikozilacija, C-glikozilacija, P-glikozilacija) (13). S obzirom da se ovo istraživanje bavi N-glikozilacijom, ovaj proces je nadalje opisan. N-glikozilacija proteina kod eukariota započinje u endoplazmatskom retikulumu, dok se dorada novonastalih glikoproteina nastavlja u Golgijevom aparatu. Unutar

lumena endoplazmatskog retikuluma sintetizira se zajednički prekursor svih *N*-vezanih glikana, oligosaharid izgrađen od 14 šećernih jedinica (Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol), koji se zatim prenosi kotranslacijski s lipidnog nosača na asparagin akceptorskih proteina unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr (pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina). Unutar Golgijevog aparata dolazi do brojnih modifikacija glikoproteina, kao što su uklanjanje i/ili dodavanje šećernih ostataka (slika 2). Različite modifikacije novonastalih glikoproteina mogu dovesti do nastanka brojnih razgranatih kompleksnih glikanskih struktura (slika 3) (13).

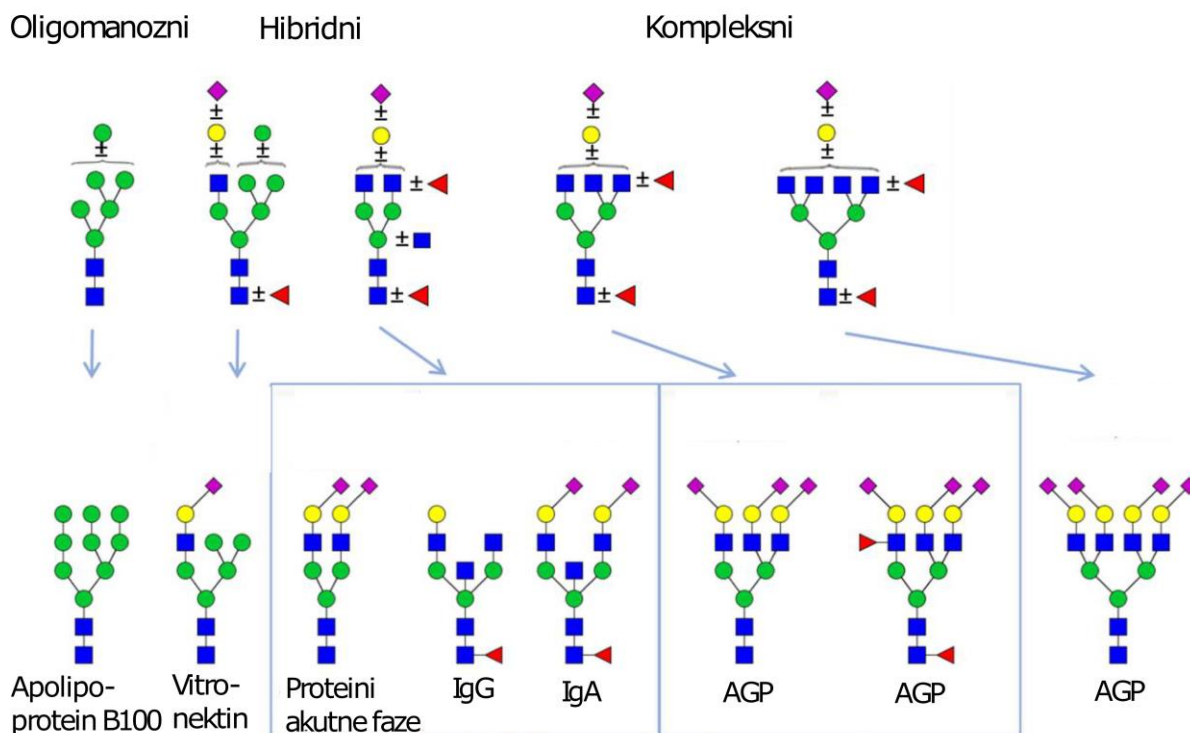


Slika 2. Pojednostavljeni prikaz heksozamin-biosintetskog puta i *N*-glikozilacijskog puta unutar stanice s označenim *N*-glikoziltransferazama povezanim s patogenezaom šećerne bolesti tipa 1. Također su označeni i *N*-glikozilirani glukozni transporter (Glut, engl. *glucose transporter*), jezgra (plava), endoplazmatski retikulum (plava) i Golgijev aparat (smeđa). Plavi kvadrati, zeleni krugovi, žuti krugovi, ljubičasti dijamanti i crveni trokutovi predstavljaju *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), manozu, galaktozu, *N*-acetilneuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu) i fukozu. HK, heksokinaza; GPI, glukoza-6-fosfat izomeraza; GFAT1, glutamin:fruktoza-6-fosfat aminotransferasa 1; OST, oligosaharil-transferaza; GlsI, glukozidaza 1; GlsII, glukozidaza 2; ManI, manozidaza 1; GNT-I, α -1,3-manozil-glikoprotein 2- β -*N*-acetilglukozaminiltransferaza; ManII, manozidaza 2; GNT-II, α -1,6-manozil-glikoprotein 2- β -*N*-acetilglukozaminiltransferaza; Gnt-IV, α -1,3-manozil-glikoprotein 4- β -*N*-acetilglukozaminiltransferaza; GNT-V, α -1,6-manozil-glikoprotein 6- β -*N*-acetilglukozaminiltransferaza; GalT, galaktoziltransferaza; ST6Gal I, β -galaktozid α -2,6-sijaliltransferaza 1; FucT-III, galaktozid 3(4)-L-fukoziltransferaza; FucT-V, α -(1,3)-fukoziltransferaza

5; FucT-VI, α -(1,3)-fukoziltransferaza 6; Alpha1-6FucT, α -(1,6)-fukoziltransferaza; BGnT-3, *N*-acetillaktozaminid β -1,3-*N*-acetilglukozaminiltransferaza 3; Alpha(1,2)FT 2, galaktozid 2- α -l-fukoziltransferaza 2. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman, Gornik i Lauc, 2019. (15)

Pretpostavlja se da je glukozom-potaknuto oštećenje tkiva, uz druge putove, posredovano i heksozamin-biosintetskim putem (HBP, engl. *hexosamine-biosynthesis pathway*) (100), (101) u kojem nastaje donorska molekula za proces *N*-glikozilacije, uridin-difosfat *N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc, engl. *uridine diphosphate-N-acetylglucosamine*) (13). Stupanj granjanja koji određuje kompleksnost glikanskih struktura (biantenarne, triantenarne, tetraantenarne strukture) ovisi o aktivnosti enzima unutar Golgijevog aparata, kao i o razinama *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) (102), (103). Pri fiziološkim uvjetima oko 3 % glukoze se koristi u ovom putu (104). Povišeni protok glukoze kroz HBP dovodi do povišenih razina UDP-GlcNAc-a te time kompleksnih, razgranatih *N*-glikana (103), (105). Navedeno je predloženo kao jedan od mehanizama porasta kompleksnih, visoko razgranatih struktura kod odraslih pacijenata sa šećernom bolesti tipa 1, šećernom bolesti tipa 2 te čak i kod zdravih ispitanika s povišenim rizikom od razvoja šećerne bolesti u budućnosti (16-18), (91), (106).

Nukleotidni šećer UDP-GlcNAc služi kao supstrat *N*-acetilglukozaminil-transferazama I, II, IV i V (GNT-I, -II, -IV i -V) unutar Golgijevog aparata (107) pri čemu nastaju mono-, bi-, tri- i tetra-antenarni *N*-glikani (13). GNT-V odgovorna je za sintezu visoko razgranatih tetraantenarnih *N*-glikana kroz ekstenziju α -1,6-vezane sržne manoze s GlcNAc-om (108). GNT-V također katalizira i sintezu triantenarnih *N*-glikana u slučaju kada se dvije grane pružaju s α -1,6-vezane sržne manoze, umjesto s α -1,3-vezane sržne manoze što je češći slučaj u kojem su triantenarni *N*-glikani sintetizirani djelovanjem GNT-IV (108). GNT-V-sintetizirani razgranati glikan je preferirani akceptor među ostalim razgranatim glikanima za nakanadno dodavanje galektinskog liganda *N*-acetillaktozamina (LacNAc, engl. *N-acetyllactosamine*) (109-111). Galektini su smješteni u citosolu, izvanstaničnom prostoru i na staničnoj površini, s barem jednom konzerviranom domenom koja prepoznaje ugljikohidrate (CRD, engl. *carbohydrate-recognition domain*) (112). Većina galektina stupa u interakciju s *N*-glikanima na staničnoj površini te formira rešetke i time povećava zadržavanje glikoproteina na staničnoj površini (103), (112-115).



Slika 3. *N*-glikanske strukture prisutne u ljudskoj plazmi. *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) i manozu izgrađuju srž svih *N*-glikana, uključujući oligomanozne, hibridne i kompleksne strukture, koje dalje mogu biti modificirane s galaktozom, fukozom, račvujućim GlcNAc-om i/ili sijalinskom kiselinom. Navedeno rezultira velikom raznolikošću *N*-glikanskih struktura na različitim glikoproteinima plazme. Preuzeto i prilagođeno iz Dotz i Wuhrer, 2019. (96)

1.2.5. *N*-glikozilacijske promjene u šećernoj bolesti tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 je autoimuna bolest karakterizirana limfocitima T (pomagačke CD4⁺ i citotoksične CD8⁺)-posredovanim razaranjem β -stanica Langerhansovih otočića gušterače koje luče inzulin i definirana prisutnošću jednog ili više autoantitijela (1), (39), (116). Sve je više dokaza koji podupiru ulogu visoko razgranatih *N*-glikana u razvoju autoimunosti, glavnog obilježja šećerne bolesti tipa 1, posredovanu glikoziltransferaznim genom koji kodira GNT-V (*MGAT5*, engl. *α -1,6-mannosylglycoprotein 6- β -N-acetylglucosaminyltransferase gene*) (114), (117), (118). Predloženi mehanizmi uključuju različite glikoproteine prisutne na limfocitima T i promjene njihovih *N*-glikan-lektin interakcija (103), (114), (117-122). Nakupljanje određenog broja receptora za antigene na limfocitima T (TCR, engl. *T cell antigen receptor*) na mjestu prezentacije antigena potrebno je za aktivaciju limfocita T (123). Sprječavanje galektin-TCR vezanja postignuto je pre-tretmanom limfocita T s laktozom i rezultiralo je TCR nakupljanjem, sa zaključkom da TCR *N*-glikozilacija ima izravan utjecaj na mobilnost i stvaranje TCR klastera (114). Prisutnost visoko-razgranatog *N*-glikana sintetiziranog djelovanjem GNT-V enzima omogućuje vezanje lektina i formiranje lektin-TCR rešetke, time ograničavajući lateralnu

mobilitnost i antigenom-potaknuto stvaranje TCR klastera. Suprotno, nedostatak GNT-V smanjuje prag potreban za aktivaciju limfocita T i povećava ligand-ovisno stvaranje TCR klastera (114). Miševi kojima nedostaje *MGAT5* (*MGAT5^{-/-}*) pokazuju povećanu podložnost autoimunim bolestima (114). Apoptoza aktiviranih ljudskih limfocita T je smanjena nakon inhibicije *N*-glikozilacije primjenom inhibitora manozidaze-II, enzima uzvodno od GNT-V u *N*-glikozilacijskom putu (119), (124).

Osjetljivost na autoimune bolesti povezana je s pomagačkim CD4⁺-limfocitima T (Th, engl. *T helper*), koji se prema lučenju citokina dijele na Th1 (izlučuju IFN- γ i TNF- β) i Th2 stanice (izlučuju IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) (125), (126). Antigenom-potaknuta TCR signalizacija stimulirala je Th1, a ograničila Th2 diferencijaciju (127), (128). Istraživanja ukazuju na ulogu GNT-V-posredovane *N*-glikozilacije u negativnoj regulaciji proizvodnje citokina Th1 stanica te navedeno ujedno predstavlja mehanizam regulacije Th1 i Th2 neovisan o antigenu (121). Visoko-razgranati *N*-glikani čija je sinteza posredovana enzimom GNT-V povećavaju zadržavanje glikoproteina inhibitora aktivacije limfocita na površini stanice (103), produkta jednog od uzročnih kandidatskih gena šećerne bolesti tipa 1, *CTLA4* (46), (129).

Ne-pretili dijabetični miš (NOD, engl. *nonobese diabetic*) je eksperimentalni životinjski model šećerne bolesti tipa 1 (130). Istraživanja su pokazala da IFN- γ -antitijela primijenjena kod NOD miša sprječavaju nastanak šećerne bolesti (131). Istraživanja koja su uslijedila su ukazala na moguću glavnu ulogu IFN- γ receptora u oštećenju β -stanica posredovanom CD4⁺-limfocitima T, ali ne i onom posredovanom CD8⁺-limfocitima T (132). Korištenjem NOD miša također je ukazano na ulogu IL-4 u sprječavanju insulitisa i razvoja šećerne bolesti, sa sličnim rezultatima prijavljenim i za IL-10 (133), (134). Oralna suplementacija GlcNAc-om kod ovih miševa je dovela do povećane razgranatosti *N*-glikana na limfocitima T i zaštitila od bolesti (135). IL-2R α (CD25) je također *N*-glikoprotein uključen u preživljavanje i proliferaciju limfocita T; njegova *N*-glikozilacija i time daljnja aktivacija signalnih putova je inhibirana glukozaminom i time je ukazano na dvojnju ulogu *N*-glikozilacije u diferencijaciji limfocita T (122).

Nadalje, povišene razine lektina koji veže manozu (MBL, engl. *mannose-binding lectin*) te aktivira jedan od putova sustava komplementa nakon vezanja na specifične šećerne ostatke su također zabilježene kod ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (136).

1.2.6. *N*-glikozilacija i komplikacije šećerne bolesti tipa 1

Do sada je provedeno nekoliko istraživanja glikozilacijskih promjena plazmatskih/serumskih proteina u šećernoj bolesti tipa 1, s tim da su navedena istraživanja uključila odrasle ispitanike

te istraživala povezanost glikozilacijskih promjena s komplikacijama bolesti (16), (137-139). Promijenjeni *N*-glikanski profil ukupnih serumskih proteina i IgG-a prijavljen je kod odraslih pacijenata sa šećernom bolesti tipa 1 i povezan s komplikacijama bubrežne bolesti (16), (139). Rast razgranatih kompleksnih serumskih *N*-glikana (visoko razgranate triantenarne i tetraantenarne strukture) te pad jednostavnijih biantenarnih *N*-glikana ukupnih serumskih proteina korelirao je s višim vrijednostima glikiranog hemoglobina (HbA1c), višim vrijednostima omjera albumina i kreatinina te strmijim padom procijenjene stope glomerularne filtracije, odražavajući slabiju glikemijsku kontrolu i bubrežnu funkciju (16), (139). Najkompleksniji IgG glikan je biantenarne strukture (84), no i u ovom slučaju rast kompleksnijih IgG *N*-glikanskih struktura (više galaktozilirane i sijalinizirane biantenarne strukture) i pad jednostavnijih (monogalaktozilirani biantenarni) korelirao je s parametrima koji odražavaju komplikacije šećerne bolesti tipa 1 (16), (139).

Nadalje, povišene razine sijalinske kiseline su povezane s prisutnošću mikrovaskularnih komplikacija kod odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (138). Glikozilacijske promjene α 1-kiselog glikoproteina (AGP) su također povezane s vaskularnim komplikacijama u šećernoj bolesti tipa 1 (137).

1.2.7. Korelacija glikoma i genoma te povezanost sa šećernom bolesti tipa 1

Glikozilacija proteina je izrazito složen proces reguliran kompleksnom mrežom gena (32). Razvoj tzv. visoko-protočnih tehnologija za analizu glikana, kao što je to tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC, engl. *ultra-performance liquid chromatography*) (82-84), omogućio je visokoprotočnu analizu glikana te samim time i korelaciju glikoma i genoma kroz GWAS-e (25-31), (140). Uz identifikaciju različitih glikoziltransferaza, provedeni GWAS-i glikoma ukupnih proteina plazme, kao i glikoma IgG-a, omogućili su identifikaciju gena koji do tada nisu bili povezani s procesom glikozilacije te potvrdili da je moguće identificirati nove gene uključene u ovaj složeni proces korištenjem ovakvih istraživanja (25-31), (140). Geni povezani s *N*-glikozilacijom proteina, povezani su i s raznim drugim bolestima, uključujući i šećernu bolest tipa 1 (na primjer *IKZF1* i *BACH2*) (29). Kao jedan od potencijalnih uzročnih gena šećerne bolesti tipa 1 identificiran je i gen koji kodira enzim uključen u glikozilaciju proteina, gen za fukoziltransferazu 2 (*FUT2*, engl. *fucosyltransferase 2*) (4). Također, kao što je i prethodno istaknuto, glikoziltransferazni gen *MGAT5* povezuje se s patogeneзом šećerne bolesti tipa 1 kroz utjecaj na razgranatost *N*-glikanskih struktura na T-stanicama te njihovu posljedičnu aktivaciju (114).

**2. ISPITANICI, MATERIJALI I
METODOLOGIJA
ISTRAŽIVANJA**

2.1. ISPITANICI

Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju potpisali su svi ispitanici, njihovi roditelji ili skrbnici. Istraživanje je odobrilo Dansko Etičko povjerenstvo (broj odobrenja KA-95139m) te Etičko povjerenstvo Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

Uzorci ispitanika prikupljeni su kroz DanDiabKids registar unutar tri mjeseca od dijagnoze šećerne bolesti tipa 1 (34). Uzorci ispitanika skupljeni kroz navedeni registar korišteni su u brojnim istraživanjima (141), (142). Ukratko, od 1966. godine registar uključuje svu novodijagnosticiranu djecu sa šećernom bolesti tipa 1 u Danskoj te s nastupom bolesti prije 15. godine života. Od 2006. godine nadalje, registar uključuje svu djecu dijagnosticiranu sa šećernom bolesti do 18. godine života. Registar se kontinuirano sinkronizira s Danskim nacionalnim registrom pacijenata (engl. *Danish National Patient Register*) u svrhu provjere uključenja svih novodijagnosticiranih pacijenata (34).

Uključni kriterij za zdrave srodnike (braća i sestre ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1) bio je dostupnost uzorka krvne plazme biološkog srodnika dijagnosticiranog sa šećernom bolesti tipa 1. Kod nekih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 više zdravih srodnika uključeno je u istraživanje (od jedan do pet zdravih srodnika po oboljelom ispitaniku), no u većini slučajeva uzorak samo jednog zdravog srodnika bio je dostupan. Uzorci više od 95 % zdravih srodnika prikupljeni su istog datuma kao i uzorci oboljelog ispitanika te su uzorkovanja podjednako raspoređena tijekom godine. Uzorkovanje zdravih srodnika provodilo se od 1997. do 2000. godine, dok je zadnja provjera zdravstvenog statusa kroz DanDiabKids registar obavljena u siječnju 2019. kada je utvrđeno da su dva ispitanika razvila šećernu bolest tipa 1 (unutar pet i devet godina od uzorkovanja). Ukoliko su zdravi srodnici dijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 1 iznad 18 godina života njihov zdravstveni status nije moguće pratiti putem DanDiabKids registra jer se u tom slučaju upućuju u klinike za praćenje odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (34).

2.1.1. Prvotno istraživanje

U prvotnom istraživanju koristili su se uzorci krvne plazme 1917 ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (medijan dobi 10,2, raspon dobi 0,6 – 19,1).

Ispitanici su podijeljeni prema spolu te u četiri dobne skupine (jako mlada djeca, pred-pubertet, pubertet, post-pubertet). Pubertet je definiran s obzirom na dob, pri čemu je različita dobna granica korištena ovisno o spolu za početak i kraj puberteta. Podaci o razinama autoantitijela

bili su dostupni za 300 ispitanika i uključivali su razine autoantitijela na arginin cink transporter 8 (ZnT8R, engl. *arginine zinc transporter 8*), triptofan cink transporter 8 (ZnT8W, engl. *tryptophan zinc transporter 8*), GAD i tirozin-fosfatazu (IA-2, engl. *insulinoma-associated protein 2*).

1105 ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (medijan dobi 10, raspon dobi 1 – 18) uključeno je u genomsku asocijacijsku studiju.

2.1.2. Validacijsko istraživanje

U validacijsko istraživanje rezultata genomske asocijacijske studije uključeno je 265 zdravih ispitanika (medijan dobi 11, raspon dobi 2 – 23) i 190 oboljelih ispitanika (medijan dobi 10, raspon dobi 1 – 19). Za 3 oboljela ispitanika uključeni su i njihovi zdravi srodnici u kontrolnoj skupini, dok ostali ispitanici nisu u srodstvu.

2.1.3. Obiteljsko istraživanje

U obiteljsko istraživanje uključena su 244 zdrava srodnika (medijan dobi 11, raspon dobi 2 – 23) čiji su uzorci prikupljeni kroz isti registar, pri čemu je ukupno uključeno 188 obitelji (uzorci oboljelih srodnika su ponovno analizirani).

2.2. MATERIJALI

2.2.1. Anorganske kemikalije

Amonijak, otopina (NH₄OH) (Merck), amonijev bikarbonat (NH₄HCO₃) (Acros Organics), dinatrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄) (Acros Organics), kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), kloridna kiselina (HCl) (Merck), natrijev hidroksid (NaOH) (Merck), natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba).

2.2.2. Organske kemikalije

2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), acetonitril (HPLC razina čistoće) (PanReac AppliChem), acetonitril (LC-MS razina čistoće) (VWR Chemicals), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), formijatna kiselina (HCOOH) (Merck), igepal CA-360 (Sigma-Aldrich), ledena octena kiselina (CH₃COOH) (Merck), natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich), tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) (Sigma-Aldrich).

2.2.3. Enzimi

Peptid *N*-glikozidaza F (PNGaza F) (Promega).

2.2.4. Otopine i puferi

0,1M HCOOH (pH 2,5)

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je pomiješati 0,38 mL formijatne kiseline s 80 mL destilirane vode te zatim prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom. Nakon provjere pH potrebno je filtrirati otopinu kroz 0,2 µm Supor filter te pohraniti na 4 °C.

0,1M NaOH

U svrhu pripreme 100 mL potrebno je otopiti 0,4 g NaOH u 80 mL destilirane vode pri čemu se otapanje pospješuje miješanjem na magnetskom mješaču te zagrijavanjem na 60 °C. Nakon otapanja i prebacivanja u menzuru potrebno je nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

1M NH₄HCO₃

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je otopiti 7,91 g NH₄HCO₃ u 80 mL destilirane vode uz miješanje na magnetskom mješaču. Nakon otapanja i prebacivanja u menzuru potrebno je nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

1M HCl

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je pomiješati 8,47 mL HCl s 80 mL destilirane vode te zatim prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

1M NaOH

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je otopiti 4 g NaOH u 80 mL destilirane vode pri čemu se otapanje pospješuje miješanjem na magnetskom mješaču te zagrijavanjem na 60 °C. Nakon otapanja i prebacivanja u menzuru potrebno je nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

1x PBS, puferirana otopina fosfatnih soli (engl. phosphate buffer saline, PBS)

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je uliti 10 mL 10x PBS-a u menzuru te nadopuniti destiliranom vodom do 90 mL. Nakon provjere pH (prema potrebi podešavanje pH na 7,4 s 1M NaOH) potrebno je nadopuniti do 100 mL s destiliranom vodom, filtrirati otopinu kroz 0,2 µm Supor filter te pohraniti na 4 °C.

1,33 % SDS

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je otopiti 1,33 g SDS-a u 80 mL ultra čiste vode pri čemu se otapanje pospješuje miješanjem na magnetskom mješaču. Nakon otapanja potrebno je prelići u menzuru, nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom te pohraniti na 37 °C.

2 % SDS

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je otopiti 2 g SDS-a u 80 mL ultra čiste vode pri čemu se otapanje pospješuje miješanjem na magnetskom mješaču. Nakon otapanja potrebno je preliti u menzuru, nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom te pohraniti na 37 °C.

4 % Igepal

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je dodati 4 mL Igepal CA-360 u 80 mL ultra čiste vode uz miješanje na magnetskom mješaču pri temperaturi od 65 °C. Nakon otapanja potrebno je nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom te pohraniti na 4 °C.

5x PBS

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je uliti 50 mL 10x PBS-a u menzuru, nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom te pohraniti na 4 °C.

10x PBS

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je dodati 8,0028 g NaCl, 1,3832 g Na₂HPO₄, 0,2964 g KH₂PO₄ i 0,1976 g KCl u 80 mL destilirane vode, provjeriti pH otopine (pH treba biti između 6,6 i 6,8 te je potrebno titrirati s 1M NaOH ili 1M HCl prema potrebi), nadopuniti destiliranom vodom do 100 mL te filtrirati kroz 0,2 µm Supor filter.

20 % acetonitril

U svrhu pripremu 1 L potrebno je dodati 200 mL acetonitrila (HPLC razina čistoće) u menzuru te nadopuniti do 1 L s ultra čistom vodom.

20 % etanol u 20 mM TRIS-u + 0,1 M NaCl (pufer za skladištenje protein G pločice)

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je pomiješati 20 mL etanola sa 60 mL destilirane vode u menzuri. Nakon protresanja menzure, otopinu je potrebno preliti u staklenu čašu. 0,242 g TRIS-a i 0,5844 g NaCl potrebno je otopiti u otopini korištenjem magnetskog mješača. Nakon provjere pH (podešavanje na 7,4 korištenjem 1M HCl) potrebno je preliti otopinu u menzuru te nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom, filtrirati kroz 0,2 µm Supor filter i zatim pohraniti na 4 °C.

30 % octena kiselina u DMSO

U svrhu pripremu 1 mL potrebno je pomiješati 0,3 mL octene kiseline s 0,7 mL DMSO.

70 % etanol

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je dodati 70 mL etanola u menzuru, nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom te pohraniti na 4 °C.

96 % acetonitril

U svrhu pripremu 100 mL potrebno je dodati 96 mL acetonitrila (HPLC razina čistoće) u menzuru, nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom te pohraniti na 4 °C.

Amonijev formijat, 2M, pH 4,4

U svrhu pripremu 500 mL potrebno je uliti 300 mL ultra čiste vode u posudu volumena 500 mL te ohladiti. Zatim je potrebno dodati 37,75 mL formijatne kiseline te ostaviti otopinu da se ohladi uz miješanje na magnetskom mješaču i provjeru pH (pH treba biti ispod 2). Nakon hlađenja potrebno je polako dodavati oko 75 mL amonijaka do dostizanja pH 4,2 pri čemu je potrebno pratiti temperatura otopine (potrebno ispod 20 °C). U svrhu stabilizacije pH potrebno je otopinu ostaviti preko noći na sobnoj temperaturi nakon čega je pH otopine potrebno namjestiti na 4,4 dodavanjem amonijaka.

Otopina za obilježavanje N-glikana

U svrhu obilježavanja jednog uzorka potrebno je otopiti 0,48 mg 2-aminobenzamida (2-AB) i 1,12 mg 2-pikolin borana (2-PB) u 25 µL 30 %-tne octene kiseline u DMSO.

Otopine za kalibraciju pH metra

pH Buffer Solution, alkalni standard, pH $9,21 \pm 0,02$; pH Buffer Solution, kiseli standard, pH $4,01 \pm 0,02$ (Mettler Toledo GmbH).

2.2.5. Instrumenti

AB54-S analitička vaga (Mettler Toledo), Highland tehnička vaga (Adam Equipment), Magnetic Stirrer MSH 300 magnetski mješač (Biosan), pipete i mikropipete (Rainin), Savant SpeedVac centrifuga za ukoncentriravanje (Thermo Scientific), Seven Compact pH metar (Mettler Toledo), treskalica (GFL), vakumska pumpa (Pall), Waters Acquity UPLC (Waters).

2.2.6. Potrošni materijal

ABgene PCR pločice s 96 jažica (Thermo Scientific), GHP Acroprep 0,20 µm filter pločice s polipropilenskom membranom (Pall), GHP Acroprep 0,45 µm filter pločice s polipropilenskom membranom (Pall), nastavci za pipete (Rainin), mikrotitarske pločice s 96 jažica za sakupljanje uzoraka (Waters).

2.2.7. Kolone za kromatografiju, pločica za izolaciju IgG-a, filteri

Acquity UPLC Glycan BEH (engl. bridged ethylene hybrid, BEH) amidna kolona, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm (Waters), Acquity UPLC Glycan BEH amidna kolona, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm (Waters), protein G monolitna pločica s 96 jažica (Bia Separations), Supor® PES Membrane filter diskovi 0,2 µm (Pall).

2.3. ANALIZA N-GLIKANA

Prije analize, svi uzorci plazme su randomizirani na pločicama s 96 jažica za sakupljanje uzoraka. U svrhu uklanjanja eksperimentalne pogreške, standardni uzorci dodani su na svaku pločicu. Ukratko, u svrhu određivanja *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina korišteno je 10 μ L plazme, dok je izolacija IgG-a provedena iz 70 μ L plazme uz pomoć pločice monolita s proteinom G (BIA Separations, Ajdovščina, Slovenia) (84). *N*-glikani oslobođeni su s proteina putem enzimske hidrolize s *N*-glikozidazom F, fluorescencijski obilježeni s 2-amino-benzamidom (2-AB) te pročišćeni (83), nakon čega je uslijedilo razdvajanje *N*-glikana tekućinskom kromatografijom.

2.3.1. Izolacija IgG-a

Izolacija IgG-a se iz uzoraka plazme izvodi prema protokolu koji se temelji na afinitetnoj kromatografiji (84). IgG se izolira pomoću protein G monolitne pločice s 96 jažica iz početnog volumena plazme od 70 μ L. Plazma se razrjeđuje 7x koristeći 1x fosfatni pufer (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) te se nakon toga prenosi na GHP Acroprep 0,45 μ m filter pločicu s polipropilenskom membranom. Filter pločica s plazmom se postavlja na stalak vakuumske pumpe nakon čega slijedi filtracija plazme. Filtrirana (engl. *flow-through*) plazma sakuplja se u mikrotitarsku pločicu za sakupljanje uzoraka nakon čega se uzorci prenose na protein G monolitnu pločicu.

Prekondicioniranje protein G monolitne pločice potrebno je obaviti prije prebacivanja filtrirane plazme. U tu svrhu prvo se kreće s ispiranjem pufera za skladištenje, zatim se pločica ispiri s 2 mL ultra čiste vode, 2 mL 1x PBS-a i 1 mL 0,1M formijatne kiseline, po svakoj jažici. Nakon toga slijedi neutralizacija uz pomoć 2mL 10x PBS-a po jažici te ekvibracija s dva puta po 2 mL 1x PBS-a po jažici.

Nakon vezanja IgG-a iz plazme za protein G na pločici, protein G pločica ispiri se tri puta s 2 mL 1x PBS-a po jažici. Zatim se posuda za sakupljanje otpada mijenja se s mikrotitarskom pločicom za sakupljanje uzoraka na stalku za vakuumsku pumpu u svrhu sakupljanja IgG-a nakon ispiranja s protein G pločice korištenjem 1 mL 0,1M formijatne kiseline po svakoj jažici. Sa stalka vakuumske pumpe potrebno je ukloniti mikrotitarsku pločicu sa sakupljenim IgG-om te u jažice dodati 170 μ L pufera za neutralizaciju (1M amonijevog bikarbonata). 300 μ L IgG eluata se prebacuje u novu mikrotitarsku pločicu za sakupljanje uzoraka te zatim ukoncentrirava sušenjem u centrifugi za ukoncentriravanje tijekom 18 sati, dok se preostali volumen IgG eluata pohranjuje u zamrzivač.

Regeneracija i pravilna pohrana protein G pločice slijedi nakon izolacije IgG-a. U tu svrhu potrebno je postaviti posudu za sakupljanje otpada ispod protein G pločice postavljene u stalak vakuumske pumpe. U svaku jažicu protein G pločice potrebno je dodati 2 mL 0,1M formijatne kiseline, 2 mL 10x PBS-a te 2 mL 1x PBS-a. Nakon nanošenja svih otopina na pločicu potrebno je filtrirati otopine kroz pločicu čime ispiramo i samu pločicu. Zadnji korak uključuje nanošenje pufera za skladištenje protein G pločice te pohrana pločice na 4 °C.

2.3.2. Deglikozilacija, označavanje te pročišćavanje *N*-glikana

Resuspendiranjem u 30 µL 1,33 % SDS-a te inkubacijom u trajanju od 10 minuta na 65 °C dolazi do denaturacije IgG-a. Korištenjem 20 µL 2 % SDS-a te inkubacijom u trajanju od 10 minuta na 65 °C obavlja se denaturacija proteina plazme iz početnog volumena uzorka od 10 µL plazme. Koraci koji slijede nakon denaturacije su istovjetni i za uzorak plazme i za uzorak IgG-a. U svrhu neutralizacije viška SDS-a dodaje se 10 µL 4 % igepala nakon čega slijedi inkubacija od 15 minuta uz treskanje na treskalici. Opuštanje *N*-glikana provodi se dodatkom 1,2 U PNGase F u 10 mL 5x PBS-a po uzorku uz inkubaciju tijekom noći na 37 °C. Obilježavanje oslobođenih *N*-glikani provodi se fluorescentnom bojom (2-AB) pri čemu se u uzorke dodaje 25 µL otopine za obilježavanje uz inkubaciju tijekom dva sata na 65 °C nakon čega se u uzorke dodaje 700 µL acetonitrila. Uzorci se zatim prenose na GHP Acroprep 0,20 µm filter pločicu s polipropilenskom membranom na stalku vakuumske pumpe (prekondicioniranje filter pločice provodi se dodavanjem 200 µL 70 % etanola, ultra čiste vode i 96 % acetonitrila po jažici) pri čemu se ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE, engl. *solid phase extraction*) temeljenoj na hidrofilnim interakcijama (HILIC-SPE) provodi uklanjanje ostataka boje, reduktivnih tvari te drugih nečistoća. Dolazi do vezanja glikana za hidrofilno-obogaćene membrane jažica filter pločice, dok se korištenjem vakuuma uklanja otapalo iz uzoraka. Uzorci se zatim ispiru pet puta s 200 µL 96 % acetonitrila, a elucija glikana s pločice provodi se ultra čistom vodom.

2.3.3. Tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti

Razine fluorescencijski obilježenih *N*-glikana ukupnih proteina plazme, kao i *N*-glikana IgG-a, analizirane su tekućinskom kromatografijom temeljenom na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*) na Waters Acquity UPLC instrumentu (Waters, Milford, MA, USA) korištenjem Waters BEH Glycan kromatografskih kolona (84). UPLC instrument sadrži kvaterni upravljač otapalima, upravljač uzorcima i fluorescentni detektor. Ekscitacijska valna duljina detektora namještena je na 250 nm, dok je emisijska namještena na 428 nm. Empower 3 računalni program (serija 3471, Waters) upravlja instrumentom. Waters

BEH Glycan kromatografske kolone služe za razdvajanje glikana, pri čemu se kolone od 150 mm koriste za razdvajanje glikana ukupnih plazmatskih proteina, dok se kolone od 100 mm koriste za razdvajanje glikana IgG-a. 100 mM amonijev formijat (pH 4,4) koristi se kao otapalo A, dok se kao otapalo B koristi 100 % acetonitril (LC-MS razina čistoće). U svrhu razdvajanja glikana proteina plazme upotrebljena je metoda s linearnim gradijentom acetonitrila 70 – 53 % pri protoku od 0,561 mL/min tijekom 25 minuta (tablica 1), dok je u svrhu razdvajanja IgG glikana upotrebljena metoda s linearnim gradijentom acetonitrila 75 – 62 % pri protoku od 0,4 mL/min tijekom 27 minuta (tablica 2).

Tablica 1. Gradijent otapala korišten tijekom analize *N*-glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina

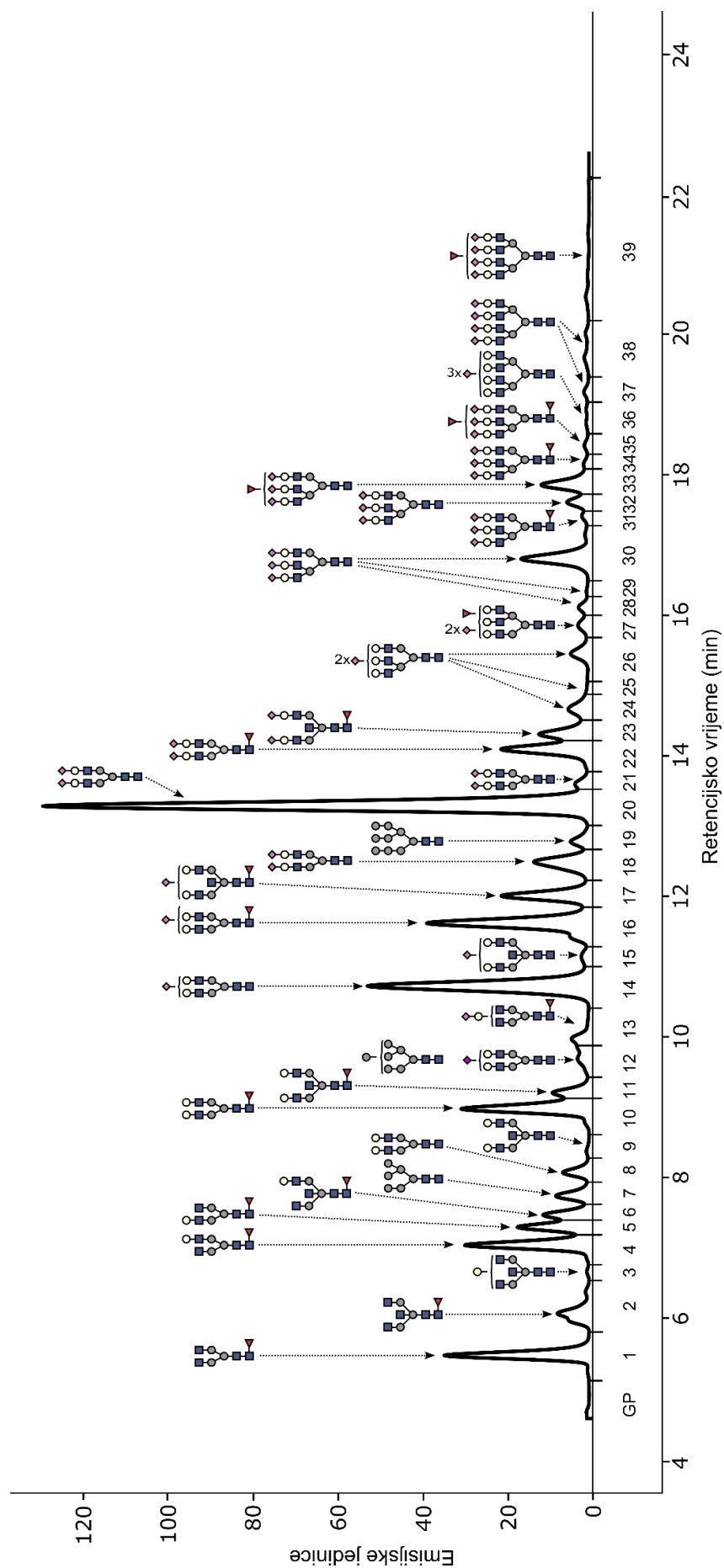
| Vrijeme (min) | Protok (mL/min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| 00,00 | 0,561 | 30 | 70 |
| 01,47 | 0,561 | 30 | 70 |
| 24,81 | 0,561 | 47 | 53 |
| 25,50 | 0,250 | 100 | 0 |
| 28,00 | 0,250 | 100 | 0 |
| 29,00 | 0,250 | 30 | 70 |
| 32,50 | 0,561 | 30 | 70 |
| 45,00 | 0,400 | 0 | 100 |
| 55,00 | 0,0 | 0 | 100 |

Tablica 2. Gradijent otapala korišten tijekom analize *N*-glikozilacije IgG-a

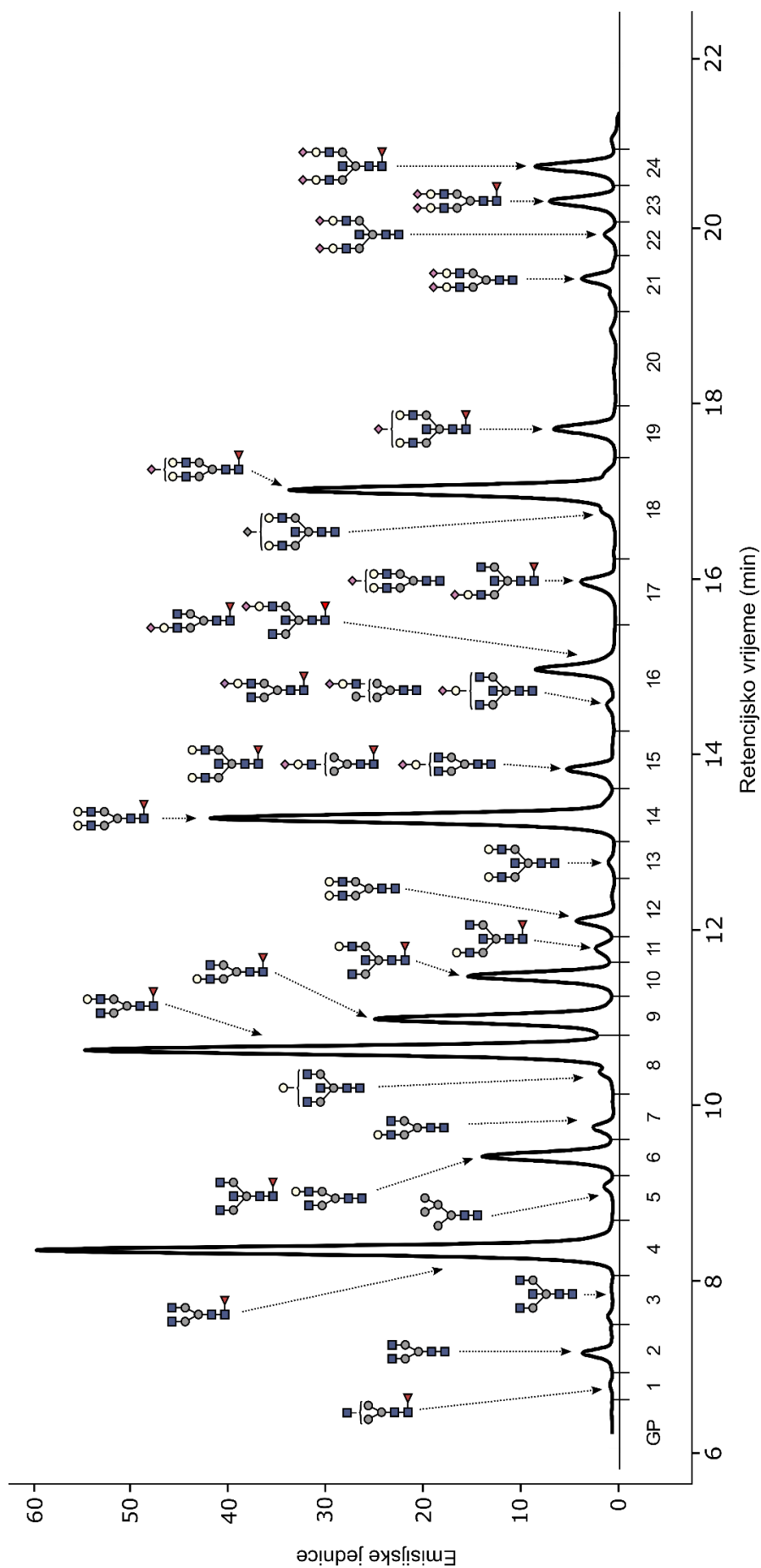
| Vrijeme (min) | Protok (mL/min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| 00,00 | 0,4 | 25 | 75 |
| 27,00 | 0,4 | 38 | 62 |
| 28,00 | 0,4 | 100 | 0 |
| 30,00 | 0,4 | 100 | 0 |
| 31,00 | 0,4 | 27 | 73 |
| 36,00 | 0,4 | 27 | 73 |
| 37,00 | 0,4 | 0 | 100 |
| 45,00 | 0,0 | 0 | 100 |

Kromatografski sutav kalibriran je korištenjem vanjskog standarda hidroliziranih i 2-AB obilježenih oligomera glukoze (dekstran), pomoću kojeg su retencijska vremena pojedinačnih glikana pretvorena u glukozne jedinice (GU, engl. *glucose unit*) te su zatim uspoređena s referentnim vrijednostima unutar “GlycoStore” baze podataka za određivanje strukture (143). Kromatogrami su obrađeni automatskom integracijom (144), pri čemu je kromatogram *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina razdvojen na 39 glikanskih (kromatografskih) pikova (GP1 – GP39), a kromatogram *N*-glikana IgG-a na 24 glikanska (kromatografska) pika (GP1 –

GP24) (slike 4 i 5) unutar kojih su glikanske strukture prethodno određene i poznate (84), (145). Tablice 3 i 4 prikazuju najzastupljenije glikanske strukture u glikanskim pikovima. Relativna količina glikana unutar svakog pika izražena je kao postotak ukupne površine svih integriranih pikova. Uz izravno izmjerene glikanske skupine, izračunata su i derivirana svojstva na temelju grupiranja svih izravno izmjerenih *N*-glikana prema zajedničkim kompozicijskim svojstvima (npr. broj grana glikana, prisutnost sržne fukoze, oligomanozni glikani itd.). Ukupno je izdvojeno 9 deriviranih svojstava za IgG *N*-glikom i 15 za *N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina. Tablice 5 i 6 prikazuju izračun deriviranih svojstava.



Slika 4. Reprezentativni kromatogram *N*-glikana otpuštenih s ukupnih plazmatskih proteina. Plavi kvadrati, sivi krugovi, žuti krugovi, ljubičasti dijamantri i crveni trokutovi predstavljaju *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), manozu, galaktozu, *N*-acetilneuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu) i fukožu. GP – glikanski pik. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).



Slika 5. Reprezentativni kromatogram *N*-glikana otpuštenih s IgG-a. Plavi kvadrati, sivi krugovi, ljubičasti dijamantri i crveni trokutovi predstavljaju *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), manozu, galaktozu, *N*-acetilneuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu) i fukozu. GP – glikanski pik. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Tablica 3. N-glikom ukupnih plazmatskih proteina

| Glikanski pik | Glikanska struktura* | Opis glikanske strukture |
|---------------|----------------------|---|
| GP1 | FA2 | sržno fukoziliran, biantenarni |
| GP2 | FA2B | sržno fukoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP3 | A2BG1 | Monogalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP4 | FA2[6]G1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni |
| GP5 | FA2[3]G1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni |
| GP6 | FA2[6]BG1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP7 | M6 | oligomanozni sa šest manoznih jedinica |
| GP8 | A2G2 | digalaktoziliran, biantenarni |
| GP9 | A2BG2 | digalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP10 | FA2G2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni |
| GP11 | FA2BG2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP12 | M7 A2G2S1 | oligomanozni sa sedam manoznih jedinica; digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni |
| GP13 | FA2G1S1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni |
| GP14 | A2G2S1 | digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni |
| GP15 | A2BG2S1 | digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP16 | FA2G2S1 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni |
| GP17 | FA2BG2S1 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP18 | A2G2S2 | digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni |
| GP19 | M9 | oligomanozni s devet manoznih jedinica |
| GP20 | A2G2S2 | digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni |
| GP21 | A2G2S2 | digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni |
| GP22 | FA2G2S2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni |
| GP23 | FA2BG2S2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om |
| GP24 | A3G3S2 | trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni |
| GP25 | A3G3S2 | trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni |
| GP26 | A3G3S2 | trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni |
| GP27 | A3F1G3S2 | antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni |
| GP28 | A3G3S3 | trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |
| GP29 | A3G3S3 | trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |
| GP30 | A3G3S3 | trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |

2. Ispitanici, materijali i metodologija istraživanja

| | | |
|------|-----------|---|
| GP31 | FA3G3S3 | sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |
| GP32 | A3G3S3 | trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |
| GP33 | A3F1G3S3 | antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |
| GP34 | FA3G3S3 | sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |
| GP35 | FA3F1G3S3 | sržno i antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni |
| GP36 | A4G4S3 | tetragalaktoziliran i trisijaliniziran, tetraantenarni |
| GP37 | A4G4S4 | tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni |
| GP38 | A4G4S4 | tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni |
| GP39 | A4F1G4S4 | antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni |

*najzastupljenije glikanske strukture u glikanskoj skupini. Strukturne kratice: svi *N*-glikani imaju 2 sržna GlcNAc-a; F na početku kratice označava sržnu fukoza α 1,6-vezanu na unutarnji GlcNAc; Mx, broj (x) manozna na sržnom GlcNAc-u; Ax, broj antena (GlcNAc-a), odnosno grana, na trimanozilnoj srži; [3] i [6] označavaju na kojoj grani je vezana monosaharidna jedinica; A2, biantenarni s oba GlcNAc-a β 1,2-vezana; A3, triantenarni s GlcNAc-om β 1,2-vezanim na obje manoze i trećim GlcNAc-om β 1,4-vezanim na α 1,3-vezanu manozu; A4, GlcNAc-i vezani kao A3 s dodatnim GlcNAc-om β 1,6-vezanim na α 1,6-manozu; B, računajući GlcNAc vezan β 1,4 na β 1,3 manozu; G(x), broj (x) β 1,4-vezanih galaktoza na antenu; F(x), broj (x) fukoza α 1,3-vezanih na antenarni GlcNAc; S(x), broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu. Preuzeto i prilagođeno iz Zaytseva i sur., 2020. (145).

Tablica 4. *N*-glikom IgG-a

| Glikanski pik | Glikanska struktura* | Opis glikanske strukture |
|---------------|-------------------------|--|
| GP1 | FA1 | sržno fukoziliran, monoantennarni |
| GP2 | A2 | biantennarni |
| GP3 | A2B | biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP4 | FA2 | sržno fukoziliran, biantennarni |
| GP5 | M5 FA2 | oligomanozni s pet manoznih jedinica; sržno fukoziliran, biantennarni |
| GP6 | FA2B | sržno fukoziliran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP7 | A2[3]G1 FA2B | monogalaktoziliran, biantennarni; sržno fukoziliran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP8 | FA2[6]G1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantennarni |
| GP9 | FA2[3]G1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantennarni |
| GP10 | FA2[6]BG1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP11 | FA2[3]BG1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP12 | A2G2 | digalaktoziliran, biantennarni |
| GP13 | A2BG2 | digalaktoziliran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP14 | FA2G2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantennarni |
| GP15 | FA2BG2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP16 | FA2[3]G1S1 | sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran, biantennarni |
| GP17 | A2G2S1 | digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantennarni |
| GP18 | FA2G2S1 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantennarni |
| GP19 | FA2BG2S1 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP20 | struktura nije određena | struktura nije određena |
| GP21 | A2G2S2 | digalaktoziliran i disijaliniziran, biantennarni |
| GP22 | A2BG2S2 | digalaktoziliran i disijaliniziran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |
| GP23 | FA2G2S2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantennarni |
| GP24 | FA2BG2S2 | sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantennarni s račvajućim GlcNAc-om |

*najzastupljenije glikanske strukture u glikanskoj skupini. Strukturne kratice: svi *N*-glikani imaju 2 sržna GlcNAc-a; F na početku kratice označava sržnu fukozu α 1,6-vezanu na unutarnji GlcNAc; Mx,

2. Ispitanici, materijali i metodologija istraživanja

broj (x) manosa na sržnom GlcNAc-u; Ax, broj antena (GlcNAc-a), odnosno grana, na trimanozilnoj srži; [3] i [6] označavaju na kojoj grani je vezana monosaharidna jedinica; A2, biantenarni s oba GlcNAc-a β 1,2-vezana; B, računajući GlcNAc vezan β 1,4 na β 1,3 manozu; G(x), broj (x) β 1,4-vezanih galaktoza na antenu; S(x), broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu. Preuzeto i prilagođeno iz Pučić i sur., 2011. (84).

Tablica 5. Izračun deriviranih svojstava IgG N-glikoma

| GP | G0 | G1 | G2 | S0 | S1 | S2 | B | CF | HM |
|------|----|----|----|----|----|----|---|----|----|
| GP1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| GP6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| GP7 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP8 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP9 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP10 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| GP11 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| GP12 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP13 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| GP14 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP15 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| GP16 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP17 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP18 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP19 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| GP20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP21 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| GP22 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| GP23 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| GP24 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |

G0 – agalaktozilirani glikani, G1 – monogalaktozilirani glikani, G2 – digalaktozilirani glikani, S0 – asijalinizirani glikani, S1 – monosijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, B – glikani s računjućim N-acetilglukozaminom (GlcNAc), CF – glikani sa sržnom fukozom, HM – oligomanozni glikani, 0 – površina glikanskog pika (GP) nije uključena u izračun, 1 – GP površina uključena je u izračun. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Tablica 6. Izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina

| GP | LB | HB | G0 | G1 | G2 | G3 | G4 | S1 | S2 | S3 | S4 | B | AF | CF | HM |
|------|-----|----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|----|---|----|----|-----|
| GP1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| GP3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| GP4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP5 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP6 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| GP7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| GP8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| GP10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP11 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| GP12 | 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 | 0 | 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.5 |
| GP13 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP14 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| GP16 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP17 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| GP18 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| GP20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP21 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP22 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP23 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| GP24 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP25 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP26 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP27 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| GP28 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP29 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP30 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP31 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP32 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP33 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| GP34 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| GP35 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| GP36 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP37 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP38 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GP39 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |

LB – nisko razgranati glikani, HB – visoko razgranati glikani, G0 – agalaktozilirani glikani, G1 – monogalaktozilirani glikani, G2 – digalaktozilirani glikani, G3 – trigalaktozilirani glikani, G4 – tetragalaktozilirani glikani, S1 – monosijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, S3 –

trisijalinizirani glikani, S4 – tetrasijalinizirani glikani, B – glikani s račvajućim *N*-acetilglukozaminom (GlcNAc), AF – glikani s antenarnom fukozom, CF – glikani sa sržnom fukozom, HM – oligomanozni glikani, 0 – površina glikanskog pika (GP) nije uključena u izračun, 0.5 – polovica GP površine uključena je u izračun, 1 – GP površina u potpunosti je uključena u izračun. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KOMPONENTE C3 SUSTAVA KOMPLEMENTA

Apsorbancija komponente C3 sustava komplementa (C3) izmjerena je u uzorcima plazme korištenjem komercijalno dostupnog ljudskog Complement C3 ELISA Kit-a (ab108822) na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 450 nm. Uzorci 40 ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 odabrani su u svrhu pokrivanja cijelog raspona prethodno određenih razina oligomanoznog Man9 glikana. Svi uzorci izmjereni su u duplikatima te je korelacija između C3 i Man9 određena za uzorke s koeficijentom varijacije nižim od 10 (ukupno 30 uzoraka) korištenjem generalizirane linearne regresije (GraphPad Prism, v 8.4.0 za Windows-e, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

2.5. GENOMSKA ASOCIJACIJSKA STUDIJA

U prvotnom istraživanju, 183 546 polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) kod 1105 djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 analizirano je uz pomoć komercijalnog DNA čipa (ImmunoChip, Illumina Infinium) (147). Kontrola kvalitete (QC, engl. *quality control*) genotipiziranja provedena je korištenjem programa PLINK v 1.07 (148). Ukupno 177 022 markera prošlo je inicijalni QC koji uključuje kvalitetu genotipiziranja na razini uzorka (engl. *sample call rate*) te podudarnost prijavljenog spola s genotipiziranim spolom. Iz daljnje analize isključeni su SNP-ovi koji su uspješno genotipizirani u manje od 95 % uzoraka, kao i SNP-ovi čija je učestalost rijetkog alela (MAF, engl. *minor allele frequency*) u ukupnom uzorku manja od 5 %. Ukupno, 108 428 SNP-ova prošlo je QC te je zadržano u daljnjim analizama. Srednja vrijednost stope genotipiziranja ispitanika bila je 99 %. Iz razloga što bolest i populacijska struktura mogu uzrokovati odstupanje od principa Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE, engl. *Hardy-Weinberg equilibrium*) (149) što bi dovelo do propuštanja prisutnih genskih asocijacija, SNP-ovi nisu filtrirani na odstupanje od principa HWE. Računalni algoritam eksportirao je Illumina TOP alele. Asocijacije između razina glikana i pojedinačnih SNP-ova testirane su korištenjem “qassoc” funkcije u PLINK-u (148). Značajne razlike pretpostavljene su za vrijednosti $p < 5 \times 10^{-8}$, pri čemu je *p*-vrijednost nadalje korigirana Bonferroni metodom na ukupan broj testiranih *N*-glikana (39 *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i 21 neovisan IgG *N*-glikan). Značajne razlike pretpostavljene su za

vrijednosti $p < 5 \times 10^{-8}$, pri čemu je p -vrijednost nadalje korigirana Bonferroni metodom na ukupan broj testiranih N -glikana (39 N -glikana ukupnih plazmatskih proteina i 21 neovisan IgG N -glikan (29)). Informacija o LD-u dobivena je korištenjem programa SNIIPA (SNIIPA v3.4 iz studenog 2020., GRCh37.p13, Ensembl v 87, 1000 genomes phase 3 v5, Europska populacija (150)).

Kompetitivni PCR specifičan za alele (KASP, engl. *Kompetitive Allele Specific PCR*; KASPTM, LGC Genomics, UK) korišten je za genotipizaciju uoraka u validacijskoj kohorti u kojoj su ispitanicima određeni svi signifikantni SNP-ovi iz prvotnog istraživanja. Od ukupno 21 SNP-a, 18 je uspješno genotipizirano (validaciju nisu prošli rs137707, rs1047286 i rs137702). U svrhu validacije rezultata prvotnog istraživanja, korišteni su N -glikanski podaci analizirani kroz 24 serije (engl. *batch*) unutar prvotnog istraživanja te kroz 5 serija unutar obiteljskog istraživanja. U svrhu spajanja N -glikanskih podataka iz prvotnog i obiteljskog istraživanja, procijenjeni efekti serije (engl. *batch effect*) su uklonjeni uz pomoć ComBat metode (R paket sva (151)). Svi uzorci ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 su ponovo analizirani u obiteljskom istraživanju te su isti standardni uzorci korišteni u prvotnom i obiteljskom istraživanju. Navedeno je iskorišteno u svrhu procjene tehničkih efekata istraživanja korištenjem linearnog mješovitog modela (R paket lme4 (152)) te je procijenjeni efekt oduzet od podataka. Efekt genotipa na N -glikanske udjele procijenjen je korištenjem linearnog mješovitog modela s glikanskim udjelom kao zavisnom varijablom te genotipom, statusom bolesti i interakcijom između statusa bolesti i genotipa kao nezavisnim varijablama. Spol i dob su uključeni u model kao nezavisne fiksne varijable, a informacija o ispitaniku (*family ID*) kao nasumični odsječak. Prije analize podaci su logit transformirani u varijable s normalnom raspodjelom. Značajne razlike pretpostavljene su za vrijednosti $p < 0,05$ pri čemu je p -vrijednost nadalje korigirana Bonferroni metodom na ukupan broj testova (neovisnih novootkrivenih glikan-SNP asocijacija).

2.6. STATISTIČKA ANALIZA N -GLIKANA

Podaci su normalizirani s obzirom na ukupnu površinu kromatograma (engl. *total area normalization*), pri čemu se udio površine svakog kromatografskog pika dijeli s ukupnom površinom kromatograma u svrhu mogućnosti usporedbe dobivenih mjerenja. Normalizirani podaci su zatim logaritamski transformirani zbog svoje desno pomaknute distribucije nakon čega je uslijedila korekcija na razlike u serijama (engl. *batch correction*) uz pomoć ComBat metode (R paket sva (151)). Nakon izvođenja korekcije, podaci su vraćeni iz logaritamske transformacije. Prije statističkog modeliranja podaci su transformirani metodom inverzne

transformacije rankova u varijable s normalnom raspodjelom u svrhu uspoređivanja procijenjenih učinaka različitih glikana na način da svi glikani imaju istu standardiziranu varijancu (R paket GenABEL (153)).

Dodatna derivirana svojstva izračunata su iz izravno izmjerenih glikanskih svojstava (npr. ukupna galaktozilacija, sijalinizacija, fukožilacija). Utjecaj spola i dobi na *N*-glikom ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 procijenjen je korištenjem linearnog modela s glikanskom površinom kao zavisnom varijablom i spolom (razine: muški/ženski spol) unakrsno s dobi (razine: jako mlada djeca, pred-pubertet, pubertet, post-pubertet) kao nezavisnim varijablama. *Post hoc* parna usporedba, unutar istog spola ili iste dobne skupine, napravljena je korištenjem dvosmjernog (engl. *two tailed*) t-testa (R paket emmeans (154)). Kod djece s poznatim razinama autoantitijela (na IA2, GAD, ZnT8R ili ZnT8W) promjena u glikozilaciji procijenjena je korištenjem linearnog modela pri čemu su glikanske varijable modelirane kao zavisne varijable, dok je razina autoantitijela (c_{ab}) modelirana kao nezavisna varijabla uzimajući u obzir razine više od limita kvantifikacije (LOQ_{ab}) korištenjem indikatorske varijable (I):

$$glikan(c_{ab}, I) = b_0 + I \times b_1 \times c_{ab} + (1 - I) \times b_2 \quad I = \begin{cases} 1 & \text{ako } c_{ab} < LOQ_{ab} \\ 0 & \text{ako } c_{ab} \geq LOQ_{ab} \end{cases}$$

pri čemu je b_0 odsječak, a b_1 i b_2 su procijenjeni efekti razine autoantitijela na udjele glikana. Analiza je korigirana na spol i dob. Promjena u glikozilaciji je također procijenjena korištenjem linearnog modela s glikanskim varijablama kao zavisnim varijablama i brojem autoantitijela (razine: 1, 2, 3 ili 4), spolom i dobi kao nezavisnim varijablama.

Povezanost statusa bolesti i *N*-glikoma procijenjena je na izmjerenim glikanima svih uključenih srodnika korištenjem regulariziranog logističkog modela ($\alpha = 0.1$, $\lambda = 10^{-4}$) te uspoređivanjem površine ispod krivulje (AUC, engl. *area under curve*) dvije ROC krivulje (engl. *receiver operating characteristic curve*) dobivene iz dva modela (R paketi glmnet (155) i pROC (156)). Prvi model uključio je status bolesti kao zavisnu varijablu, dok su spol, dob i svi standardizirani kromatografski pikovi modelirani kao nezavisne fiksne varijable, a informacija o ispitaniku (*family ID*) kao nasumični efekt. Drugi model je modeliran na isti način kao i prvi model, ali s izostavljenim kromatografskim pikovima. U svrhu evaluacije diskriminacijske točnosti regulariziranog logističkog modela, korištena je procedura deseterostruke unakrsne validacije nakon čega je izračunata AUC vrijednost. Usporedba AUC vrijednosti ROC krivulja napravljena je pomoću *bootstrap* metode ponovnog uzorkovanja s 2000 replikata (R paket pROC (156)).

Zbog višestrukih mjerenja stopa lažnih otkrića (FDR, engl. *false discovery rate*) kontrolirana je Benjamini-Hochberg metodom pri vrijednosti $p < 0,05$ (157). Statistička analiza provedena je korištenjem programskog jezika R (v 3.5.2) (158).

3. REZULTATI

3. Rezultati

3.1. N-glikozilacija u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1

Tablica 7 prikazuje deskriptivnu statistiku ispitivane populacije. Tablice 8 i 9 prikazuju N-glikanski profil ispitanika uključenih u obiteljsko istraživanje, točnije djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika za statistički značajno različite N-glikane između ispitivanih skupina. pri čemu je istaknut i N-glikanski profil dva zdrava srodnika koja su naknadno razvila šećernu bolest tipa 1. Povezanost N-glikozilacije sa statusom šećerne bolesti tipa 1 prikazuju tablice 10 i 11.

Tablica 7. Deskriptivna statistika ispitivane populacije

| Istraživanje | Prvotno (djeca i adolescenti s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1) | | | | Prvotno (s određenim autoantitijelima grupiranim po broju) | | | | Obiteljsko | |
|---|---|---------------|------------------|------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| | Jako mladi | Pre-pubertet | Pubertet | Post-pubertet | 1 | 2 | 3 | 4 | Zdravi srodnici | Šećerna bolest tipa 1 |
| Skupina | | | | | | | | | | |
| Broj ispitanika | 391 | 918 | 550 | 58 | 13 | 34 | 72 | 181 | 244 | 188 |
| Broj žena | 192 | 352 | 312 | 48 | 8 | 14 | 28 | 86 | 116 | 86 |
| Dob žena, medijan (raspon), godine | 4,2 (0,6 – 6) | 8,8 (6 – 11) | 12,6 (11 – 15) | 16 (15 – 19,1) | 12,7 (6,9 – 14,5) | 10,7 (2,3 – 14,4) | 9,2 (4,7 – 14,9) | 9,7 (0,6 – 16,1) | 11 (2 – 23) | 9,7 (0,6 – 16,1) |
| Broj muškaraca | 199 | 566 | 238 | 10 | 5 | 20 | 44 | 95 | 128 | 102 |
| Dob muškaraca, medijan (raspon), godine | 4 (0,6 – 6) | 10,3 (6 – 13) | 14,3 (13 – 16,9) | 17,4 (17 – 18,3) | 10,2 (5,4 – 11,8) | 11,4 (2 – 15,9) | 11,5 (2,4 – 17,6) | 10,7 (2,6 – 16,1) | 11 (2 – 23) | 10,1 (1,4 – 16,9) |

Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Tablica 8. Deskriptivna statistika N-glikana ukupnih plazmatskih proteina djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika za statistički značajno različite N-glikane između ispitivanih skupina. Istaknut je N-glikanski profil dva zdrava srodnika koja su naknadno razvila šećernu bolest tipa 1 (ZS₁ i ZS₂).

| GP | Zdravi srodnici (ZS) | | | | | Djeca i adolescenti novodijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 1 | | | |
|-----|----------------------|------|------|----------|----------|---|------|------|--|
| | Medijan | Q1 | Q3 | Površina | Površina | Medijan | Q1 | Q3 | |
| GP2 | 1,74 | 1,58 | 1,94 | 1,62 | 1,03 | 1,92 | 1,71 | 2,17 | |
| GP4 | 5,02 | 4,46 | 5,57 | 3,67 | 3,33 | 4,65 | 3,86 | 5,21 | |
| GP5 | 2,05 | 1,79 | 2,35 | 1,24 | 1,37 | 1,86 | 1,49 | 2,21 | |
| GP7 | 1,05 | 0,94 | 1,15 | 0,79 | 0,73 | 1,08 | 0,99 | 1,19 | |

3. Rezultati

| | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| GP10 | 5,43 | 4,97 | 5,91 | 4,17 | 3,37 | 4,93 | 4,45 | 5,51 |
| GP12 | 1,48 | 1,36 | 1,65 | 1,56 | 1,23 | 1,6 | 1,47 | 1,74 |
| GP17 | 1,55 | 1,32 | 1,88 | 0,83 | 0,8 | 1,59 | 1,31 | 2 |
| GP21 | 0,54 | 0,5 | 0,58 | 0,59 | 0,55 | 0,56 | 0,53 | 0,6 |
| GP22 | 3,35 | 3,03 | 3,7 | 2,78 | 3,54 | 3,52 | 3,14 | 3,97 |
| GP23 | 1,26 | 1,06 | 1,48 | 0,77 | 0,89 | 1,31 | 1,07 | 1,54 |
| GP25 | 0,18 | 0,17 | 0,19 | 0,19 | 0,19 | 0,19 | 0,18 | 0,21 |
| GP29 | 0,19 | 0,17 | 0,22 | 0,23 | 0,26 | 0,21 | 0,19 | 0,24 |
| HM | 3,56 | 3,32 | 3,78 | 3,33 | 2,75 | 3,67 | 3,47 | 3,89 |
| B | 7,01 | 6,43 | 8,05 | 5,01 | 3,95 | 7,29 | 6,46 | 8,35 |
| G1 | 8,95 | 7,84 | 9,8 | 6,06 | 5,6 | 8,13 | 7 | 9,24 |

ZS₁ – zdravi ispitanik koji je razvio šećernu bolest tipa 1 unutar pet godina, ZS₂ – zdravi ispitanik koji je razvio šećernu bolest tipa 1 unutar devet godina, GP – glikanski pik, G1 – monogalaktozilirani glikani, B – glikani s račvajućim *N*-acetilglukozaminom (GlcNAc), HM – oligomanozni glikani. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Tablica 9. Deskriptivna statistika *N*-glikana IgG-a djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika za statistički značajno različite *N*-glikane između ispitivanih skupina. Istaknut je *N*-glikanski profil dva zdrava srodnika koja su naknadno razvila šećernu bolest tipa 1 (ZS₁ i ZS₂).

| GP | Zdravi srodnici (ZS) | | | | ZS ₁ | ZS ₂ | Djeca i adolescenti novodijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 1 | | |
|------|----------------------|-------|-------|----------|-----------------|-----------------|---|-------|--|
| | Medijan | Q1 | Q3 | Površina | Površina | Medijan | Q1 | Q3 | |
| GP5 | 0,17 | 0,15 | 0,19 | 0,25 | 0,11 | 0,18 | 0,16 | 0,21 | |
| GP6 | 3,38 | 2,9 | 3,86 | 3,79 | 2,25 | 3,82 | 3,2 | 4,4 | |
| GP8 | 22,15 | 21,1 | 23,57 | 21,67 | 23,3 | 21,05 | 20,03 | 22,34 | |
| GP9 | 8,61 | 7,91 | 9,36 | 7,28 | 9,27 | 8,29 | 7,37 | 9,11 | |
| GP11 | 0,43 | 0,39 | 0,49 | 0,43 | 0,27 | 0,46 | 0,42 | 0,52 | |
| GP15 | 1,26 | 1,07 | 1,5 | 1,18 | 0,72 | 1,31 | 1,13 | 1,54 | |
| GP17 | 0,74 | 0,65 | 0,84 | 0,76 | 0,69 | 0,74 | 0,66 | 0,85 | |
| GP19 | 1,42 | 1,25 | 1,59 | 1,25 | 0,96 | 1,52 | 1,34 | 1,69 | |
| GP20 | 0,25 | 0,21 | 0,29 | 0,24 | 0,26 | 0,26 | 0,22 | 0,31 | |
| GP21 | 0,55 | 0,51 | 0,61 | 0,53 | 0,59 | 0,57 | 0,51 | 0,63 | |
| GP22 | 0,17 | 0,15 | 0,19 | 0,16 | 0,17 | 0,18 | 0,15 | 0,21 | |
| GP24 | 1,35 | 1,2 | 1,55 | 1,25 | 1,03 | 1,5 | 1,32 | 1,75 | |
| S0 | 55,24 | 53,18 | 57,43 | 53,02 | 53,54 | 53,2 | 50,85 | 55,39 | |
| S2 | 4,22 | 3,81 | 4,6 | 3,93 | 4,55 | 4,44 | 4,03 | 5,01 | |
| B | 12,1 | 10,93 | 13,35 | 11,98 | 7,74 | 12,89 | 11,71 | 14,23 | |
| G1 | 38,47 | 37,05 | 39,58 | 35,62 | 38,34 | 36,49 | 35,2 | 38,13 | |

ZS₁ – zdravi ispitanik koji je razvio šećernu bolest tipa 1 unutar pet godina, ZS₂ – zdravi ispitanik koji je razvio šećernu bolest tipa 1 unutar devet godina, GP – glikanski pik, G1 – monogalaktozilirani glikani, S0 – asijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, B – glikani s račvajućim *N*-acetilglukozaminom (GlcNAc). Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

3. Rezultati

Tablica 10. Povezanost izravno mjerenih i deriviranih *N*-glikanskih svojstava ukupnih plazmatskih proteina sa statusom bolesti (prikazani su samo statistički značajni rezultati).

| <i>Glikan</i> | <i>Opis</i> | <i>OR</i> | <i>95 % CI</i> | <i>SE</i> | <i>P</i> |
|---------------|--|-----------|----------------|-----------|----------|
| GP2 | Postotak FA2B u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 2,09 | 1,58 – 2,76 | 0,30 | 1,16E-05 |
| GP4 | Postotak FA2[6]G1 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 0,60 | 0,46 – 0,79 | 0,08 | 2,16E-03 |
| GP5 | Postotak FA2[3]G1 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 0,64 | 0,47 – 0,86 | 0,10 | 1,32E-02 |
| GP7 | Postotak M6 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,69 | 1,28 – 2,24 | 0,24 | 2,01E-03 |
| GP10 | Postotak FA2G2 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 0,57 | 0,43 – 0,76 | 0,08 | 1,24E-03 |
| GP12 | Postotak M7 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina; Postotak A2G2S1 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,86 | 1,37 – 2,53 | 0,29 | 1,15E-03 |
| GP17 | Postotak FA2BG2S1 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,47 | 1,08 – 2 | 0,23 | 5,04E-02 |
| GP21 | Postotak A2G2S2 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,52 | 1,16 – 1,98 | 0,21 | 8,56E-03 |
| GP22 | Postotak FA2G2S2 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,74 | 1,32 – 2,29 | 0,25 | 1,15E-03 |
| GP23 | Postotak FA2BG2S2 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,66 | 1,23 – 2,25 | 0,26 | 5,61E-03 |
| GP25 | Postotak A3G3S2 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 2,12 | 1,56 – 2,87 | 0,33 | 4,54E-05 |
| GP29 | Postotak A3G3S3 u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,62 | 1,2 – 2,19 | 0,25 | 7,12E-03 |
| B | Postotak struktura s račvućim GlcNAc-om u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,72 | 1,26 – 2,34 | 0,27 | 3,52E-03 |
| G1 | Postotak monogalaktoziliranih struktura u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 0,63 | 0,47 – 0,84 | 0,09 | 7,01E-03 |
| HM | Postotak oligomanoznih struktura u <i>N</i> -glikomu ukupnih plazmatskih proteina | 1,65 | 1,26 – 2,16 | 0,23 | 2,16E-03 |

GP – glikanski pik; OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti; SE – standardna pogreška (engl. *standard error*). Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Tablica 11. Povezanost izravno mjerenih i deriviranih *N*-glikanskih svojstava IgG-a sa statusom bolesti (prikazani su samo statistički značajni rezultati).

| <i>Glikan</i> | <i>Opis</i> | <i>OR</i> | <i>95 % CI</i> | <i>SE</i> | <i>P</i> |
|---------------|---|-----------|----------------|-----------|----------|
| GP5 | Postotak M5 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,53 | 1,17 – 1,99 | 0,21 | 3,89E-03 |
| GP6 | Postotak FA2B u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,71 | 1,31 – 2,24 | 0,23 | 3,02E-04 |
| GP8 | Postotak FA2[6]G1 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 0,40 | 0,3 – 0,54 | 0,06 | 7,95E-09 |
| GP9 | Postotak FA2[3]G1 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 0,69 | 0,52 – 0,93 | 0,10 | 2,73E-02 |
| GP11 | Postotak FA2[3]BG1 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,90 | 1,43 – 2,54 | 0,28 | 4,26E-05 |
| GP15 | Postotak FA2BG2 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 2,09 | 1,52 – 2,87 | 0,34 | 3,49E-05 |
| GP17 | Postotak A2G2S1 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,41 | 1,07 – 1,85 | 0,20 | 2,73E-02 |
| GP19 | Postotak FA2BG2S1 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 2,91 | 2,09 – 4,05 | 0,49 | 4,90E-09 |
| GP20 | Struktura nije određena | 1,60 | 1,21 – 2,1 | 0,22 | 2,29E-03 |
| GP21 | Postotak A2G2S2 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,69 | 1,28 – 2,24 | 0,24 | 6,24E-04 |
| GP22 | Postotak A2BG2S2 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,39 | 1,07 – 1,81 | 0,19 | 2,73E-02 |
| GP24 | Postotak FA2BG2S2 u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 2,62 | 1,94 – 3,54 | 0,40 | 4,90E-09 |
| B | Postotak struktura s račvujućim GlcNAc-om u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 2,16 | 1,61 – 2,89 | 0,32 | 1,65E-06 |
| G1 | Postotak monogalaktoziliranih struktura u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 0,37 | 0,27 – 0,51 | 0,06 | 7,95E-09 |
| HM | Postotak oligomanoznih struktura u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,53 | 1,17 – 1,99 | 0,21 | 3,89E-03 |
| S0 | Postotak asijaliniziranih struktura u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 0,50 | 0,37 – 0,68 | 0,08 | 3,56E-05 |
| S2 | Postotak disijaliniziranih struktura u <i>N</i> -glikomu IgG-a | 1,86 | 1,41 – 2,45 | 0,26 | 4,19E-05 |

GP – glikanski pik; OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti; SE – standardna pogreška (engl. *standard error*). Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Monogalaktozilacija IgG-a i ukupnih plazmatskih proteina pada u šećernoj bolesti tipa 1.

Statistički značajan pad G1 struktura IgG-a i ukupnih plazmatskih proteina uočen je kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1. Uzimajući u obzir sva IgG derivirana svojstva, najznačajnija razlika između ispitivanih skupina uočena je upravo za G1 svojstvo (OR = 0,37, $p = 7,95E-09$).

Udio struktura s račvajućim GlcNAc-om prisutnih na IgG-u i ukupnim plazmatskim proteinima raste u šećernoj bolesti tipa 1. Udio struktura s račvajućim GlcNAc-om prisutnih na IgG-u i ukupnim plazmatskim proteinima bio je povišen kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi s njihovim zdravim srođnicima. Među *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina, najznačajnija razlika između ispitivanih skupina opažena je za FA2B *N*-glikan s račvajućim GlcNAc-om (GP2), (OR = 2,09, $p = 1,16E-05$). Udio FA2B kod ukupnih plazmatskih proteina, kao i kod IgG-a, bio je povišen kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1.

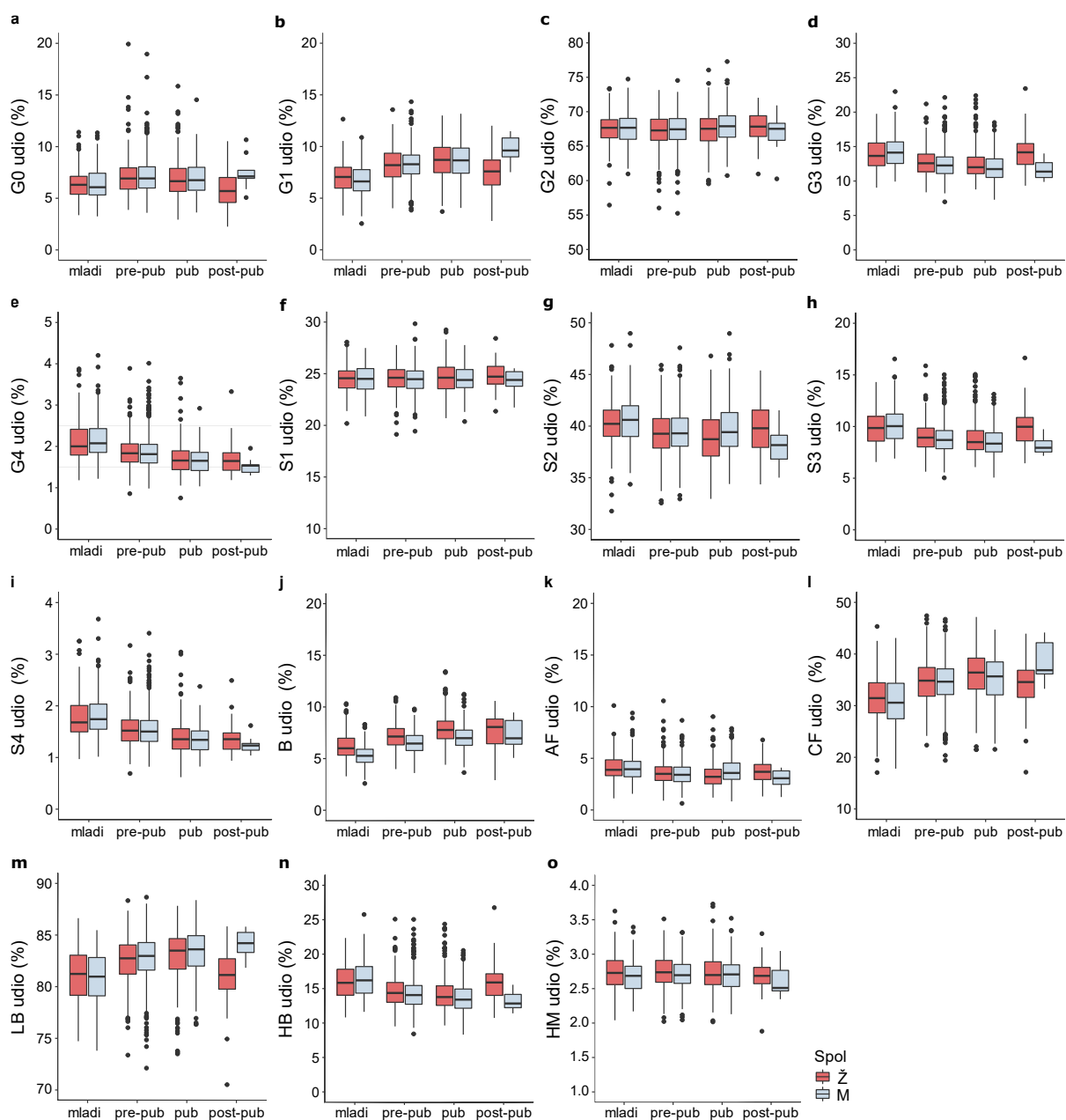
Udio disijaliniziranih IgG struktura raste u šećernoj bolesti tipa 1. Udio asijaliniziranih IgG struktura pada kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi sa zdravim srođnicima, dok udio disijaliniziranih IgG struktura raste. Ova promjena većinski je odraz porasta FA2BG2S2/GP24 (OR = 2,62, $p = 4,90E-09$). Među izravno mjerenim *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina, značajan porast opažen je kod nekih monosijaliniziranih, disijaliniziranih i trisijaliniziranih struktura kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi sa zdravim srođnicima. Najznačajniji porast opažen je za izravno mjereni trisijalinizirani A3G3S2 (GP25) glikan (OR = 2,12, $p = 4,54E-05$).

Udio oligomanoznih glikana prisutnih na IgG-u i ukupnim plazmatskim proteinima raste u šećernoj bolesti tipa 1. Udio oligomanoznog GP5 glikana IgG-a značajno je povišen kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 (OR = 1,53, $p = 3,89E-03$). Uzimajući u obzir sva derivirana svojstva ukupnih plazmatskih proteina, najznačajnija razlika između ispitivanih skupina zabilježena je za derivirano svojstvo koje opisuje oligomanozne glikane (OR = 1,65, $p = 2,16E-03$). Ova promjena većinski je odraz porasta GP7 i GP12 čije su glikanske stukture oligomanozni *N*-glikani sastavljeni od šest i od sedam manoznih jedinica.

3.2. N-glikozilacijske razlike između spolova i korelacija s dobi dijagnoze šećerne bolesti tipa 1

U svrhu ispitivanja *N*-glikozilacijskih razlika između spolova i korelacije s dobi dijagnoze šećerne bolesti tipa 1, 1917 djece i adolescenata s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 podijeljeno je prema spolu i u četiri dobne skupine (tablica 7). Naglasak je stavljen na derivirana *N*-glikanska svojstva koja su se značajno razlikovala između djece i adolescenata s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srođnika (slike 6 i 7).

3. Rezultati

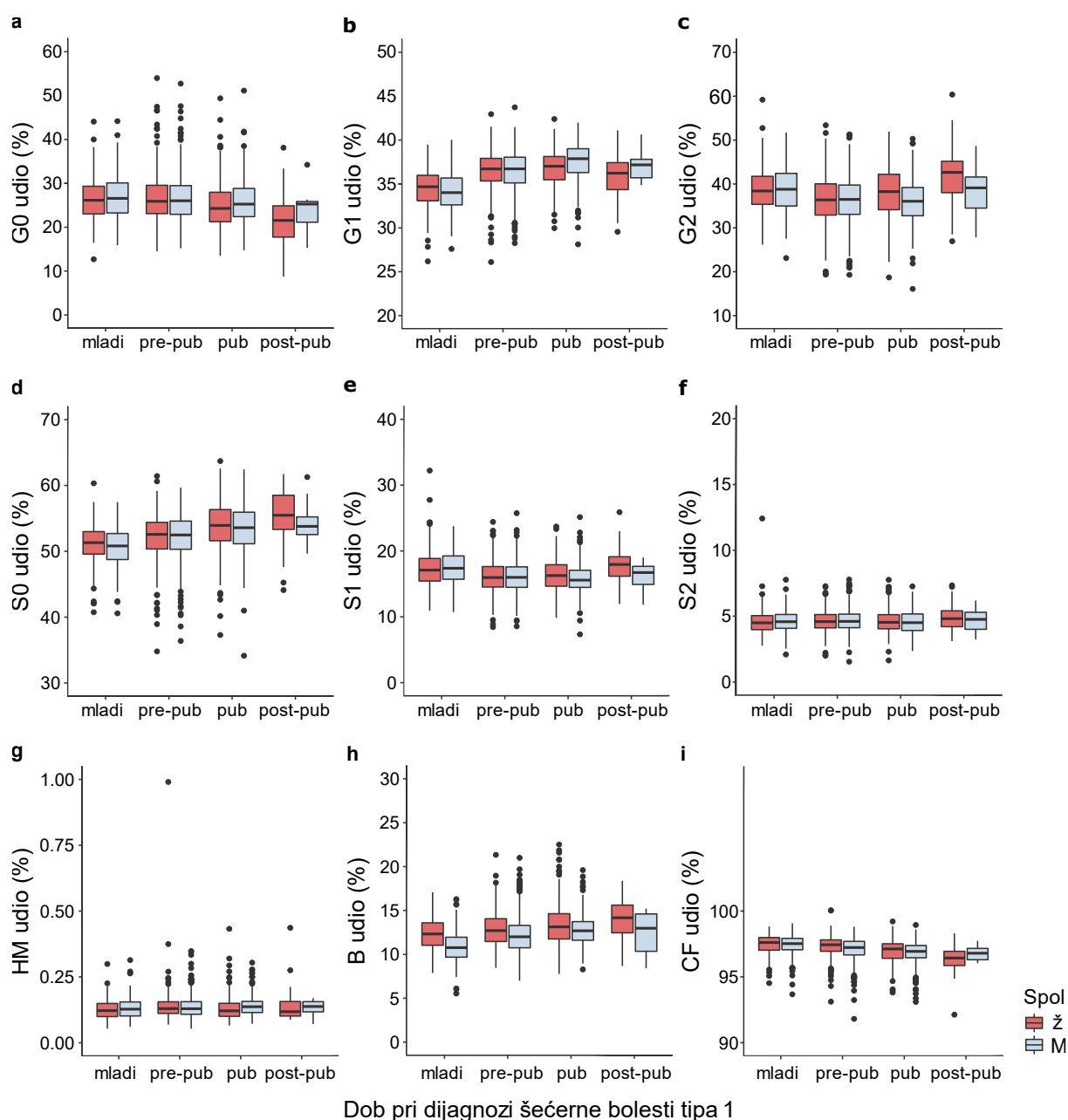


Dob pri dijagnozi šećerne bolesti tipa 1

Slika 6. Relativne zastupljenosti deriviranih *N*-glikanskih svojstava ukupnih plazmatskih proteina kod djece i adolescenata grupiranih prema dobi pri dijagnozi šećerne bolesti tipa 1 u četiri dobne skupine i između spolova. Udjeli su predočeni u obliku kutijastog dijagrama (engl. *box plot*). Medijan je predočen linijom unutar kutija, dok gornji i donji rub kutije omeđuje interkvartilni raspon (IQR, engl. *interquartile range*). Krajevi vertikalnih linija koje se pružaju iz kutija predstavljaju raspon vrijednosti, dok su odstupajuća mjerenja (engl. *outliers*) predočena kružićima. Pubertet je definiran s obzirom na dob, pri čemu je dobna granica za početak i kraj puberteta pomaknuta na više vrijednosti kod muškog spola. Mladi (dob 0,6 – 6), Pre-pub – pre-pubertet (dob 6 – 11/13), Pub – pubertet (dob 11/13 – 15/16,9), Post-pub – post-pubertet (dob 15/17 – 19,1/18,3), Ž – ženski spol, M – muški spol, G0 – agalaktozilirani glikani, G1 – monogalaktozilirani glikani, G2 – digalaktozilirani glikani, G3 – trigalaktozilirani glikani, G4 – tetragalaktozilirani glikani, S1 – monosijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, S3 – trisijalinizirani glikani, S4 – tetrasijalinizirani glikani, B – glikani s račvajućim *N*-acetilglukozaminom

3. Rezultati

(GlcNAc), AF – glikani s antenarnom fukozom, CF – glikani sa sržnom fukozom, HM – oligomanozni glikani. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).



Slika 7. Relativne zastupljenosti deriviranih *N*-glikanskih svojstava IgG-a kod djece i adolescenata grupiranih prema dobi pri dijagnozi šećerne bolesti tipa 1 u četiri dobne skupine i između spolova. Udjeli su predočeni u obliku kutijastog dijagrama (engl. *box plot*). Medijan je predočeni linijom unutar kutija, dok gornji i donji rub kutije omeđuje interkvartilni raspon (IQR, engl. *interquartile range*). Krajevi vertikalnih linija koje se pružaju iz kutija predstavljaju raspon vrijednosti, dok su odstupajuća mjerenja (engl. *outliers*) predočena kružićima. Pubertet je definiran s obzirom na dob, pri čemu je dobna granica za početak i kraj puberteta pomaknuta na više vrijednosti kod muškog spola. Mladi (dob 0,6 – 6), Pre-pub – pre-pubertet (dob 6 – 11/13), Pub – pubertet (dob 11/13 – 15/16,9), Post-pub – post-pubertet (dob 15/17 – 19,1/18,3), Ž – ženski spol, M – muški spol, G0 – agalaktozilirani glikani, G1 – monogalaktozilirani glikani, G2 – digalaktozilirani glikani, S0 – asijalizirani glikani, S1 –

monosijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, B – glikani s račvajućim *N*-acetilglukozaminom (GlcNAc), CF – glikani sa sržnom fukozom, HM – oligomanozni glikani. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Značajne razlike među spolovima i s obzirom na dob dijagoze šećerne bolesti tipa 1 uočene su za udjele G1 struktura ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a. Kod muškog spola, G1 udjeli su bili viši pri nastupu puberteta u usporedbi sa ženskim ispitanicima te su rasli s dobi dijagnoze šećerne bolesti tipa 1. G1 udjeli bili su niži u post-pubertetskoj skupini kod ženskih ispitanika, dok je porast zapažen u ostalim dobnim skupinama.

B strukture ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a razlikovale su se između spolova te su u većini slučajeva bile niže kod muških ispitanika u odnosu na ženske ispitanike. U oba spola zapažen je porast B struktura s dobi pri dijagnozi šećerne bolesti tipa 1.

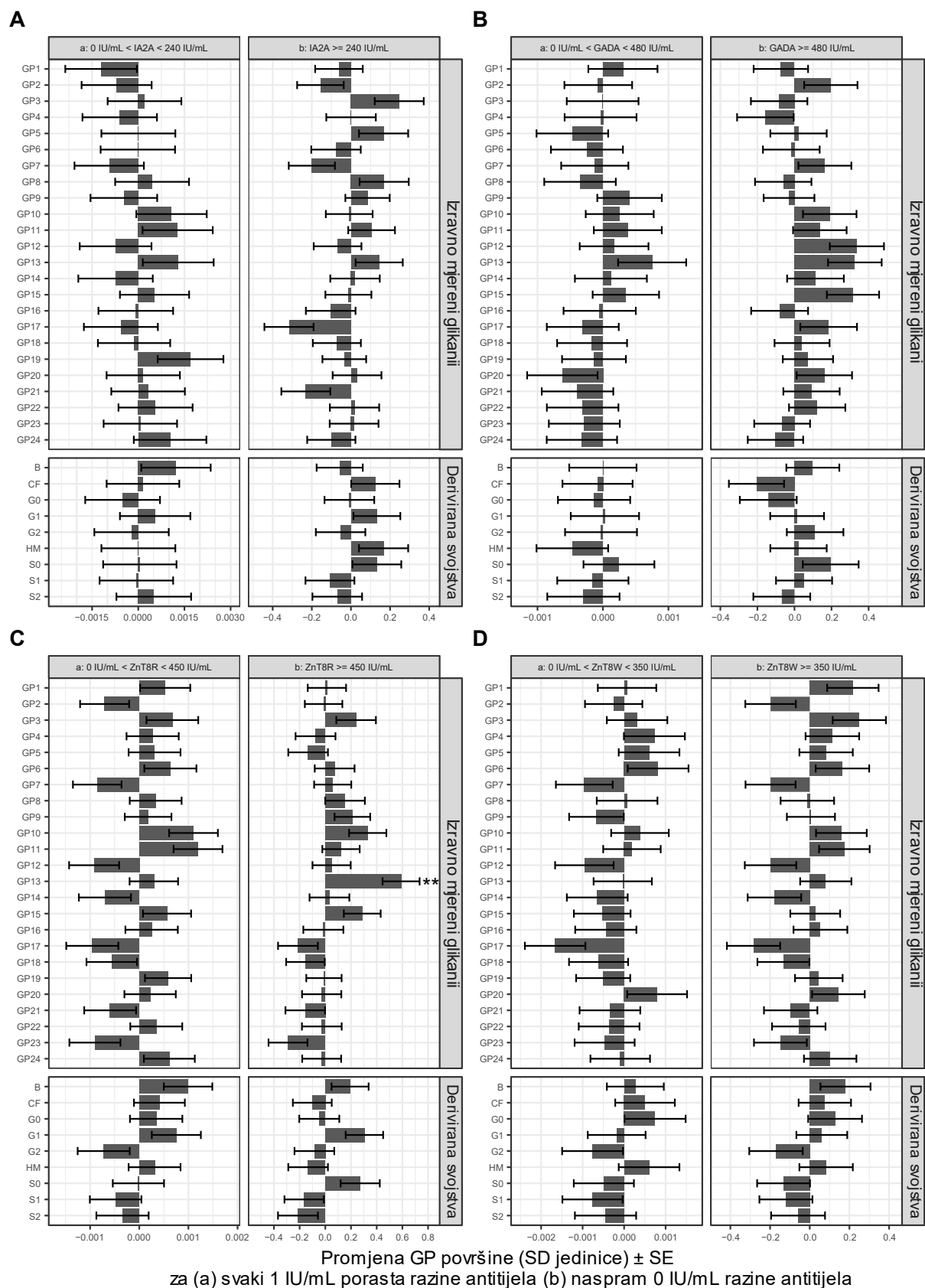
Udjeli HM struktura na ukupnim plazmatskim proteinima su bili viši kod jako mladih ženskih ispitanika i ženskih ispitanika u pre-pubertetskoj skupini, dok su udjeli HM struktura na IgG-u bili viši kod muških ispitanika s nastupom puberteta. Udjeli HM struktura na IgG-u kod ženskih ispitanika rasli su do pre-puberteta te zatim padali s prelaskom iz pre-puberteta u pubertet. Kod muških ispitanika, udjeli HM struktura bili su viši u pubertetskoj skupini u odnosu na jako mladu djecu.

Udjeli S0 struktura na IgG-u su većinski rasli s dobi pri dijagnozi šećerne bolesti tipa 1.

3.3. Korelacija *N*-glikozilacije i autoantitijela u šećernoj bolesti tipa 1

IgG GP13 statistički je značajno povezan s razinama ZnT8RA ($p = 7,66E-05$, $\beta = 0,590$). Povišenje broja različitih autoantitijela (1 – 4) koreliralo je s padom nekih visoko razgranatih *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina. Najznačajniji pad uočen je za GP30 koji predstavlja trigalaktozilirani i trisijalinizirani, triantenarni *N*-glikan ($p = 4,04E-04$, $\beta = -0,931$). Slika 8 prikazuje promjene *N*-glikozilacije povezane s razinama autoantitijela, dok tablica 12 i slika 9 prikazuju promjene *N*-glikozilacije povezane s porastom broja različitih autoantitijela (1 – 4).

3. Rezultati



Slika 8. Povezanost IgG N-glikana i (A) IA-2A – autoantitijela na tirozin-fosfatazu (IA-2A, engl. *insulinoma-associated protein 2 autoantibodies*), (B) GADA – autoantitijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase autoantibodies*), (C) ZnT8RA – autoantitijela

3. Rezultati

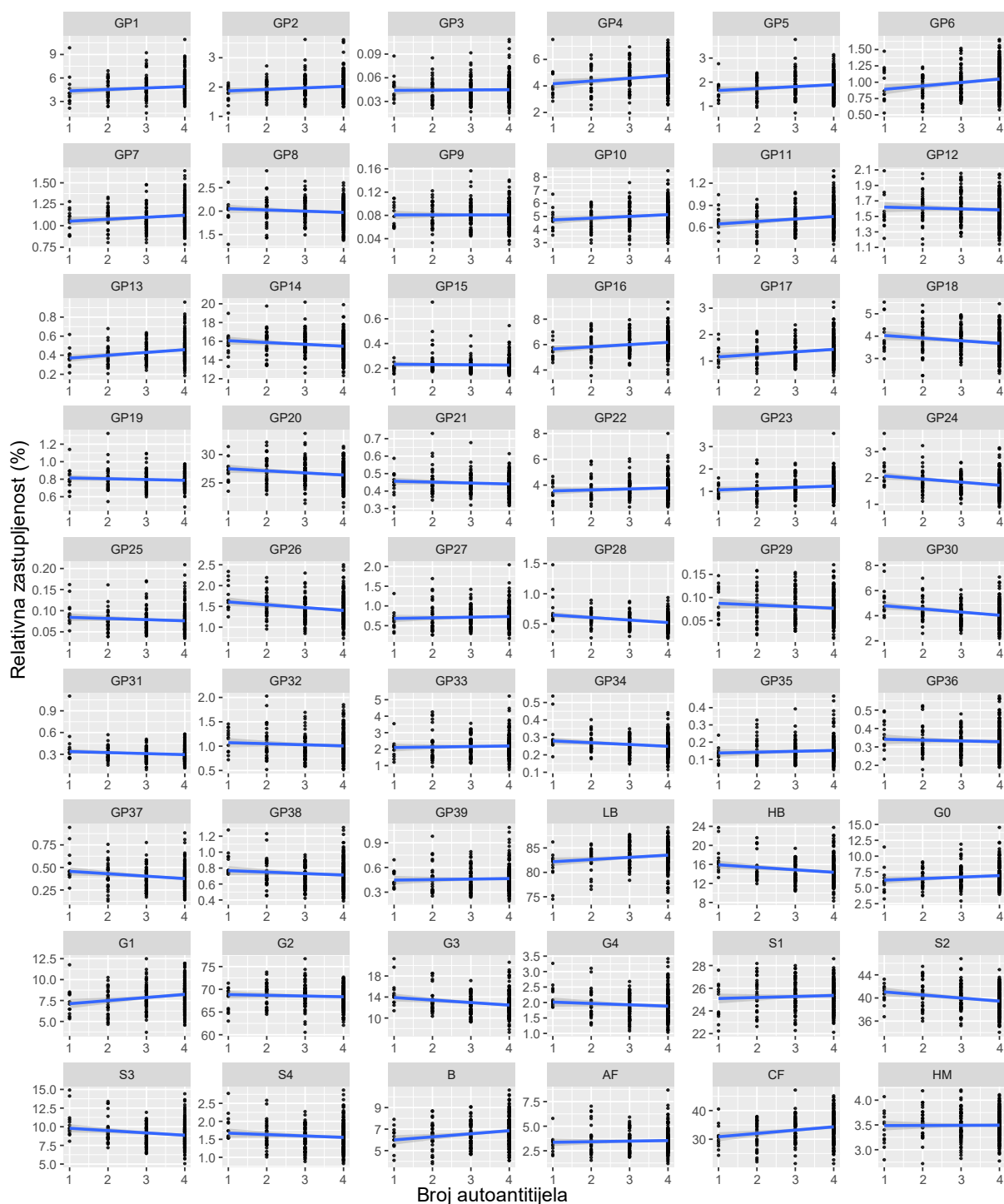
na arginin cink transporter 8 (engl. *arginine zinc transporter 8 autoantibodies*), (D) ZnT8WA – autoantitijela na triptofan cink transporter 8 (engl. *tryptophan zinc transporter 8 autoantibodies*). Značajna korelacija označena je sa zvijezdicom. GP – glikanski pik, G0 – agalaktozilirani glikani, G1 – monogalaktozilirani glikani, G2 – digalaktozilirani glikani, S0 – asijalinizirani glikani, S1 – monosijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, B – glikani s račvajućim *N*-acetilglukozaminom (GlcNAc), CF – glikani sa sržnom fukozom, HM – oligomanozni glikani. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

Tablica 12. Povezanost *N*-glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina s porastom broja autoantitijela (1 – 4); prikazani su samo statistički značajni rezultati.

| GP | Beta | SE | 95 % CI _{low} | 95 % CI _{up} | T-vrijednost | P-vrijednost |
|------|-------|------|------------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| GP24 | -0,87 | 0,19 | -1,24 | -0,50 | -4,65 | 1,98E-03 |
| GP28 | -0,86 | 0,18 | -1,22 | -0,50 | -4,66 | 1,83E-03 |
| GP30 | -0,93 | 0,19 | -1,30 | -0,56 | -4,99 | 4,04E-04 |
| GP37 | -0,78 | 0,18 | -1,13 | -0,42 | -4,34 | 7,50E-03 |
| HB | -0,77 | 0,19 | -1,14 | -0,40 | -4,13 | 1,79E-02 |
| G3 | -0,79 | 0,19 | -1,15 | -0,42 | -4,19 | 1,42E-02 |
| S3 | -0,75 | 0,19 | -1,12 | -0,38 | -4,00 | 3,07E-02 |

GP – glikanski pik, G3 – trigalaktozilirani glikani, S3 – trisijalinizirani glikani, HB – visoko-razgranati glikani. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

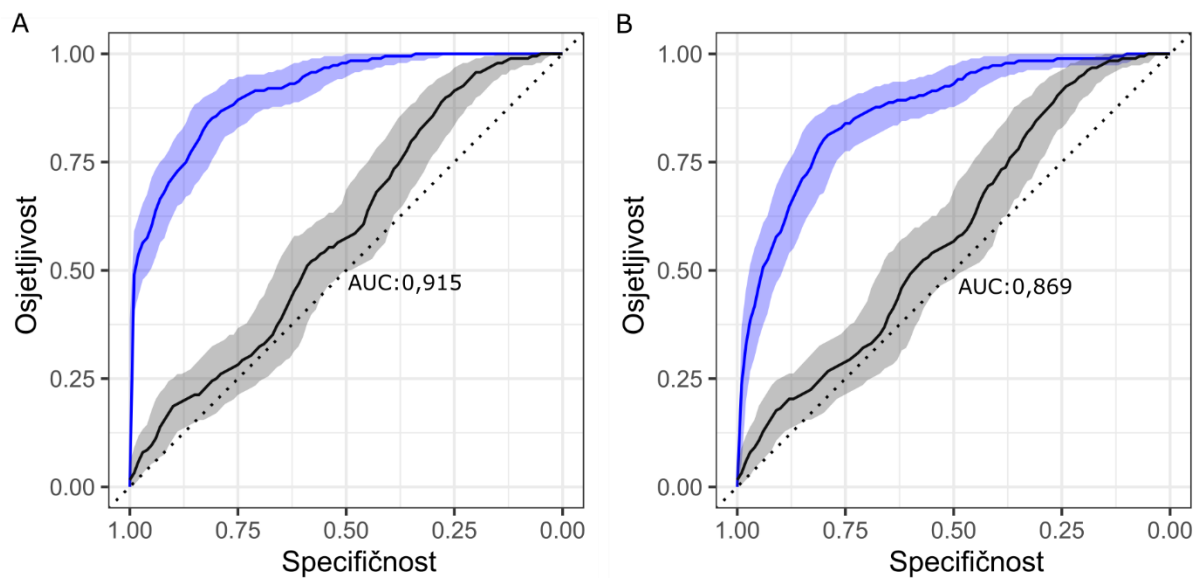
3. Rezultati



Slika 9. Povezanost *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina s porastom broja autoantitijela (1 – 4). Značajna povezanost opažena je za visoko razgranate strukture (GP24, GP28, GP30, GP37, G3, HB i S3). LB – nisko razgranati glikani, HB – visoko razgranati glikani, G0 – agalaktozilirani glikani, G1 – monogalaktozilirani glikani, G2 – digalaktozilirani glikani, G3 – trigalaktozilirani glikani, G4 – tetragalaktozilirani glikani, S1 – monosijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, S3 – trisijalinizirani glikani, S4 – tetrasijalinizirani glikani, B – glikani s računajućim *N*-acetilglukozaminom (GlcNAc), AF – glikani s antenarnom fukozom, CF – glikani sa sržnom fukozom, HM – oligomanozni glikani. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

3.4. *N*-glikozilacijski diskriminacijski model novodijagnosticirane šećerne bolesti tipa 1

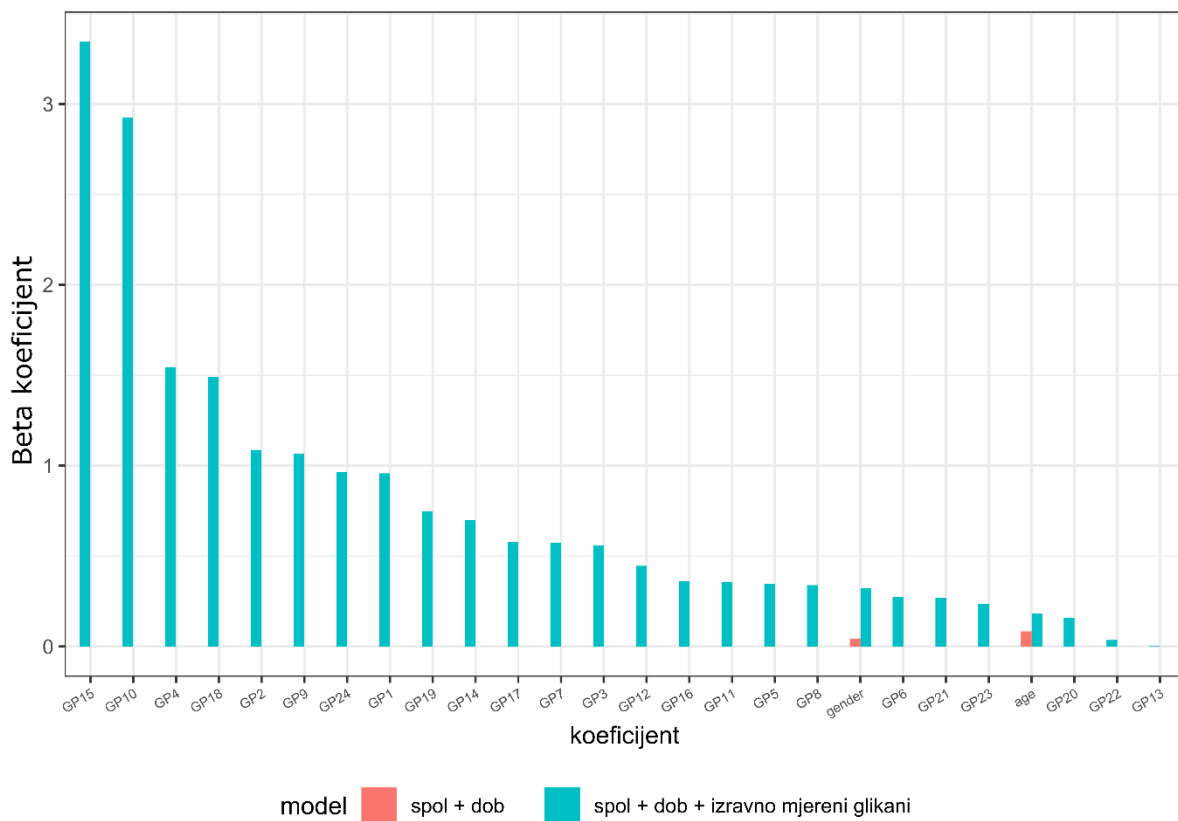
Za izradu *N*-glikozilacijskog diskriminacijskog modela (slika 10) korištena je logistička regresija. Kao prediktori korišteni su samo izravno mjereni *N*-glikani (24 IgG *N*-glikana i 39 *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina). U svrhu procjene učinkovitosti modela korištena je deseterostruka unakrsna validacija. Nulti model temeljen samo na dobi i spolu nije pokazao značajnu diskriminacijsku moć (AUC 0,58). Dodatak *N*-glikana u model znatno je povišio diskriminacijsku moć modela (AUC 0,87, 95 % CI 0,83 – 0,9 za dodatak IgG *N*-glikana i AUC 0,92, 95 % CI 0,89 – 0,94 za dodatak *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina). Slika 11 prikazuje klasifikacijsku učinkovitost pojedinačnih *N*-glikana identificiranu pomoću ROC krivulje.



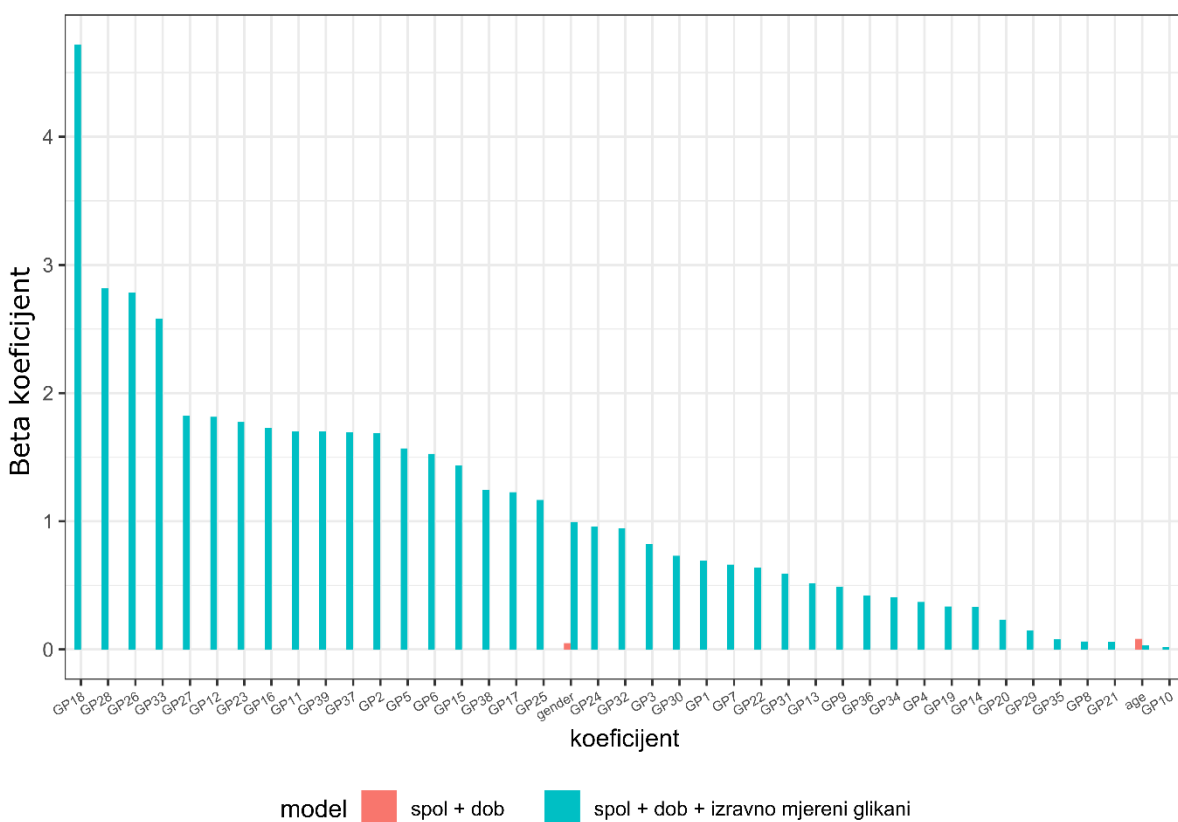
Slika 10. ROC krivulja koja opisuje učinkovitost *N*-glikozilacijskog diskriminacijskog modela u predviđanju statusa bolesti djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika. Model temeljen na spolu i dobi nije pokazao značajnu diskriminacijsku moć (crna linija), dok je dodatak *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina (A) i IgG-a (B) znatno povećao diskriminacijsku moć modela (plava linija). AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under curve*). Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

3. Rezultati

A



B



Slika 11. Klasifikacijska učinkovitost svakog pojedinačnog *N*-glikana IgG-a (A) i ukupnih plazmatskih proteina (B) u predviđanju statusa bolesti kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih

3. Rezultati

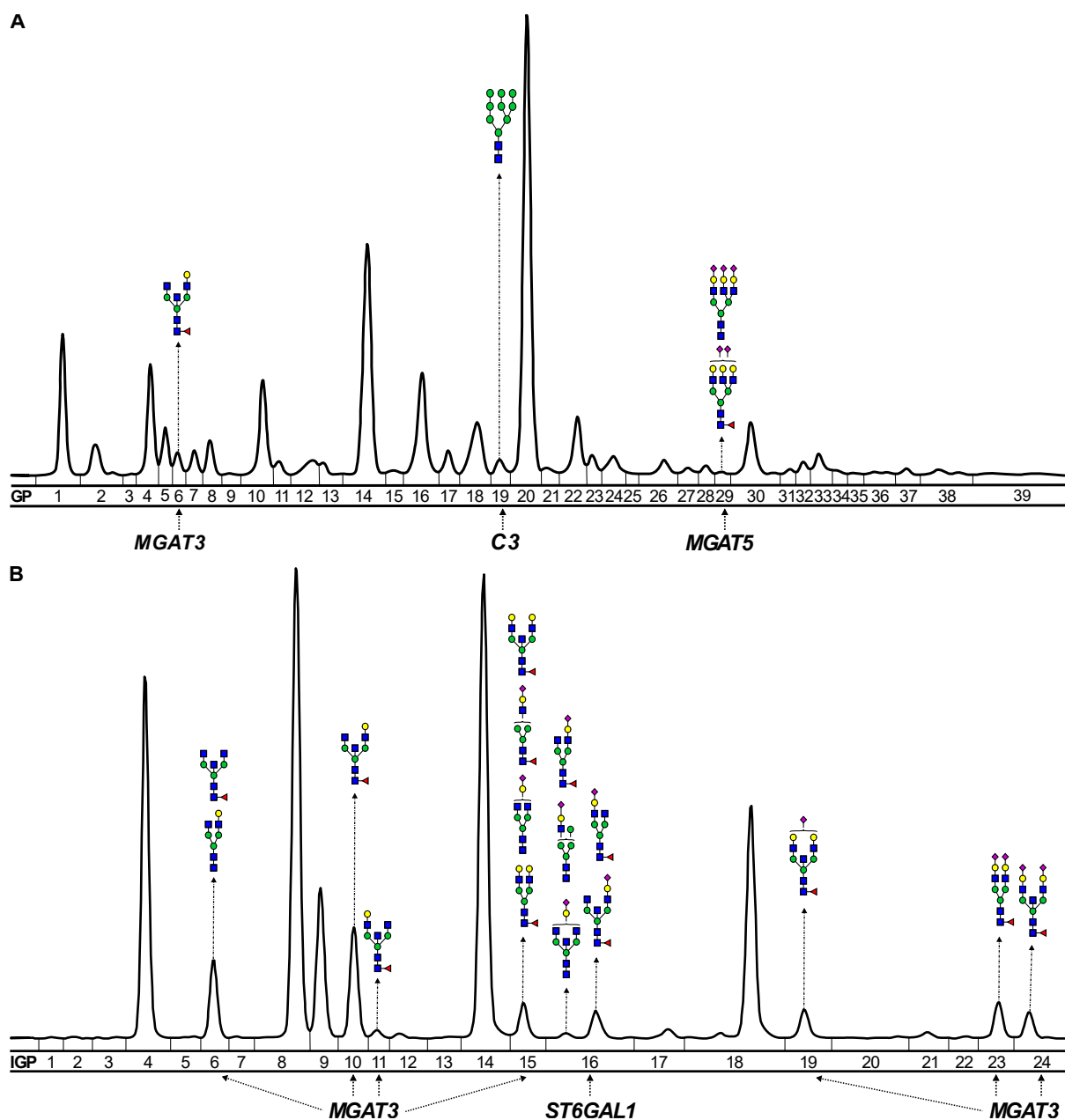
zdravih srodnika procijenjena pomoću ROC krivulje. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman i sur., 2022. (146).

3.5. Korelacija genoma i *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1

Nakon genotipizacije uzoraka 1105 djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 na preko 183 000 ImmunoChip varijanti, provedena je genomska asocijacijska studija u svrhu korelacije genoma i *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a. Validacija rezultata genomske asocijacijske studije provedena je na uzorku koji je uz 190 djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 uključio i 265 zdravih ispitanika. Tablica 13 prikazuje deskriptivnu statistiku ispitivane populacije. Tri prethodno identificirana *N*-glikozilacijska lokusa (*MGAT3*, *MGAT5* i *ST6GAL1*) (25), (26) povezana su s udjelima *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i/ili IgG-a u ovom istraživanju, kao i lokus koji do sada nije bio povezan s *N*-glikozilacijom, *C3* lokus (engl. *complement C3 gene*) na kromosomu 19 koji kodira komponentu C3 sustava komplementa (C3). Slika 12 sažeto prikazuje genske asocijacije s razinama *N*-glikana kod djece i adolescenata s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1. Tablice 14 i 15 prikazuju rezultate genomske asocijacijske studije.

Tablica 13. Deskriptivna statistika ispitivane populacije

| <i>Istraživanje</i> | <i>Prvotno</i> | <i>Validacijsko</i> | <i>Validacijsko</i> |
|---|-------------------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>Genotipizacijska metoda</i> | ImmunoChip, Illumina Infinium | KASPTM, LGC Genomics | KASPTM, LGC Genomics |
| <i>Status bolesti ispitanika</i> | Šećerna bolest tipa 1 | Šećerna bolest tipa 1 | Zdravi ispitanici |
| <i>Broj ispitanika</i> | 1105 | 190 | 265 |
| <i>Broj ispitanika s određenim N-glikanima ukupnih plazmatskih proteina</i> | 1074 | 175 | 264 |
| <i>Broj ispitanika s određenim N-glikanima IgG-a</i> | 1086 | 177 | 260 |
| <i>Medijan godina (raspon godina)</i> | 10 (1 – 18) | 10 (1 – 19) | 11 (2 – 23) |
| <i>Udio ženskih ispitanika (%)</i> | 47,6 | 43,6 | 47,7 |



Slika 12. Značajne genske asocijacije s *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina (A) i IgG-a (B). Plavi kvadrati, zeleni krugovi, žuti krugovi, ljubičasti dijamanti i crveni trokutovi predstavljaju *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), manozu, galaktozu, *N*-acetilneuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu) i fukozu. GP – glikanski pik. *MGAT3* – gen za β -1,4-manozil-glikoprotein 4- β -*N*-acetilglukozaminiltransferazu; *C3* – gen za komplement C3; *MGAT5* – gen za α -1,6-manozilglikoprotein 6- β -*N*-acetilglukozaminiltransferazu; *ST6GAL1* – gen za ST6 β -galaktozid α -2,6-sijaliltransferazu 1. Slika je izrađena korištenjem programa Inkscape (159) i korištenjem glikanskih struktura izrađenim u GlycoWorkbench programu (160).

3. Rezultati

Tablica 14. Geni značajno povezani s *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 u prvotnom i validacijskom istraživanju. Rezultati su uspoređeni s rezultatima GWAS-a na glikanima ukunih plazmatskih proteina koji je obuhvatio najveći broj ispitanika europskog porijekla (26) te su prikazani za istovjetnu glikan-SNP asocijaciju ili za SNP u LD-u ($R^2 > 0,5$) sa SNP-om identificiranim u ovom istraživanju i istovjetnim smjerom efekta na glikanske udjele.

| <i>Prvotno, DanDiabKids (N = 1105)</i> | | | | | | | | | | <i>Validacijsko, DanDiabKids (N = 455)</i> | | <i>Opća europska populacija (N = 4802) (26)</i> |
|--|----------------------------|----------------|-----------------------|------------|----------|---------------------|----------------------|----------|------------------|--|------------------|---|
| <i>GP</i> | <i>Glikanska struktura</i> | <i>Lokus</i> | <i>Gen (kandidat)</i> | <i>SNP</i> | <i>N</i> | <i>OA, MA (MAF)</i> | <i>R²</i> | <i>P</i> | <i>Beta (SE)</i> | <i>P</i> | <i>Beta (SE)</i> | <i>P</i> |
| GP29 | A3G3S3 | 2: 135 014 116 | <i>MGAT5</i> | rs2460382 | 1044 | A, G (0,21) | 0,04 | 3,14E-11 | 0,01 (0,002) | 2,27E-02 | 0,01 (0,003) | 5,95E-17 ^b |
| GP19 | Man9 | 19: 6 713 262 | <i>C3</i> | rs1047286 | 1033 | G, A (0,20) | 0,04 | 2,43E-11 | -0,03 (0,005) | 8,66E-04 ^a | -0,04 (0,012) | Asocijacija nije prijavljena |
| GP19 | Man9 | 19: 6 710 782 | <i>C3</i> | rs2230203 | 1045 | C, A (0,18) | 0,04 | 4,15E-11 | -0,03 (0,005) | 8,66E-04 | -0,04 (0,012) | Asocijacija nije prijavljena |
| GP6 | FA2[6]BG1 | 22: 39 843 409 | / (<i>MGAT3</i>) | rs5757678 | 1045 | A, G (0,27) | 0,04 | 1,48E-11 | 0,08 (0,012) | 8,63E-07 | 0,11 (0,021) | 7,98E-10 ^c |
| GP6 | FA2[6]BG1 | 22: 39 844 793 | / (<i>MGAT3</i>) | rs5757680 | 1034 | G, A (0,26) | 0,04 | 2,21E-11 | 0,08 (0,012) | 1,35E-06 | 0,10 (0,021) | 7,98E-10 ^c |

Istaknute asocijacije su identificirane u ovom istraživanju, dok u istraživanju opće europske populacije navedene asocijacije nisu prijavljene. Lokus je predstavljen s oznakama pripadajućeg kromosoma te pozicijom pripadajućih SNP-ova. Rezultati su prijavljeni za GRCh Build 37, a aleli su poravnati s Illumina TOP lancem. Efekt (beta) predstavlja promjenu relativne zastupljenosti glikana (%) i prijavljen je za rijetki alel. LD je određen korištenjem preglednika SNI_{PA} (150). GP – glikanski pik, N – broj ispitanika, OA – drugi/česti alel (engl. *other/major allele*), MA – rijetki alel (engl. *minor allele*), MAF – frekvencija rijetkog alela (engl. *minor allele frequency*), R^2 – postotak objašnjene glikanske varijacije, *MGAT5* – gen za α -1,6-manozilglikoprotein 6- β -*N*-acetilglukozaminiltransferazu, *MGAT3* – gen za β -1,4-manozil-glikoprotein 4- β -*N*-acetilglukozaminiltransferazu, *C3* – komplement C3 gen.

3. Rezultati

^aRezultati su prijavljeni za rs2230203.

^bRezultati su prijavljeni za rs1257220 ($R^2 = 0,98$ s rs2460382).

^cRezultati su prijavljeni za rs909674 ($R^2 = 0,91$ s rs5757678).

Tablica 15. Geni značajno povezani s *N*-glikanima IgG-a kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 u prvotnom i validacijskom istraživanju. Rezultati su uspoređeni s rezultatima GWAS-a na glikanima IgG-a koji je obuhvatio najveći broj ispitanika europskog porijekla (25) te su prikazani za istovjetnu glikan-SNP asocijaciju ili za SNP u LD-u ($R^2 > 0,5$) sa SNP-om identificiranim u ovom istraživanju i istovjetnim smjerom efekta na glikanske udjele.

| <i>Prvotno, DanDiabKids (N = 1105)</i> | | | | | | | | | | | <i>Validacijsko, DanDiabKids (N = 455)</i> | | <i>Opća europska populacija (N = 8090) (25)</i> | |
|--|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|------------|----------------|----------|--------------------|----------------------|----------|------------------|--|------------------|---|--|
| <i>Glikan</i> | <i>Glikanska struktura</i> | <i>Lokus</i> | <i>Gen (kandidat)</i> | <i>SNP</i> | <i>N (SNP)</i> | <i>N</i> | <i>OA, MA, MAF</i> | <i>R²</i> | <i>P</i> | <i>Beta (SE)</i> | <i>P</i> | <i>Beta (SE)</i> | <i>P</i> | |
| IGP16 | FA2[3]G1S1 | 3:186 741 221 | <i>ST6GAL1</i> | rs3872724 | 1 | 1056 | G, A (0,37) | 0,09 | 1,81E-22 | -0,16 (0,016) | 2,21E-05 | -0,14 (0,032) | 8,63E-65 ^c | |
| IGP16 | FA2[3]G1S1 | 3:186 743 053 | <i>ST6GAL1</i> | rs4686838 | 1 | 1056 | A, G (0,44) | 0,06 | 1,09E-15 | -0,13 (0,016) | 1,06E-04 | -0,12 (0,080) | 6,94E-15 | |
| IGP6 | FA2B | 22:39 843 409-39 844 793 | <i>/(MGAT3)</i> | rs5757678 | 2 | 1056 | A, G (0,27) | 0,05 | 1,57E-13 | 0,39 (0,052) | 4,61E-07 | 0,49 (0,096) | 2,35E-18 ^a | |
| IGP10 | FA2[6]BG1 | 22:39 778 167-39 844 793 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | rs5757680 | 4 | 1045 | G, A (0,26) | 0,1 | 2,12E-26 | 0,41 (0,038) | 1,60E-14 | 0,56 (0,07) | 5,96E-27 ^a | |
| IGP10 | FA2[6]BG1 | 22:39 738 501-39 756 985 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | rs137702 | 12 | 1048 | G, A (0,24) | 0,05 | 5,95E-14 | 0,31 (0,041) | 4,07E-05 ^d | 0,33 (0,080) | 3,64E-18 ^b | |
| IGP11 | FA2[3]BG1 | 22:39 778 167-39 844 793 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | rs5757680 | 4 | 1045 | G, A (0,26) | 0,05 | 1,63E-13 | 0,04 (0,005) | 4,24E-05 | 0,03 (0,008) | 6,18E-14 ^a | |

3. Rezultati

| | | | | | | | | | | | | | |
|-------|----------|--------------------------|--------------------------------|-----------|---|------|-------------|------|----------|---------------|-----------------------|----------------------------|--|
| IGP15 | FA2BG2 | 22:39,778,167-39,844,793 | <i>SYNGR1</i> (<i>MGAT3</i>) | rs5757680 | 4 | 1045 | G, A (0,26) | 0,06 | 1,04E-15 | 0,12 (0,015) | 8,27E-10 | 0,16 (0,026) | 1,89E-12 ^a |
| IGP15 | FA2BG2 | 22:39,739,638-39,756,985 | <i>SYNGR1</i> (<i>MGAT3</i>) | rs137702 | 7 | 1048 | G, A (0,24) | 0,04 | 2,88E-10 | 0,1 (0,016) | 3,03E-03 ^d | 0,09 (0,029) | Asocijacija nije prijavljena [*] |
| IGP19 | FA2BG2S1 | 22:39,843,409-39,844,793 | / <i>(MGAT3)</i> | rs5757680 | 2 | 1045 | G, A (0,26) | 0,04 | 1,38E-10 | 0,1 (0,016) | 8,17E-05 | 0,11 (0,027) | 4,63E-10 ^c |
| IGP23 | FA2G2S2 | 22:39,843,409-39,844,793 | / <i>(MGAT3)</i> | rs5757680 | 2 | 1045 | G, A (0,26) | 0,04 | 5,04E-11 | -0,19 (0,028) | 1,22E-03 | -0,16 (0,050) ^f | 1,20E-20 ^a |
| IGP24 | FA2BG2S2 | 22:39,843,409-39,844,793 | / <i>(MGAT3)</i> | rs5757680 | 2 | 1045 | G, A (0,26) | 0,04 | 7,65E-12 | 0,12 (0,017) | 8,33E-06 | 0,13 (0,029) | Asocijacija nije prijavljena [#] |

Istaknute asocijacije su identificirane u ovom istraživanju, dok u istraživanju opće europske populacije navedene asocijacije nisu prijavljene. Locus je predstavljen s oznakama pripadajućeg kromosoma te pozicijom pripadajućih SNP-ova. Rezultati su prijavljeni za GRCh Build 37, a aleli su poravnati s Illumina TOP lancem. LD je određen korištenjem preglednika SNI_{PA} (150) i SNP-ovi su pridruženi istovjetnom genskom intervalu na temelju LD-a ($R^2 > 0.5$) s najznačajnijim SNP-om unutar intervala. Efekt (beta) predstavlja promjenu relativne zastupljenosti glikana (%) i prijavljen je za rijetki alel. GP – glikanski pik, N (SNP) – ukupan broj SNP-ova unutar povezanog genskog intervala, N – broj ispitanika, OA – drugi/česti alel (engl. *other/major allele*), MA – rijetki alel (engl. *minor allele*), MAF – frekvencija rijetkog alela (engl. *minor allele frequency*), R^2 – postotak objašnjene glikanske varijacije, *ST6GAL1* – gen za ST6 β-galaktozid α-2,6-sijaliltransferazu 1, *SYNGR1* - sinaptogirin 1 gen, *MGAT3* – gen za manozil (β-1,4-)-glikoprotein β-1,4-N-acetilglukozaminiltransferazu.

^aRezultati su prijavljeni za rs8137426 ($R^2 = 1$ s rs5757680).

^bRezultati su prijavljeni za rs6001585 ($R^2 = 0,58$ s rs137702).

^cRezultati su prijavljeni za rs5757637 ($R^2 = 0,46$ s rs137663).

^dRezultati su prijavljeni za rs4821887 ($R^2 = 0,98$ s rs137707).

^eRezultati su prijavljeni za rs3821819 ($R^2 = 0,69$ s rs3872724).

^fRezultati su prijavljeni za rs5757678 ($R^2 = 0,99$ s rs5757680).

^{*}SNP najbliži po LD-u za navedenu asocijaciju u općoj europskoj populaciji je rs4821897 ($R^2 = 0,37$ s rs137702, $p = 1.15E-12$).

[#]U općoj europskoj populaciji IGP24 je isključivo povezan s *ST6GAL1* na kromosomu 3.

3.6. Identifikacija novog gena povezanog s razinama *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina

Dva SNP-a, nesinonimni rs1047286 (p.Pro314Leu) i sinonimni rs2230203, u visokom LD-u smještena na kromosomu 19 unutar *C3* egzona značajno su povezana s razinama oligomanoznog Man9 glikana ukupnih plazmatskih proteina. Najznačajniji *C3* SNP ($p = 2,43E-11$), rs1047286, objasnio je 4 % varijacije povezanog Man9 glikana. U prethodnim GWAS-ima *N*-glikana plazmatskih proteina nije prijavljena povezanost *N*-glikana s ovim genom (26).

Najznačajnija genska asocijacija s *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina zabilježena je za GP6 glikan, sržno fukozilirani glikan s račvujućim GlcNAc-om. GP6 glikan povezan je s dva SNP-a (rs575767 i rs5757680) smještena na kromosomu 22 u intronu *N*-acetilglukozaminiltransferaze *MGAT3* (engl. *mannosyl (β-1,4)-glycoprotein β-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase gene*). Najznačajniji SNP, rs5757678, objasnio je 4 % varijacije GP6 glikana. Povezanost IgG glikana (GP10) iste glikanske strukturu kao i GP6, ili usporednog glikana ukoliko je korištena različita tehnologija analize glikana, s *MGAT3* je već prijavljena (29), (140), (25). SNP-ovi povezani s GP6 u prethodnim GWAS-ima (rs909674, rs73167342 i rs4821897) su u visokom LD-u ($R^2 > 0,9$) s *MGAT3* SNP-ovima identificiranim u ovom istraživanju.

SNP rs2460382 na kromosomu 2 u intronu *N*-acetilglukozaminiltransferaze *MGAT5* povezan je s triantenarnim *N*-glikanom ukupnih plazmatskih proteina (GP29) te je objasnio 4 % varijacije ovog glikana. *MGAT5* prethodno je najčešće bio povezan s tetraantenarnim *N*-glikanima uz one triantenarne (26-28).

3.7. IgG *N*-glikani koreliraju s poznatim *N*-glikoziltransferaznim lokusima

SNP-ovi povezani s *N*-glikanima IgG-a na kromosomu 22 smješteni su u dva genska intervala definirana prema LD-u ($R^2 > 0,5$) s najznačajnijim SNP-om unutar svakog intervala. Četiri SNP-a prvom genskom intervalu predstavljaju najznačajnije genske asocijacije s IgG *N*-glikanima. Najznačajniji SNP ($p = 2,12E-26$) u ovom genskom intervalu, rs5757680, smješten je u intergenskom području u blizini *MGAT3* i objašnjava najveći postotak varijacije IgG *N*-glikana. SNP rs5757680 objasnio je 10 % varijacije povezanog GP10 glikana, koji po strukturi odgovara GP6 glikanu ukupnih plazmatskih proteina (za više detalje o strukturi i replikacijama asocijacija u literaturi vidjeti odjeljak poviše). Ukratko, SNP-ovi unutar *MGAT3* povezani su s porastom udjela sržno fukoziliranih *N*-glikana s račvujućim GlcNAc-om i padom udjela sržno

3. Rezultati

fukoziliranih disijaliniziranih *N*-glikana bez računajućeg GlcNAc-a. Suprotan učinak na spomenute *N*-glikane prijavljen je u prethodnim GWAS-ima (25), (29), (140).

SNP-ovi na drugom genskom intervalu na kromosomu 22 koji uključuje *SYNGR1* gen (engl. *synaptogyrin 1 gene*) su također u blizini *MGAT3* gena. Prethodni GWAS-i povezali su ovo gensko područje s *N*-glikanima s računajućim GlcNAc-om (27).

U ovom istraživanju također je otkrivena nova glikanska asocijacija područja u blizini *MGAT3* s IGP24 glikanom koji predstavlja sržno fukozilirani biantenarni digalaktozilirani disijalinizirani glikan. Implicirani SNP-ovi objasnili su 4 % varijacije IGP24 glikana. U prethodnom GWAS-u IGP24 je bio isključivo povezan sa sijaliltransferaznim genom *ST6GAL1* (engl. *ST6 β-galactoside α-2,6-sialyltransferase 1 gene*) (25). Također, najznačajnije genske asocijacije u ovom istraživanju su one između IgG glikana i *MGAT3*, dok je u općoj europskoj populaciji navedeno pokazano za *ST6GAL1* (25).

Dva SNP-a u intronu sijaliltransferaze *ST6GAL1* na kromosomu 3 povezana su s GP16 glikanom, monosijaliniziranim IgG *N*-glikanom. Najznačajniji SNP ($p = 1,81E-22$) u ovoj regiji, rs3872724, objasnio je 9 % varijacije GP16 glikana. Navedene *ST6GAL1* asocijacije su prethodno prijavljene (25).

3.8. Validacijska kohorta

U manjoj validacijskoj kohorti na uzorku koji je uz 190 djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 uključio i 265 zdravih ispitanika, replicirane su novoidentificirane glikanske asocijacije iz prvotnog istraživanja. Tablica 16 prikazuje SNP-ove značajno povezane s *N*-glikanima IgG-a ili ukupnih plazmatskih proteina u validacijskoj kohorti.

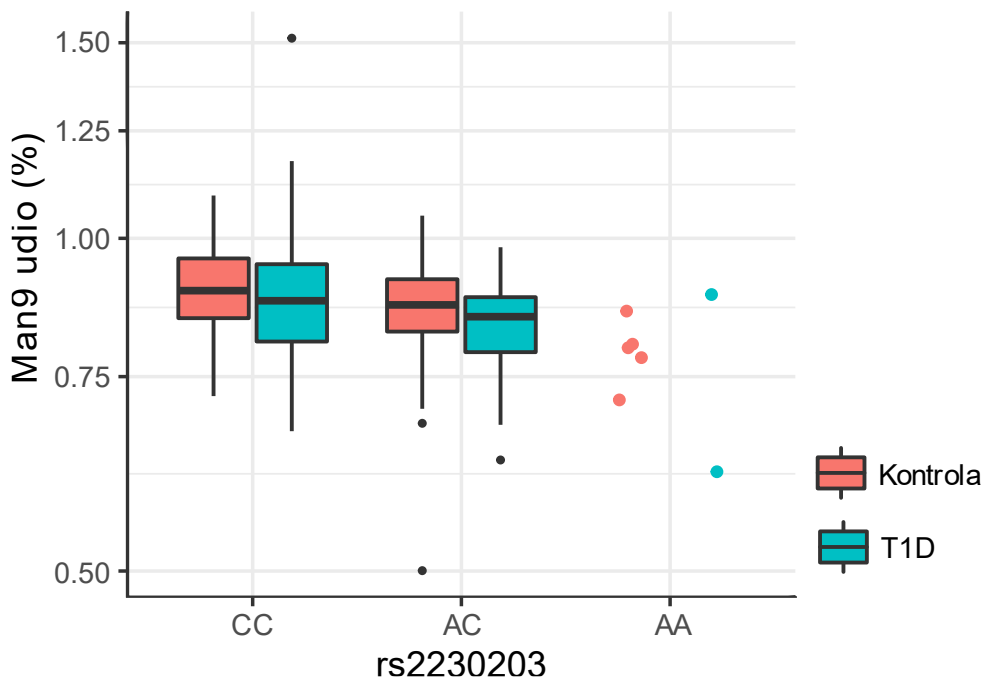
Tablica 16. SNP-ovi značajno povezani s *N*-glikanima IgG-a ili ukupnih plazmatskih proteina u validacijskoj kohorti kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i zdravih ispitanika.

| <i>Krom.</i> | <i>Gen (kandidat)</i> | <i>GP</i> | <i>SNP</i> | <i>P-vrijednost</i> | <i>Beta (SE)</i> |
|--------------|-----------------------|-----------|------------|---------------------|------------------|
| 3 | <i>ST6GAL1</i> | IGP16 | rs3872724 | 1,22E-05 | -0,06 (0,01) |
| 3 | <i>ST6GAL1</i> | IGP16 | rs4686838 | 7,96E-05 | -0,05 (0,01) |
| 19 | <i>C3</i> | GP19 | rs2230203 | 4,87E-04 | -0,05 (0,01) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | GP6 | rs5757678 | 7,16E-06 | 0,09 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | GP6 | rs5757680 | 1,17E-05 | 0,09 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP6 | rs5757678 | 7,57E-08 | 0,14 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP6 | rs5757680 | 4,91E-07 | 0,13 (0,03) |
| 22 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | IGP10 | rs1010169 | 8,59E-07 | 0,10 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP10 | rs137683 | 4,60E-04 | 0,08 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP10 | rs137686 | 2,28E-04 | 0,08 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP10 | rs137690 | 2,79E-04 | 0,08 (0,02) |
| 22 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | IGP10 | rs2413589 | 2,80E-04 | 0,08 (0,02) |
| 22 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | IGP10 | rs4821887 | 1,52E-04 | 0,09 (0,02) |
| 22 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | IGP10 | rs5757650 | 9,65E-07 | 0,10 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP10 | rs5757678 | 2,95E-13 | 0,15 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP10 | rs5757680 | 4,53E-13 | 0,15 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP10 | rs9611156 | 2,94E-04 | 0,08 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP11 | rs5757678 | 2,82E-05 | 0,08 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP11 | rs5757680 | 3,60E-05 | 0,08 (0,02) |
| 22 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | IGP15 | rs1010169 | 1,90E-05 | 0,09 (0,02) |
| 22 | <i>SYNGR1 (MGAT3)</i> | IGP15 | rs5757650 | 2,21E-05 | 0,09 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP15 | rs5757678 | 4,87E-10 | 0,13 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP15 | rs5757680 | 4,57E-10 | 0,13 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP19 | rs5757678 | 3,01E-05 | 0,08 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP19 | rs5757680 | 5,14E-05 | 0,08 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP23 | rs5757678 | 3,12E-04 | -0,08 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP24 | rs5757678 | 3,22E-06 | 0,09 (0,02) |
| 22 | / <i>(MGAT3)</i> | IGP24 | rs5757680 | 3,81E-06 | 0,09 (0,02) |

Rezultati su prijavljeni za GRCh Build 37, a aleli su poravnati s Illumina TOP lancem. Efekt je izražen kao log (izgleda) i prijavljen je za rijetki alel. Krom. – kromosom, N – broj ispitanika, GP – glikanski pik ukupnih plazmatskih proteina, IGP – glikanski pik IgG-a, OA – drugi/česti alel (engl. *other/major allele*), MA – rijetki alel (engl. *minor allele*), MAF – frekvencija rijetkog alela (engl. *minor allele frequency*), *ST6GAL1* – ST6 β-galaktozid α-2,6-sijaliltransferaza 1 gen, *SYNGR1* – sinaptogirin 1 gen, *MGAT3* – manozil (β-1,4-)-glikoprotein β-1,4-*N*-acetilglukozaminiltransferaza gen, *C3* – komplement C3 gen.

3. Rezultati

Također, samo 16 % ($R^2 = 0,16$, $p = 0,03$) Man9 varijacije objašnjeno je linearnom korelacijom s koncentracijom C3 proteina. Slika 13 prikazuje relativni udio Man9 glikana ukupnih plazmatskih proteina u različitim C3 rs2230203 genotipovima kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 i zdravih ispitanika skupljenih kroz *DanDiabKids* registrar, pri čemu je uz niže udjele Man9 povezane s C3 rs2230203 A alelom prisutan i trend nižeg Man9 kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi sa zdravim ispitanicima.



Slika 13. Udio Man9 glikana ukupnih plazmatskih proteina u različitim C3 rs2230203 genotipovima u validacijskoj kohorti kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 i zdravih ispitanika skupljenih kroz *DanDiabKids* registrar, pri čemu je uz niže udjele Man9 povezane s C3 rs2230203 A alelom prisutan i trend nižeg Man9 kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

4. RASPRAVA

4.1. *N*-glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kod djece i adolescenata s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika

N-glikani ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a analizirani su kod 1917 djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 te uspoređeni između 188 djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 i njihova 244 zdrava srodnika. Ovo je najveće istraživanje *N*-glikozilacijskih promjena kod djece i prvo istraživanje *N*-glikozilacijskih promjena u ranoj fazi šećerne bolesti tipa 1. Pronađene su značajne razlike u *N*-glikomu IgG-a i ukupnih plazmatskih proteina između djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika te je razvijen diskriminacijski model šećerne bolesti tipa 1 temeljen na *N*-glikanima. Pronađene su značajne *N*-glikozilacijske razlike između spolova i s dobi dijagnoze šećerne bolesti tipa 1.

Prethodno istraživanje *N*-glikozilacije ukupnih serumskih proteina i IgG-a kod odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 povezalo je više HbA1c vrijednosti s pomakom *N*-glikanskog profila prema kompleksnijim triantenarnim i tetraantenarnim *N*-glikanima na serumskim proteinima (16), (139). U ovom istraživanju, pri nastupu šećerne bolesti tipa 1 opažen je pomak u drugom smjeru, prema jednostavnijim *N*-glikanima, npr. jako jednostavnim *N*-glikanima s terminalnim GlcNAc i manoznim ostacima na IgG-u i ukupnim plazmatskim proteinima, nekim biantenarnim *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina i *N*-glikanima s račvujućim GlcNAc-om. Opisane promjene specifične za nastup šećerne bolesti tipa 1 sugeriraju da navedene promjene nisu samo odraz razlika u glikemijskoj kontroli i ukazuju na njihovu potencijalnu vrijednost u predviđanju rizika razvoja šećerne bolesti tipa 1.

Značajan porast struktura s terminalnim GlcNAc i manoznim ostacima uočen je kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi s njihovim zdravim srodnicima. Porast razina MBL-a koji veže i terminalne manoze i GlcNAc-e prijavljen je kod ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (136), (161). U reumatoidnom artritisu, višestruka prezentacija IgG *N*-glikana s terminalnim GlcNAc ostacima dovela je do aktivacije MBL-ovisnog puta aktivacije sustava komplementa u napadnutim zglobovima (162), što sugerira da navedene *N*-glikozilacijske promjene potencijalno doprinose kroničnoj upali zglobova. Nadalje, pokazano je da se opisane promjene pojavljuju prije nastupa reumatoidnog artritisa (163). U ovom istraživanju djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1 zabilježen je porast udjela glikana koji sadrži tri terminalna GlcNAc-a (FA2B) na IgG-u i

ukupnim plazmatskim proteinima. Također, gen koji kodira glavni protein sustava komplementa, C3 protein, povezan je s povećanim rizikom razvoja šećerne bolesti tipa 1 među HLA-DR4/4 nositeljima (164). IgG s prisutnim račvajućim GlcNAc-om povezan je sa sposobnošću uništavanja ciljnih stanica kroz proces stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (165), važnog procesa tijekom eliminacije virusa koji su predloženi kao jedan od okidača autoimunog procesa u šećernoj bolesti tipa 1 (166).

Nadalje, porast udjela IgG disijaliniziranih struktura te pad IgG asijaliniziranih struktura uočen je kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi s njihovim zdravim srodnicima. Istraživanja su povezala sijalinizaciju IgG-a s protuupalnim svojstvima (97). Razlika u sijalinizaciji IgG-a između ispitivanih skupina vjerojatno odražava upalni proces tijekom nastupa šećerne bolesti tipa 1.

Pad udjela monogalaktoziliranih struktura također je uočen s nastupom šećerne bolesti tipa 1. Isto opažanje prethodno je prijavljeno u još jednoj autoimunoj bolesti, sistemskom eritemskom lupusu (167), time predstavljajući zajedničko *N*-glikozilacijsko obilježje ovih autoimunih bolesti. No, pad udjela monogalaktoziliranih FA2[3]G1 i FA2[6]G1 povezan je sa slabijom glikemijskom kontrolom kod odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (16), (139) te bi se vrijednost ovog svojstva u procjeni rizika šećerne bolesti tipa 1 trebala odrediti nakon korekcije na razlike u glikemijskoj kontroli.

Značajne *N*-glikozilacijske razlike uočene su između spolova u većini slučajeva s nastupom puberteta, što je pokazano i u prijašnjem istraživanju provedenom na 170 djece i adolescenata (168). Međutim, strukture s račvajućim GlcNAc-om prisutne na IgG-u i ukupnim plazmatskim proteinima, oligomanozne strukture ukupnih plazmatskih proteina i ukupna sržna fukoza IgG-a značajno se razlikovala između spolova i prije nastupa puberteta. Ispitivanje razlika u spolovima između glikana koji su povezani sa statusom šećerne bolesti tipa 1 bilo je od važnosti zbog moguće hormonalne komponente povezane sa šećernom bolesti tipa 1 uzimajući u obzir višu prevalenciju ove bolesti kod muških ispitanika nakon nastupa puberteta (169). No, udjeli nekih glikana viših kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 su bili viši, dok su udjeli nekih glikana nižih kod djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 bili niži u istom spolu. Iz tog razloga otežano je izvođenje zaključaka o odrazu rizika razvoja ove bolesti na *N*-glikane između muških i ženskih ispitanika. Prethodno istraživanje 130 djece i adolescenata prijavilo je slične promjene IgG *N*-glikozilacije s dobi (170), ukazujući da su dobne razlike prvenstveno

odraz kronološke dobi i da bi se detaljnija istraživanja trebala provesti u svrhu identifikacije glikanskih struktura povezanih s dobi dijagnoze šećerne bolesti tipa 1.

ZnT8R autoantitijela povezana su s udjelom digalaktoziliranog IgG *N*-glikana s račvajućim GlcNAc-om (GP13). Porast broja različitih autoantitijela koji se smatra boljim prediktorom progresije do šećerne bolesti tipa 1 od razina bilo kojeg pojedinačnog autoantitijela (9) povezan je s nekim visoko razgranatim strukturama ukupnih plazmatskih proteina. Navedeni rezultati sugeriraju da varijacija nekih *N*-glikana odražava autoimuni proces specifičan za šećernu bolest tipa 1. ZnT8A detektirana su kod 81 % djece koja razviju šećernu bolest tipa 1 (171), što čini ova autoantitijela jako važnima u predviđanju šećerne bolesti tipa 1. Međutim, udjeli GP13 glikana se nisu značajno razlikovali između oboljelih i zdravih ispitanika. U trenutnom istraživanju frakcija IgG-a specifična za antigene šećerne bolesti tipa 1 nije odijeljena od ne-autoreaktivne IgG frakcije. U budućnosti bi bilo važno istražiti antigen-specifičnu IgG *N*-glikozilaciju.

S obzirom da su uzorci ispitanika korišteni u ovom istraživanju skupljeni unutar tri mjeseca od nastupa šećerne bolesti tipa 1 nije moguće zaključiti prethode li *N*-glikozilacijske promjene šećernoj bolesti tipa 1 ili pak reflektiraju procese u tijeku. Također, varijacija u glikozilaciji proteina kao i koncentracija proteina mogla bi utjecati na opažene *N*-glikozilacijske promjene ukupnih plazmatskih proteina. No s druge strane, značajne asocijacije su uočene između šećerne bolesti tipa 1 i *N*-glikozilacije i na razini pojedinačnog IgG proteina te zahtijevaju daljnja istraživanja. Važan daljnji korak također predstavlja evaluacija učinkovitosti predikcijskog modela šećerne bolesti tipa 1 na neovisnoj populaciji. Nadalje, u ovom istraživanju pubertet je definiran s obzirom na dob ispitanika, dok bi klinička procjena predstavljala precizniju procjenu. Glikanski podaci nisu standardizirani na terapiju s obzirom da ta informacija nije bila dostupna kroz registar. No, prijašnja istraživanja ukazuju na niske učinke na udjele malog broja glikana povezane s primjenom inzulina (172). Ukoliko su zdravi srodnici dijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 1 iznad 18 godina života njihov zdravstveni status nije bilo moguće pratiti putem DanDiabKids registra. U ovom slučaju ispitanici se upućuju u klinike za praćenje odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 te je status razvoja šećerne bolesti tipa 1 kod ovih ispitanika nesigurniji nego kod mlađih ispitanika koji su praćeni dulje vrijeme. Incidencija šećerne bolesti tipa 1 znatno pada nakon puberteta s porastom dobi (169) te se time smanjuje vjerojatnost da su odrasli ispitanici praćeni kroz kraći period razvili šećernu bolest tipa 1. S druge strane, jedna od najvećih prednosti ovog istraživanja je upravo ispitivana populacija koja uključuje djecu i adolescente s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1, bez komorbiditeta

koji prate odrasle ispitanike sa šećernom bolesti tipa 1. Na ovaj način moguće je preciznije istraživanje *N*-glikozilacijskih promjena povezanih sa šećernom bolesti tipa 1.

Ranija intervencija u svrhu prevencije šećerne bolesti tipa 1 bila bi potpomognuta identifikacijom pojedinaca s višim rizikom razvoja šećerne bolesti tipa 1 te se iz tog razloga vodi dugotrajna potraga za novim biomarkerima ove bolesti. Glavni doprinos ovog istraživanja je definicija *N*-glikozilacijskih promjena tijekom nastupa šećerne bolesti tipa 1. Navedeno je omogućilo razvoj prediktivnog modela šećerne bolesti tipa 1 koji bi mogao imati kliničku vrijednost ($AUC > 0,9$). Predloženi model nadmašuje genski izračun rizika (engl. *genetic risk score*) koji u kombinaciji s kliničkim podacima ostvaruje AUC od 0,79 (173) te je usporedive učinkovitosti s nedavno poboljšanom verzijom ovog izračuna (12). Uključenje genskih i kliničkih podataka u diferencijalni *N*-glikozilacijski model šećerne bolesti tipa 1 bi moglo dodatno optimizirati predikciju. Važan budući korak u svrhu procjene učinkovitosti prediktivnog modela šećerne bolesti tipa 1 temeljenog na *N*-glikanima predstavlja istraživanje *N*-glikozilacijskih promjena kod ispitanika s nastupom autoimunog procesa, a prije razvoja kliničke šećerne bolesti. Zanimljivo zapažanje uočeno je kod dva zdrava srodnika koja su unutar pet i devet godina od uzorkovanja razvila šećernu bolest tipa 1. Dva zdrava srodnika kasnije u životu dijagnosticirana sa šećernom bolesti tipa 1 imala su jako niske udjele monogalaktozilacije (ispod Q1) u trenutku uzorkovanja. Ovo glikansko svojstvo je bilo značajno smanjeno kod djece i adolescenata pri nastupu šećerne bolesti tipa 1 u usporedbi s njihovim zdravim srodnicima.

U zaključku, ovo istraživanje opisalo je značajne *N*-glikozilacijske promjene koje prate nastup šećerne bolesti tipa 1 te omogućilo razvoj prediktivnog modela šećerne bolesti tipa 1 temeljenog na *N*-glikozilacijskim svojstvima. Također, ovo istraživanje provedeno na velikom broju djece i adolescenata potvrdilo je istraživanja *N*-glikozilacijskih promjena između spolova i onih povezanih s dobi do sada provedena na malom broju ispitanika te je otkrilo i neke nove promjene povezane s navedenim osobinama. Porast broja različitih autoantitijela, boljeg prediktora progresije prema šećernoj bolesti tipa 1 od razina bilo kojeg pojedinačnog autoantitijela, povezan je sa specifičnim promjenama plazmatskog *N*-glikoma. Navedeno ukazuje na važnost daljnjih istraživanja *N*-glikozilacijskih promjena i njihovog učinka na šećernu bolest tipa 1.

4.2. Korelacija genoma i *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kod djece i adolescenata s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika

Ovo istraživanje provedeno je u svrhu otkrivanja gena povezanih s *N*-glikozilacijskim promjenama ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a koje prate nastup šećerne bolesti tipa 1. Unutar ispitivane populacije od 1105 novodijagnosticiranih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 potvrđena je povezanost *N*-glikoma s tri prethodno identificirana *N*-glikozilacijska lokusa (*MGAT3*, *MGAT5* i *ST6GALI*) (25), (26), te je otkriven novi lokus povezan s *N*-glikozilacijom, *C3* lokus na kromosomu 19.

U manjoj validacijskoj kohorti na uzorku koji je uz 190 djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 uključio i 265 zdravih ispitanika, testirane su genske asocijacije s *N*-glikanima identificirane u prvotnom istraživanju. U ovom dijelu istraživanja korišteni su uzorci oboljelih i zdravih ispitanika iz obiteljskog registra (34) koji su genski međusobno sličniji u usporedbi s općom populacijom te su asocijacije testirane na objedinjenom uzorku zdravih i oboljelih ispitanika, uz dodatnu korekciju statističkog modela na interakciju između statusa bolesti i genotipa (nije bilo značajnih asocijacija). Replicirane su sve novoidentificirane genske asocijacije.

4.3. Korelacija *C3* gena i oligomanoznog *Man9* glikana s ukupnih plazmatskih proteina u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1

Dva SNP-a u visokom LD-u ($R^2 = 0,85$) unutar *C3* egzona povezana su s udjelima *Man9* glikana ukupnih plazmatskih proteina, nesinonimni rs1047286 koji urokuje promjenu cikličke u acikličku aminokiselinu (p.Pro314Leu) te sinonimni rs2230203. *C3* kodira komponentu *C3* sustava komplementa, glavni protein sva tri aktivacijska puta sustava komplementa koji je odgovoran za obranu od mikroorganizama te uklanjanje različitih antigena u organizmu koji uključuju i auto-antigene, među drugim važnim imunološkim funkcijama (174). *C3*-*Man9* asocijacija, nova genska asocijacija s *N*-glikanima, potvrđena je u validacijskom istraživanju, korištenjem uzoraka ispitanika iz obiteljskog registra djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika (34). Korištenjem javno dostupnih rezultata GWAS-a *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina u općoj europskoj populaciji (175) potvrđena je povezanost *Man9* glikana ukupnih plazmatskih proteina s *C3* rs2230203 ($p = 1,33E-03$), međutim u toj kohorti nije dostignuta *genome-wide* značajnost što bi moglo značiti da je efekt ovog SNP-a veći u šećernoj bolesti tipa 1. Još jedan *C3* SNP, rs2230199, prethodno je povezan

s povećanim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 1 među *HLA-DR4/4* nositeljima, genotipom koji predstavlja drugi najveći rizik za razvoj šećerne bolesti tipa 1 (164). *C3* rs2230199 je u visokom LD-u s oba *C3* SNP-a identificirana u ovom istraživanju ($R^2 = 0,82$ s rs1047286; $R^2 = 0,7$ s rs2230203), time podupirući značajnost navedenih otkrića.

Iz navedenih rezultata te s obzirom da *C3* protein sadrži Man9 glikan na svojoj površini (176), izvedena je hipoteza o upletenosti *C3* proteina u identificiranu *C3*-Man9 asocijaciju. A alel *C3* rs1047286 uzrokuje promjenu cikličke u acikličku aminokiselinu *C3* proteina te je povezan s padom Man9 glikana ukupnih plazmatskih proteina u prvotnom istraživanju. Promjena aminokiseline unutar *C3* proteina bi potencijalno mogla povećati dostupnost ovog glikozilacijskog mjesta glikoziltransferazama te dovesti do pada razina Man9 glikana uslijed daljnjeg procesiranja. U svrhu validacije *C3* proteina kao proteina impliciranog u navedenu asocijaciju, u validacijskoj kohorti ispitana je povezanost koncentracije *C3* i udjela Man9 te je pokazano da se samo 16 % varijacije Man9 u plazmi može objasniti linearnim porastom koncentracije *C3* proteina. Navedeno potvrđuje da ova genska asocijacija nije samo odraz promjene koncentracije *C3* u plazmi. S obzirom da je Man9 smješten na *C3* domeni uključenoj u vezanje patogena (177), opisane promjene mogle bi utjecati na aktivaciju sustava komplementa među nositeljima rs1047286 i rs2230203 A alela. Nadalje, prethodna istraživanja ukazuju na veću aktivaciju sustava komplementa alternativnim putem kod ispitanika s rs1047286 A alelom (178).

4.4. Korelacija IgG N-glikana s *MGAT3* N-glikoziltransferaznim lokusom u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1

N-glikani s računjućim GlcNAc-om ukupnih plazmatskih i IgG proteina značajno su povezani sa SNP-ovima u blizini *MGAT3* gena koji je odgovoran za sintezu proteina koji dodaje računjući GlcNAc na postojeću glikansku strukturu (108). Gotovo polovica svih *MGAT3*-povezanih IgG N-glikana prethodno je značajno povezana sa SNP-om u visokom LD-u s najznačajnijim *MGAT3* SNP-om identificiranim u ovom istraživanju (25), (29). S obzirom da *MGAT3* kodira enzim odgovaran za sintezu povezanih N-glikana (108), *MGAT3* predstavlja biološki najizglednijeg kandidata odgovornog za navedene genske asocijacije. Zanimljivo zapažanje uočeno je za *MGAT3*; *MGAT3* je pokazao najznačajniju asocijaciju s IgG N-glikozilacijom od svih identificiranih genskih lokusa u ovom istraživanju, što nije bio slučaj u prethodnim GWAS-ima na općoj europskoj populaciji gdje je isto opaženo za sijaliltransferazu *ST6GAL1* (25), (29), (31).

Nadalje, navedeno istraživanje otkrilo je novu glikansku asocijaciju *MGAT3* s disijaliziranim glikanom koji je u općoj europskoj populaciji bio isključivo povezan sa sijaliltransferazom *ST6GAL1* (25). Prethodna istraživanja povezala su smanjenu *ST6GAL1* ekspresiju u stanicama odgovornim za produkciju IgG-a sa SNP-ovima prethodno povezanim sa šećernom bolesti tipa 1 (179). Također, SNP-ovi implicirani u novoidentificiranu asocijaciju povezani su s promijenjenom *MGAT3* ekspresijom u relevantnim tkivima (180), (181).

IgG strukture s račvajućim GlcNAc-om povezane su sa sposobnošću uništavanja ciljnih stanica kroz proces stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima (165), važnog procesa tijekom eliminacije virusa koji su predloženi kao jedan od okidača autoimunog procesa u šećernoj bolesti tipa 1 (166). Porast razina lektina koji veže terminalnu manozu i GlcNAc te time aktivira jedan od putova sustava komplementa, te s njim povezanim serinskim proteazama prijavljen je u šećernoj bolesti tipa 1 (136), (182). S obzirom da je u obiteljskom istraživanju zabilježeno povećanje struktura s račvajućim GlcNAc-om i oligomanoznih struktura na ukupnim plazmatskim proteinima i IgG-u kod djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1, navedeno podupire potencijalnu važnost navedenih asocijacija u šećernoj bolesti tipa 1.

Višestruka prezentacija IgG struktura s terminalnim GlcNAc-om dovela je do aktivacije MBL-puta sustava komplementa u napadnutim zglobovima u reumatoidnom artritisu (162), dok je kimerni mišji model ljudskog IgG1 s terminalnim manozama neučinkovit u vezanju komponente komplementa C1q, C1 aktivaciji i s kraćim vremenom poluživota (183). Međutim, za *MGAT3* do sada nije prijavljena povezanost sa šećernom bolesti tipa 1.

4.5. Korelacija *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina s *MGAT5* *N*-glikoziltransferaznim lokusom u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1

Gen koji kodira protein odgovoran za sintezu visoko razgranatih *N*-glikana (108), *MGAT5*, povezan je s triantenarnim GP29 glikanom ukupnih plazmatskih proteina. Enzimski produkt *MGAT5* (GNT-V) odgovoran je za sintezu visoko razgranatih tetraantenarnih *N*-glikana kroz ekstenziju α -1,6-vezane sržne manoze s GlcNAc-om. GNT-V također katalizira i sintezu triantenarnih *N*-glikana u slučaju kada se dvije grane pružaju s α -1,6-vezane sržne manoze, umjesto s α -1,3-vezane sržne manoze (108). U prethodnim GWAS-ima *MGAT5* povezan je i s triantenarnim *N*-glikanom uz tetraantenarne (26-28).

Pokazano je da razgranatost *N*-glikanskih struktura štiti od autoimunog napada (118). Prisutnost visoko razgranatog *N*-glikana sintetiziranog djelovanjem GNT-V ograničava

aktivaciju limfocita T, dok se kod *MGAT5*-negativnih miševa pojavljuje nekoliko autoimunih fenotipova (114). Inhibitorni glikoprotein aktivacije limfocita T, genski produkt jednog od uzročnih gena kandidata šećerne bolesti tipa 1, *CTLA-4* (129), pokazuje povećano retencijsko vrijeme na površini limfocita T posredovano prisutnošću razgranatog *N*-glikana sintetiziranog djelovanjem GNT-V (103). Obiteljsko istraživanje u kojem su testirani geni povezani sa šećernom bolesti tipa 1 prijavilo je povezanost još jednog *MGAT5* SNP-a i šećerne bolesti tipa 1 (184). U obiteljskom istraživanju, udjeli povezanog GP29 glikana su bili značajno povišeni kod djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi s njihovim zdravim srodnicima, sugerirajući potencijalnu važnost *MGAT5* u šećernoj bolesti tipa 1.

4.6. Korelacija *N*-glikana IgG-a sa sijaliltransferazom *ST6GAL1* u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1

Sijaliltransferaza *ST6GAL1* povezana je s udjelom monosijaliniziranog IgG *N*-glikana kod djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1. Identificirane *ST6GAL1* asocijacije prethodno su prijavljene u općoj europskoj populaciji (25). Proupalno i biološki staro stanje IgG *N*-glikana predstavljeno padom galaktozilacije i sijalinizacije IgG-a prijavljeno je u šećernoj bolesti tipa 2 (88), (97) te je *ST6GAL1* identificiran kao novi uzročni gen kandidat šećerne bolesti tipa 2 u nedavno objavljenom GWAS-u na ispitanicima europskog porijekla (185). Pokazano je da hiposijalinizirani IgG aktivira endotelni IgG receptor FcγRIIB te dovodi do inzulinske rezistencije, dok je obnovljena IgG sijalinizacija uspjela održati inzulinsku osjetljivost (186). Također, jednom sijalinizirani IgG pretvara se u protuupalnog medijatora (97).

U obiteljskom istraživanju nije bilo značajnih razlika između djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika u udjelima *ST6GAL1*-povezanog monosijaliniziranog *N*-glikana, potencijalno sugerirajući da ova genska asocijacija nije specifična za šećernu bolest tipa 1. Međutim, disijalinizirane IgG strukture su rasle kod djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1 u obiteljskom istraživanju, dok su asijalinizirane IgG strukture padale u ovoj skupini. Također, prethodna istraživanja su pokazala da je promjena *ST6GAL1* ekspresije povezana sa SNP-ovima prethodno povezanim sa šećernom bolesti tipa 1 (179). Uloga sijalinizacije u patogenezi šećerne bolesti tipa 1 bi se trebala dalje istražiti.

Ukratko, ovo istraživanje djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1 potvrdilo je poznate N-glikozilacijske lokuse, ali ujedno i identificiralo nove N-glikanske asocijacije. Tri genska lokusa su prethodno identificirani N-glikozilacijski lokusi. Novi genski lokus povezan s N-glikozilacijom ukupnih plazmatskih proteina je gen koji kodira glavni protein sva tri puta aktivacije sustava komplementa, C3 gen na kromosomu 19. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnost daljnjih istraživanja genskih polimorfizama i njihovih povezanih N-glikozilacijskih promjena, posebice jer bi navedeno moglo identificirati nove molekularne putove koji su nepoznati za većinu polimorfizama povezanih sa šećernom bolesti tipa 1.

5. ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje omogućilo je definiranje *N*-glikozilacijskih promjena ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a karakterističnih za ranu fazu šećerne bolesti tipa 1 koje se razlikuju od *N*-glikozilacijskih promjena prethodno opisanih kod odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 i nereguliranom glikemijom. Šećerna bolest tipa 1 povezana je s porastom oligomanoznih *N*-glikana i *N*-glikana s račvajućim *N*-acetilglukozaminom te padom monogalaktoziliranih *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a, kao i s porastom disijaliniziranih *N*-glikana IgG-a.

Pronađene su značajne *N*-glikozilacijske razlike između spolova i s dobi dijagnoze šećerne bolesti tipa 1. Značajne *N*-glikozilacijske razlike uočene su između spolova u većini slučajeva s nastupom puberteta, međutim, strukture s račvajućim GlcNAc-om prisutne na IgG-u i ukupnim plazmatskim proteinima, oligomanozne strukture ukupnih plazmatskih proteina i ukupna sržna fukoza IgG-a značajno se razlikovala između spolova i prije nastupa puberteta. Ovo istraživanje provedeno na velikom broju djece i adolescenata potvrdilo je prethodna istraživanja *N*-glikozilacijskih promjena do sada provedena na malom broju ispitanika te je otkrilo i neke nove promjene povezane s navedenim osobinama koje bi se trebale uzeti u obzir u daljnjim istraživanjima biomarkerskog potencijala *N*-glikana u šećernoj bolesti tipa 1.

ZnT8R autoantitijela povezana su s udjelom digalaktoziliranog IgG *N*-glikana s račvajućim GlcNAc-om. Porast broja autoantitijela, boljeg prediktora progresije do šećerne bolesti tipa 1 od razina bilo kojeg pojedinačnog autoantitijela (9), povezan je s nekim visoko-razgranatim *N*-glikanskim strukturama ukupnih plazmatskih proteina. Navedeni rezultati sugeriraju da varijacija određenih *N*-glikana odražava autoimuni proces specifičan za šećernu bolest tipa 1. U budućnosti bi bilo važno istražiti antigen-specifičnu IgG *N*-glikozilaciju.

Glavni doprinos ovog istraživanja je definicija *N*-glikozilacijskih promjena karakterističnih za ranu fazu šećerne bolesti tipa 1. Navedeno je omogućilo razvoj prediktivnog modela šećerne bolesti tipa 1 koji bi mogao imati kliničku vrijednost ($AUC > 0,9$). Modeli temeljeni na *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a su pokazali jako dobru diskriminacijsku moć između djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika. Dobiveni

rezultati bi mogli doprinijeti identifikaciji rizičnih pojedinaca u sklopu istraživanja prevencije šećerne bolesti tipa 1.

Tri prethodno identificirana *N*-glikozilacijska lokusa (*MGAT3*, *MGAT5* i *ST6GALI*) povezana su s razinama *N*-glikana u ovom istraživanju te je otkriven novi lokus povezan s *N*-glikozilacijom, *C3* lokus na kromosomu 19 koji kodira glavni protein sustava komplementa. Dva SNP-a visoke stope neravnoteže vezanosti gena unutar *C3* egzona, nesinonimni rs1047286 koji uzrokuje promjenu cikličke u acikličku aminokiselinu (p.Pro314Leu) i sinonimni rs2230203, povezana su s razinama oligomanoznog Man9 glikana ukupnih plazmatskih proteina.

S obzirom da se Man9 glikan nalazi na domeni komponente *C3* sustava komplementa (*C3*) uključenoj u interakciju patogena i *C3* proteina (177), promjene u razinama Man9 mogle bi potencijalno interferirati s aktivacijom sustava komplementa u šećernoj bolesti tipa 1. Samo 16 % varijacije Man9 u plazmi se objasnilo linearnim porastom koncentracije *C3* proteina što potvrđuje da ova genska asocijacija nije samo odraz promjene koncentracije *C3* u plazmi. Navedena otkrića pružaju temelje za daljnja istraživanja mehanizama koji reguliraju *N*-glikozilaciju u šećernoj bolesti tipa 1.

N-glikoziltransferazni gen *MGAT3* odgovoran za sintezu proteina koji dodaje račvajući GlcNAc na postojeću glikansku strukturu (108) pokazao je najznačajniju asocijaciju s *N*-glikozilacijom od svih identificiranih genskih lokusa u ovom istraživanju, što nije bio slučaj u prethodnim GWAS-ima na općoj europskoj populaciji gdje je isto pokazano za sialiltransferazu *ST6GALI* (25). Također, otkrivena je nova *N*-glikanska asocijacija ovog gena koja je u općoj europskoj populaciji prijavljena isključivo za *ST6GALI* (25). S obzirom da je u obiteljskom istraživanju zabilježeno povećanje struktura s račvajućim GlcNAc-om na ukupnim plazmatskim proteinima i IgG-u kod djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1, navedeno podupire potencijalnu važnost navedenih asocijacija u šećernoj bolesti tipa 1.

Sialiltransferaza *ST6GALI* povezana je s udjelom monosijaliniziranog IgG *N*-glikana za kojeg nisu dokazane značajne razlike između djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne

bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika, potencijalno sugerirajući da ova genska asocijacija nije specifična za šećernu bolest tipa 1. Istovremeno, disijalinizirane IgG strukture rastu kod djece i adolescenata s nedavnim nastupom šećerne bolesti tipa 1, dok asijalinizirane IgG strukture padaju. S obzirom da su prethodna istraživanja povezala promjenu *ST6GAL1* ekspresije sa SNP-ovima povezanim sa šećernom bolesti tipa 1 (179), uloga sijalinizacije u patogenezi šećerne bolesti tipa 1 bi se trebala dalje istražiti.

N-glikoziltransferazni gen *MGAT5* povezan je s visoko razgranatim triantenarnim GP29 glikanom ukupnih plazmatskih proteina koji je ujedno povezan i sa šećernom bolesti tipa 1 u ovom istraživanju. Uloga visoko razgranatih *N*-glikana sintetiziranih djelovanjem enzimskog produkta *MGAT5* u razvoju ove bolesti opisana je u brojnim istraživanjima te su genomske asocijacijske studije povezale *MGAT5* polimorfizme sa šećernom bolesti tipa 1 (15). Navedeno ističe važnost daljnjih istraživanja ovih promjena u šećernoj bolesti tipa 1.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnost daljnjih istraživanja genskih polimorfizama i njihovih povezanih *N*-glikozilacijskih promjena, posebice jer bi navedeno moglo identificirati nove molekularne putove koji su nepoznati za većinu polimorfizama povezanih sa šećernom bolesti tipa 1.

6. POPIS LITERATURE

1. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2017 Jan 1;40(Supplement 1):S11–24.
2. Tuomilehto J, Ogle GD, Lund-Blix NA, Stene LC. Update on Worldwide Trends in Occurrence of Childhood Type 1 Diabetes in 2020. *Pediatr Endocrinol Rev PER*. 2020 Mar;17(Suppl 1):198–209.
3. Morahan G. Insights into type 1 diabetes provided by genetic analyses. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012 Aug;19(4):263–70.
4. Onengut-Gumuscu S, Chen WM, Burren O, Cooper NJ, Quinlan AR, Mychaleckyj JC, et al. Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers. *Nat Genet*. 2015 Apr;47(4):381–6.
5. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk: Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families. *Diabetes*. 2008 Apr 1;57(4):1084–92.
6. Rosenbauer J, Herzig P, von Kries R, Neu A, Giani G. Temporal, seasonal, and geographical incidence patterns of Type I diabetes mellitus in children under 5 years of age in Germany. *Diabetologia*. 1999 Aug 19;42(9):1055–9.
7. Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, et al. A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Ann Med*. 2005 Mar;37(1):67–72.
8. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):1052–5.
9. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008 Feb;41(1):11–8.
10. Farmer A, Fox R. Diagnosis, classification, and treatment of diabetes. *BMJ*. 2011 Jun 9;342:d3319.
11. Bingley PJ, Wherrett DK, Shultz A, Rafkin LE, Atkinson MA, Greenbaum CJ. Type 1 Diabetes TrialNet: A Multifaceted Approach to Bringing Disease-Modifying Therapy to Clinical Use in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2018 Apr 1;41(4):653–61.
12. Sharp SA, Rich SS, Wood AR, Jones SE, Beaumont RN, Harrison JW, et al. Development and Standardization of an Improved Type 1 Diabetes Genetic Risk Score for Use in Newborn Screening and Incident Diagnosis. *Diabetes Care*. 2019 Feb;42(2):200–7.
13. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
14. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1820(9):1318–26.

15. Rudman N, Gornik O, Lauc G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Lett.* 2019;593(13):1598–615.
16. Bermingham ML, Colombo M, McGurnaghan SJ, Blackbourn LAK, Vuckovic F, Bakovic MP, et al. N-Glycan Profile and Kidney Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2018 Jan 1;41(1):79–87.
17. Wittenbecher C, Štambuk T, Kuxhaus O, Rudman N, Vučković F, Štambuk J, et al. Plasma N-Glycans as Emerging Biomarkers of Cardiometabolic Risk: A Prospective Investigation in the EPIC-Potsdam Cohort Study. *Diabetes Care.* 2020 Mar;43(3):661–8.
18. Keser T, Gornik I, Vučković F, Selak N, Pavić T, Lukić E, et al. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2018 Feb 1;61(2):506–506.
19. Vuckovic F, Theodoratou E, Thaci K, Timofeeva M, Vojta A, Stambuk J, et al. IgG Glycome in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 Jun 15;22(12):3078–86.
20. Juszcak A, Pavić T, Vučković F, Bennett AJ, Shah N, Medvidović EP, et al. Plasma Fucosylated Glycans and C-Reactive Protein As Biomarkers of HNF1A-MODY in Young Adult-Onset Nonautoimmune Diabetes. *Diabetes Care.* 2018 Nov 13;dc180422.
21. Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redzic I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology.* 2009 Dec;19(12):1547–53.
22. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Željko –Durić, Keser T, Rajšl K, et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep.* 2014 Mar 11;4:4347.
23. Klingensmith GJ, Pyle L, Arslanian S, Copeland KC, Cuttler L, Kaufman F, et al. The presence of GAD and IA-2 antibodies in youth with a type 2 diabetes phenotype: results from the TODAY study. *Diabetes Care.* 2010 Sep;33(9):1970–5.
24. Thanabalasingham G, Huffman JE, Kattla JJ, Novokmet M, Rudan I, Gloyn AL, et al. Mutations in HNF1A Result in Marked Alterations of Plasma Glycan Profile. *Diabetes.* 2013 Apr;62(4):1329–37.
25. Klarić L, Tsepilov YA, Stanton CM, Mangino M, Sikka TT, Esko T, et al. Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. *Sci Adv.* 2020 Feb;6(8):eaax0301.
26. Sharapov SZ, Shadrina AS, Tsepilov YA, Elgaeva EE, Tiys ES, Feoktistova SG, et al. Replication of 15 loci involved in human plasma protein N-glycosylation in 4802 samples from four cohorts. *Glycobiology.* 2021 Feb 9;31(2):82–8.
27. Huffman JE, Knezevic A, Vitart V, Kattla J, Adamczyk B, Novokmet M, et al. Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and MGAT5 are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 15;20(24):5000–11.

28. Sharapov SZ, Tsepilov YA, Klaric L, Mangino M, Thareja G, Shadrina AS, et al. Defining the genetic control of human blood plasma N-glycome using genome-wide association study. *Hum Mol Genet.* 2019 Jun 15;28(12):2062–77.
29. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, et al. Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLOS Genet.* 2013 Jan 31;9(1):e1003225.
30. Lauc G, Essafi A, Huffman JE, Hayward C, Knežević A, Kattla JJ, et al. Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet.* 2010 Dec 23;6(12):e1001256.
31. Shen X, Klarić L, Sharapov S, Mangino M, Ning Z, Wu D, et al. Multivariate discovery and replication of five novel loci associated with Immunoglobulin G N-glycosylation. *Nat Commun.* 2017 06;8(1):447.
32. Lauc G, Rudan I, Campbell H, Rudd PM. Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol Biosyst.* 2010 Feb;6(2):329–35.
33. Krištić J, Zaytseva OO, Ram R, Nguyen Q, Novokmet M, Vučković F, et al. Profiling and genetic control of the murine immunoglobulin G glycome. *Nat Chem Biol.* 2018 May;14(5):516–24.
34. Svensson J, Cerqueira C, Kjærsgaard P, Lyngsøe L, Hertel NT, Madsen M, et al. Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes. *Clin Epidemiol.* 2016;8:679–83.
35. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2015 Oct;38(10):1964–74.
36. Ziegler AG, Bonifacio E, BABYDIAB-BABYDIET Study Group. Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2012 Jul;55(7):1937–43.
37. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark Å, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia.* 2015 May;58(5):980–7.
38. Ilonen J, Hammais A, Laine AP, Lempainen J, Vaarala O, Veijola R, et al. Patterns of β -Cell Autoantibody Appearance and Genetic Associations During the First Years of Life. *Diabetes.* 2013 Oct;62(10):3636–40.
39. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children. *JAMA.* 2013 Jun 19;309(23):2473–9.
40. Gillespie KM, Gale EAM, Bingley PJ. High Familial Risk and Genetic Susceptibility in Early Onset Childhood Diabetes. *Diabetes.* 2002 Jan 1;51(1):210–4.
41. Steck AK, Barriga KJ, Emery LM, Fiallo-Scharer RV, Gottlieb PA, Rewers MJ. Secondary Attack Rate of Type 1 Diabetes in Colorado Families. *Diabetes Care.* 2005 Feb 1;28(2):296–300.

42. Kyvik KO, Green A, Beck-Nielsen H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ*. 1995 Oct 7;311(7010):913–7.
43. Pociot F, Nørgaard K, Hobolth N, Andersen O, Nerup J. A nationwide population-based study of the familial aggregation of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Denmark. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Diabetologia*. 1993 Sep;36(9):870–5.
44. Tillil H, Köbberling J. Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes*. 1987 Jan;36(1):93–9.
45. Ziegler AG, Hillebrand B, Rabl W, Mayrhofer M, Hummel M, Mollenhauer U, et al. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia*. 1993 May;36(5):402–8.
46. Pociot F, Lernmark Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*. 2016 Jun 4;387(10035):2331–9.
47. Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M, et al. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia*. 1996 Jul;39(7):807–12.
48. Knip M, Kukko M, Kulmala P, Veijola R, Simell O, Akerblom HK, et al. Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. *Am J Med Genet*. 2002 May 30;115(1):48–54.
49. Graham J, Hagopian WA, Kockum I, Li LS, Sanjeevi CB, Lowe RM, et al. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002 May;51(5):1346–55.
50. Ziegler R, Alper CA, Awdeh ZL, Castano L, Brink SJ, Soeldner JS, et al. Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes*. 1991 Jun;40(6):709–14.
51. Zhao LP, Alshiekh S, Zhao M, Carlsson A, Elding Larsson H, Forsander G, et al. Next-Generation Sequencing Reveals That HLA-DRB3, -DRB4, and -DRB5 May Be Associated With Islet Autoantibodies and Risk for Childhood Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016 Mar;65(3):710–8.
52. Törn C, Hadley D, Lee HS, Hagopian W, Lernmark Å, Simell O, et al. Role of Type 1 Diabetes-Associated SNPs on Risk of Autoantibody Positivity in the TEDDY Study. *Diabetes*. 2015 May;64(5):1818–29.
53. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):703–7.
54. Groop L, Pociot F. Genetics of diabetes – Are we missing the genes or the disease? *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jan 25;382(1):726–39.

55. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jul;5(7):521–31.
56. Meka RR, Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential. *Autoimmun Rev.* 2015 Dec;14(12):1131–41.
57. Fujimoto H, Hirase T, Miyazaki Y, Hara H, Ide-Iwata N, Nishimoto-Hazuku A, et al. IL-27 Inhibits Hyperglycemia and Pancreatic Islet Inflammation Induced by Streptozotocin in Mice. *Am J Pathol.* 2011 Nov;179(5):2327–36.
58. Doerflinger M, Glab JA, Puthalakath H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *FEBS J.* 2015 Mar;282(6):1006–16.
59. Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol.* 2011 Jul;21(7):424–31.
60. Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, Choi CS, Fisher JK, Molina AJA, et al. Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):144–53.
61. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med.* 2013 Oct;19(10):625–32.
62. Hayashi K, Altman A. Protein Kinase C Theta (PKC θ): A Key Player in T Cell Life and Death. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 2007 Jun;55(6):537–44.
63. Yan Zhang E, Kong KF, Altman A. The Yin and Yang of Protein Kinase C-theta (PKC θ): A Novel Drug Target for Selective Immunosuppression. *Adv Pharmacol San Diego Calif.* 2013;66:267–312.
64. Soleimanpour SA, Gupta A, Bakay M, Ferrari AM, Groff DN, Fadista J, et al. The diabetes susceptibility gene Clec16a regulates mitophagy. *Cell.* 2014 Jun 19;157(7):1577–90.
65. Zouk H, D’Hennezel E, Du X, Ounissi-Benkhalha H, Piccirillo CA, Polychronakos C. Functional evaluation of the role of C-type lectin domain family 16A at the chromosome 16p13 locus. *Clin Exp Immunol.* 2014 Mar;175(3):485–97.
66. Davison LJ, Wallace C, Cooper JD, Cope NF, Wilson NK, Smyth DJ, et al. Long-range DNA looping and gene expression analyses identify DEXI as an autoimmune disease candidate gene. *Hum Mol Genet.* 2012 Jan 15;21(2):322–33.
67. Wang H, Jin Y, Reddy MVPL, Podolsky R, Liu S, Yang P, et al. Genetically Dependent ERBB3 Expression Modulates Antigen Presenting Cell Function and Type 1 Diabetes Risk. *PLOS ONE.* 2010 Jul 26;5(7):e11789.
68. Kaur S, Mirza AH, Brorsson CA, Fløyel T, Størling J, Mortensen HB, et al. The genetic and regulatory architecture of ERBB3-type 1 diabetes susceptibility locus. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Jan 5;419:83–91.

69. Fløyel T, Brorsson C, Nielsen LB, Miani M, Bang-Berthelsen CH, Friedrichsen M, et al. CTSH regulates β -cell function and disease progression in newly diagnosed type 1 diabetes patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 15;111(28):10305–10.
70. Parkes M, Cortes A, van Heel DA, Brown MA. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat Rev Genet*. 2013 Sep;14(9):661–73.
71. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *The Lancet*. 2009 Jun;373(9680):2027–33.
72. Söderström U, Åman J, Hjern A. Being born in Sweden increases the risk for type 1 diabetes - a study of migration of children to Sweden as a natural experiment: Migration and risk for type 1 diabetes. *Acta Paediatr*. 2012 Jan;101(1):73–7.
73. Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, et al. The significance of the concordance rate for Type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia*. 1988 Oct 1;31(10):747–50.
74. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*. 2003 Oct 1;290(13):1713–20.
75. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA*. 2003 Oct 1;290(13):1721–8.
76. Nygren M, Carstensen J, Koch F, Ludvigsson J, Frostell A. Experience of a serious life event increases the risk for childhood type 1 diabetes: the ABIS population-based prospective cohort study. *Diabetologia*. 2015 Jun;58(6):1188–97.
77. Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet Lond Engl*. 2016 Jun 4;387(10035):2340–8.
78. McMillan DE. Elevation of glycoprotein fucose in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1972 Aug;21(8):863–71.
79. Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell*. 2005 Dec 29;123(7):1307–21.
80. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:1–21.
81. Rahbar S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:9–19.
82. Royle L, Campbell MP, Radcliffe CM, White DM, Harvey DJ, Abrahams JL, et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal Biochem*. 2008 May 1;376(1):1–12.

83. Akmačić IT, Ugrina I, Štambuk J, Gudelj I, Vučković F, Lauc G, et al. High-throughput glycomics: optimization of sample preparation. *Biochem Biokhimia*. 2015 Jul;80(7):934–42.
84. Pučić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2011 Oct;10(10):M111.010090.
85. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 6;1473(1):4–8.
86. Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep*. 2011 Sep 13;1:90.
87. Smilowitz JT, Totten SM, Huang J, Grapov D, Durham HA, Lammi-Keefe CJ, et al. Human milk secretory immunoglobulin a and lactoferrin N-glycans are altered in women with gestational diabetes mellitus. *J Nutr*. 2013 Dec;143(12):1906–12.
88. Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klaric L, et al. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017 Sep;1861(9):2240–9.
89. Keser T, Tijardović M, Gornik I, Lukić E, Lauc G, Gornik O, et al. 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 MCP*. 2021;20:100044.
90. Tijardović M, Štambuk T, Juszczak A, Keser T, Gasperikova D, Novokmet M, et al. Fucosylated AGP glycopeptides as biomarkers of HNF1A-Maturity onset diabetes of the young. *Diabetes Res Clin Pract*;2022 March;185.
91. Cvetko A, Mangino M, Tijardović M, Kifer D, Falchi M, Keser T, et al. Plasma N-glycome shows continuous deterioration as the diagnosis of insulin resistance approaches. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2021 Sep;9(1):e002263.
92. Ohtsubo K, Takamatsu S, Gao C, Korekane H, Kurosawa TM, Taniguchi N. N-Glycosylation modulates the membrane sub-domain distribution and activity of glucose transporter 2 in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 3;434(2):346–51.
93. Ohtsubo K, Chen MZ, Olefsky JM, Marth JD. Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat Med*. 2011 Aug 14;17(9):1067–75.
94. Hennig R, Cajic S, Borowiak M, Hoffmann M, Kottler R, Reichl U, et al. Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1860(8):1728–38.

95. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol.* 2018 Nov;333:65–79.
96. Dotz V, Wuhrer M. N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Lett.* 2019 Sep 11;
97. Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol.* 2010 May;30 Suppl 1:S9-14.
98. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, et al. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2007 May;44(12):3122–31.
99. Iida S, Misaka H, Inoue M, Shibata M, Nakano R, Yamane-Ohnuki N, et al. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006 May 1;12(9):2879–87.
100. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med.* 2003 Mar;9(3):294–9.
101. McClain DA. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications.* 2002 Feb;16(1):72–80.
102. Sasai K, Ikeda Y, Fujii T, Tsuda T, Taniguchi N. UDP-GlcNAc concentration is an important factor in the biosynthesis of beta1,6-branched oligosaccharides: regulation based on the kinetic properties of N-acetylglucosaminyltransferase V. *Glycobiology.* 2002 Feb;12(2):119–27.
103. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, et al. Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell.* 2007 Apr;129(1):123–34.
104. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem.* 1991 Mar 15;266(8):4706–12.
105. Tapparra K, Tran PT, Zachara NE. Hijacking the Hexosamine Biosynthetic Pathway to Promote EMT-Mediated Neoplastic Phenotypes. *Front Oncol [Internet].* 2016 Apr 18; 6:85.
106. Adua E, Memarian E, Russell A, Trbojević-Akmačić I, Gudelj I, Jurić J, et al. High throughput profiling of whole plasma N-glycans in type II diabetes mellitus patients and healthy individuals: A perspective from a Ghanaian population. *Arch Biochem Biophys.* 2019 Jan;661:10–21.
107. Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol.* 1986;205:53–85.

108. Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res.* 2015;126:11–51.
109. Cummings RD, Kornfeld S. The distribution of repeating [Gal beta 1,4GlcNAc beta 1,3] sequences in asparagine-linked oligosaccharides of the mouse lymphoma cell lines BW5147 and PHAR 2.1. *J Biol Chem.* 1984 May 25;259(10):6253–60.
110. Johannes L, Jacob R, Leffler H. Galectins at a glance. *J Cell Sci.* 2018 May 1;131(9):jcs208884.
111. Priglinger CS, Obermann J, Szober CM, Merl-Pham J, Ohmayer U, Behler J, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition of RPE Cells In Vitro Confers Increased β 1,6-N-Glycosylation and Increased Susceptibility to Galectin-3 Binding. In: *PloS one.* 2016.
112. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 2008 Jun 13;10:e17.
113. Dunic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Apr;1760(4):616–35.
114. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by *Mgat5N*-glycosylation. *Nature.* 2001 Feb;409(6821):733–9.
115. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science.* 2004 Oct 1;306(5693):120–4.
116. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):792–8.
117. Grigorian A, Demetriou M. *Mgat5* deficiency in T cells and experimental autoimmune encephalomyelitis. *ISRN Neurol.* 2011;2011:374314.
118. Green RS, Stone EL, Tenno M, Lehtonen E, Farquhar MG, Marth JD. Mammalian N-glycan branching protects against innate immune self-recognition and inflammation in autoimmune disease pathogenesis. *Immunity.* 2007 Aug;27(2):308–20.
119. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature.* 1995 Dec 14;378(6558):736–9.
120. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994 Aug;1(5):405–13.
121. Morgan R, Gao G, Pawling J, Dennis JW, Demetriou M, Li B. N-Acetylglucosaminyltransferase V (*Mgat5*)-Mediated N-Glycosylation Negatively Regulates Th1 Cytokine Production by T Cells. *J Immunol.* 2004 Dec 15;173(12):7200–8.

122. Chien MW, Lin MH, Huang SH, Fu SH, Hsu CY, Yen BLJ, et al. Glucosamine Modulates T Cell Differentiation through Down-regulating N-Linked Glycosylation of CD25. *J Biol Chem*. 2015 Dec 4;290(49):29329–44.
123. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*. 1996 Jul 5;273(5271):104–6.
124. Dennis JW. Effects of swainsonine and polyinosinic:polycytidylic acid on murine tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res*. 1986 Oct;46(10):5131–6.
125. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145–73.
126. O’Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jan;2(1):37–45.
127. Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Dec 15;159(12):5956–63.
128. Ise W, Totsuka M, Sogawa Y, Ametani A, Hachimura S, Sato T, et al. Naive CD4+ T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Apr 1;168(7):3242–50.
129. Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet*. 1996 Jul;5(7):1075–80.
130. Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansari AA, Gershwin ME. NOD mice and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2005 Jul;4(6):373–9.
131. Debray-Sachs M, Carnaud C, Boitard C, Cohen H, Gresser I, Bedossa P, et al. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmun*. 1991 Apr;4(2):237–48.
132. Yi Z, Li L, Garland A, He Q, Wang H, Katz JD, et al. IFN- γ receptor deficiency prevents diabetes induction by diabetogenic CD4+, but not CD8+, T cells. *Eur J Immunol*. 2012 Aug;42(8):2010–8.
133. Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, et al. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Nov 15;159(10):4686–92.
134. Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 May;71(2):169–75.
135. Grigorian A, Lee SU, Tian W, Chen IJ, Gao G, Mendelsohn R, et al. Control of T Cell-mediated autoimmunity by metabolite flux to N-glycan biosynthesis. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):20027–35.

136. Hansen TK, Thiel S, Knudsen ST, Gravholt CH, Christiansen JS, Mogensen CE, et al. Elevated Levels of Mannan-Binding Lectin in Patients with Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Oct 1;88(10):4857–61.
137. Poland DCW, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, Koeleman CAM, Hof B van het, Dijk W van. Increased α 3-fucosylation of α 1-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function. *Glycoconj J.* 2001 Mar 1;18(3):261–8.
138. Crook MA, Pickup JC, Lumb PJ, Giorgino F, Webb DJ, Fuller JH, et al. Relationship between plasma sialic acid concentration and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes: the EURODIAB Complications Study. *Diabetes Care.* 2001 Feb;24(2):316–22.
139. Colombo M, Asadi Shehni A, Thoma I, McGurnaghan SJ, Blackbourn LAK, Wilkinson H, et al. Quantitative levels of serum N-glycans in type 1 diabetes and their association with kidney disease. *Glycobiology.* 2021 Jun 3;31(5):613–23.
140. Wahl A, van den Akker E, Klaric L, Štambuk J, Benedetti E, Plomp R, et al. Genome-Wide Association Study on Immunoglobulin G Glycosylation Patterns. *Front Immunol.* 2018;9:277.
141. Sorensen JS, Birkebaek NH, Bjerre M, Pociot F, Kristensen K, Hoejberg AS, et al. Residual β -cell function and the insulin-like growth factor system in Danish children and adolescents with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Mar;100(3):1053–61.
142. Thorsen SU, Eising S, Mortensen HB, Skogstrand K, Pociot F, Johannesen J, et al. Systemic levels of CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL8 differ according to age, time period and season among children newly diagnosed with type 1 diabetes and their healthy siblings. *Scand J Immunol.* 2014 Dec;80(6):452–61.
143. Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinforma Oxf Engl.* 2008 May 1;24(9):1214–6.
144. Agakova A, Vučković F, Klarić L, Lauc G, Agakov F. Automated Integration of a UPLC Glycomic Profile. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1503:217–33.
145. Zaytseva OO, Freidin MB, Keser T, Štambuk J, Ugrina I, Šimurina M, et al. Heritability of Human Plasma N-Glycome. *J Proteome Res.* 2020 Jan 3;19(1):85–91.
146. Rudman N, Kifer D, Kaur S, Simunović V, Cvetko A, Pociot F, et al. Children at onset of type 1 diabetes show altered N-glycosylation of plasma proteins and IgG. *Diabetologia.* 2022 May 27;
147. Brorsson CA, Onengut S, Chen WM, Wenzlau J, Yu L, Baker P, et al. Novel Association Between Immune-Mediated Susceptibility Loci and Persistent Autoantibody Positivity in Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2015 Aug;64(8):3017–27.
148. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007 Sep;81(3):559–75.

149. Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005 Jun;76(6):967–86.
150. Arnold M, Raffler J, Pfeufer A, Suhre K, Kastenmüller G. SNIIPA: an interactive, genetic variant-centered annotation browser. *Bioinforma Oxf Engl.* 2015 Apr 15;31(8):1334–6.
151. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012 Mar 15;28(6):882–3.
152. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw.* 2015 Oct 7;67:1–48.
153. Karssen LC, van Duijn CM, Aulchenko YS. The GenABEL Project for statistical genomics. *F1000Research* [Internet]. 2016 May 19 [cited 2021 Feb 1];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4916982/>
154. CRAN - Package emmeans [Internet]. [cited 2022 Mar 12]. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>
155. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw.* 2010;33(1):1–22.
156. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 2011 Mar 17;12:77.
157. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57(1):289–300.
158. Team RC. R: a language and environment for statistical computing. R Found. Stat Comput Vienna Austria. 2017;
159. Draw Freely | Inkscape [Internet]. [cited 2018 Oct 26]. Available from: <https://inkscape.org/>
160. Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res.* 2008 Apr;7(4):1650–9.
161. Lee RT, Ichikawa Y, Fay M, Drickamer K, Shao MC, Lee YC. Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins. *J Biol Chem.* 1991 Mar 15;266(8):4810–5.
162. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med.* 1995 Mar;1(3):237–43.

163. Ercan A, Cui J, Chatterton DEW, Deane KD, Hazen MM, Brintnell W, et al. Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2239–48.
164. Törn C, Liu X, Hagopian W, Lernmark Å, Simell O, Rewers M, et al. Complement gene variants in relation to autoantibodies to beta cell specific antigens and type 1 diabetes in the TEDDY Study. *Sci Rep.* 2016 16;6:27887.
165. Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng.* 2001 Aug 20;74(4):288–94.
166. Knip M, Simell O. Environmental Triggers of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012 Jul; 2(7): a007690.
167. Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, et al. Association of Systemic Lupus Erythematosus With Decreased Immunosuppressive Potential of the IgG Glycome. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):2978–89.
168. Pucic M, Muzinic A, Novokmet M, Skledar M, Pivac N, Lauc G, et al. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology.* 2012 Jul;22(7):975–82.
169. Ostman J, Lönnberg G, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Ekblom Schnell A, et al. Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002. *J Intern Med.* 2008 Apr;263(4):386–94.
170. de Haan N, Reiding KR, Driessen G, van der Burg M, Wuhrer M. Changes in Healthy Human IgG Fc-Glycosylation after Birth and during Early Childhood. *J Proteome Res.* 2016 03;15(6):1853–61.
171. Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, et al. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia.* 2009 Sep;52(9):1881–8.
172. Knezević A, Polasek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, et al. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res.* 2009 Feb;8(2):694–701.
173. Redondo MJ, Geyer S, Steck AK, Sharp S, Wentworth JM, Weedon MN, et al. A Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Predicts Progression of Islet Autoimmunity and Development of Type 1 Diabetes in Individuals at Risk. *Diabetes Care.* 2018 Sep;41(9):1887–94.
174. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):785–97.
175. Huffman J, Hayward C. Dataset pertaining to the publication “Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and MGAT5 are associated with variation within the human plasma

- N-glycome of 3533 European adults.” [Internet]. 2017 [cited 2018 Jun 13]. Available from: <https://datashare.is.ed.ac.uk/handle/10283/2759>
176. Ritchie GE, Moffatt BE, Sim RB, Morgan BP, Dwek RA, Rudd PM. Glycosylation and the complement system. *Chem Rev*. 2002 Feb;102(2):305-320–19.
177. Janssen BJC, Huizinga EG, Raaijmakers HCA, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*. 2005 Sep 22;437(7058):505–11.
178. Abrera-Abeleda MA, Nishimura C, Frees K, Jones M, Maga T, Katz LM, et al. Allelic Variants of Complement Genes Associated with Dense Deposit Disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2011 Aug;22(8):1551–9.
179. Ram R, Mehta M, Nguyen QT, Larma I, Boehm BO, Pociot F, et al. Systematic Evaluation of Genes and Genetic Variants Associated with Type 1 Diabetes Susceptibility. *J Immunol*. 2016 Apr 1;196(7):3043–53.
180. Pietzner M, Wheeler E, Carrasco-Zanini J, Raffler J, Kerrison ND, Oerton E, et al. Genetic architecture of host proteins involved in SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020 Dec 16;11(1):6397.
181. Fairfax BP, Makino S, Radhakrishnan J, Plant K, Leslie S, Dilthey A, et al. GENETICS OF GENE EXPRESSION IN PRIMARY IMMUNE CELLS IDENTIFIES CELL-SPECIFIC MASTER REGULATORS AND ROLES OF HLA ALLELES. *Nat Genet*. 2012 Mar 25;44(5):502–10.
182. Jenny L, Ajjan R, King R, Thiel S, Schroeder V. Plasma levels of mannan-binding lectin-associated serine proteases MASP-1 and MASP-2 are elevated in type 1 diabetes and correlate with glycaemic control. *Clin Exp Immunol*. 2015 May;180(2):227–32.
183. Wright A, Morrison SL. Effect of altered CH2-associated carbohydrate structure on the functional properties and in vivo fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J Exp Med*. 1994 Sep 1;180(3):1087–96.
184. Yu Z, Gillen D, Li CF, Demetriou M. Incorporating parental information into family-based association tests. *Biostat Oxf Engl*. 2013 Jul;14(3):556–72.
185. Mahajan A, Taliun D, Thurner M, Robertson NR, Torres JM, Rayner NW, et al. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. *Nat Genet* 2018 Nov;50(11):1505-1513.
186. Tanigaki K, Sacharidou A, Peng J, Chambliss KL, Yuhanna IS, Ghosh D, et al. Hyposialylated IgG activates endothelial IgG receptor FcγRIIB to promote obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2018 Jan 2;128(1):309–22.

**7. ŽIVOTOPIS AUTORA S
POPISOM OBJAVLJENIH
DJELA**

Najda Rudman rođena je 28. ožujka 1990. u Splitu. Diplomski studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila je 2014. godine. Stipendiju Grada Splita za nadarene studente primala je tijekom dvije godine fakultetskog obrazovanja. Dobitnica je Erasmus stipendije za znanstveno usavršavanje u trajanju od pet mjeseci na Zavodu za farmakologiju i farmakoterapiju Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Helsinkiju gdje je izradila svoj diplomski rad.

Nakon završenog diplomskog studija u razdoblju od dvije godine radila je u javnim i bolničkim ljekarnama. Stručni ispit za magistre farmacije položila je 2015. godine te dobila odobrenje za samostalan rad. Doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti upisala je 2016. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, gdje je i zaposlena kao asistent na projektu Hrvatske zaklade za znanost na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju. Sudjeluje u izvođenju praktične nastave iz kolegija diplomskog studija farmacije i medicinske biokemije. Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju te Hrvatske ljekarničke komore. Dobitnica je stipendije zaklade „British Scholarship Trust“, Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske i Agencije za mobilnost i programe Europske unije za znanstveno usavršavanje u trajanju od dva mjeseca na Sveučilištu u Edinburghu (Usher Institute of Population Health Sciences and Informatics). Dobitnica je priznanja za objavu jednog od najčitanijih radova 2018./2019. godine u znanstvenom časopisu FEBS Letters. Aktivno govori engleski, njemački i španjolski jezik.

Objavila je šest znanstvenih i jedan stručni rad te sudjelovala na više međunarodnih kongresa s posterskim priopćenjima.

Znanstveni radovi (CC):

1. **Rudman, N.**, Kifer, D., Kaur, S., Simunović, V., Cvetko, A., Pociot, F., Morahan, G. & Gornik, O. (2022) Children at onset of type 1 diabetes show altered *N*-glycosylation of plasma proteins and IgG. *Diabetologia* doi: 10.1007/s00125-022-05703-8.

2. Sharapov, S., Shadrina, A., Tsepilov, Y., Elgaeva, E., Tiys, E., Feoktistova, S., Zaytseva, O., Vuckovic, F., Cuadrat, R., Jäger, S., Wittenbecher, C., Karssen, L., Timofeeva, M., Tillin, T., Trbojević-Akmačić, I., Štambuk, T., **Rudman, N.**, Krištić, J., Šimunović, J., Momčilović, A., Vilaj, M., Jurić, J., Slana, A., Gudelj, I., Klarić, T., Puljak, L., Skelin, A., Kadić, A., Van

Zundert, J., Chaturvedi, N., Campbell, H., Dunlop, M., Farrington, S., Doherty, M., Dagostino, C., Gieger, C., Allegri, M., Williams, F., Schulze, M., Lauc, G. & Aulchenko, Y. (2021) Replication of 15 loci involved in human plasma protein *N*-glycosylation in 4802 samples from four cohorts. *Glycobiology*, 31 (2), 82-88 doi:10.1093/glycob/cwaa053.

3. 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, M. & Lauc, G. (2020) Plasma *N*-Glycans as Emerging Biomarkers of Cardiometabolic Risk: A Prospective Investigation in the EPIC-Potsdam Cohort Study. *Diabetes care*, 43 (3), 661-668 doi:10.2337/dc19-1507.

4. **Rudman, N.**, Gornik, O. & Lauc, G. (2019) Altered *N*-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS letters*, 593 (13), 1598-1615 doi:10.1002/1873-3468.13495.

5. Pavić, T., Dilber, D., Kifer, D., **Selak, N.**, Keser, T., Ljubičić, Đ., Vukić Dugac, A., Lauc, G., Rumora, L. & Gornik, O. (2018) *N*-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Translational Medicine*, 16 (1), 323, 15 doi:10.1186/s12967-018-1695-0.

6. Keser, T., Gornik, I., Vučković, F., **Selak, N.**, Pavić, T., Lukić, E., Gudelj, I., Gašparović, H., Biočina, B., Tilin, T., Wennerström, A., Männistö, S., Salomaa, V., Havulinna, A., Wang, W., Wilson, J., Charutvedi, N., Perola, M., Campbell, H., Lauc, G. & Gornik, O. (2017) Increased plasma *N*-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 60 (12), 2352-23.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Doktorski rad

N-glikom i genom u razumijevanju šećerne bolesti tipa 1

Najda Rudman

SAŽETAK

N-glikozilacija proteina plazme povezana je s komplikacijama šećerne bolesti tipa 1, dok je uloga ove enzimske modifikacije proteina u nastanku same bolesti neistražena. S razvojem šećerne bolesti tipa 1 do sada je povezano više od 50 gena, među kojima su i glikoziltransferazni geni. Glavni ciljevi ovog istraživanja su identifikacija *N*-glikana ukupnih proteina plazme i IgG-a karakterističnih za ranu fazu šećerne bolesti tipa 1 te gena kojima su *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 regulirani. Istraživanje je uključilo 1917 djece i adolescenata (0,6 – 19,1 godina) čiji su uzorci krvne plazme prikupljeni unutar tri mjeseca od dijagnoze šećerne bolesti tipa 1 kroz Danski registar dječjeg i adolescentnog dijabetesa, kao i 265 zdravih srodnika. *N*-glikani ukupnih proteina plazme i IgG-a analizirani su upotrebom tekućinske kromatografije, dok je genotipizacija 1105 djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 provedena pomoću komercijalnog čipa (ImmunoChip, Illumina Infinium) koji sadrži 183 546 polimorfizama pojedinačnih nukleotida važnih za razvoj bolesti posredovanih imunološkim sustavom. Nakon navedenih analiza provedena je genomska asocijacijska studija. Ovo istraživanje pokazalo je da je šećerna bolest tipa 1 povezana s porastom oligomanoznih *N*-glikana i *N*-glikana s račvajućim *N*-acetilglukozaminom te padom monogalaktoziliranih *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a, kao i s porastom disijaliniziranih *N*-glikana IgG-a. Modeli temeljeni na *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a su pokazali jako dobru diskriminacijsku moć između djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika (AUC > 0,9). Tri prethodno identificirana *N*-glikozilacijska lokusa (*MGAT3*, *MGAT5* i *ST6GAL1*) povezana su s razinama *N*-glikana u ovom istraživanju, kao i *C3* lokus na kromosomu 19 koji do sada nije bio povezan s *N*-glikozilacijom. *C3* kodira glavni protein sustava komplementa te su dva *C3* SNP-a (sinonimni i nesinonimni) povezana s razinama Man9 glikana ukupnih plazmatskih proteina. S obzirom da se takav Man9 glikan nalazi na *C3* domeni uključenoj u interakciju patogena i *C3* proteina, promjene u razinama Man9 mogle bi potencijalno interferirati s aktivacijom sustava komplementa u šećernoj bolesti tipa 1. Navedena otkrića pružaju temelje za daljnja istraživanja mehanizama koji reguliraju *N*-glikozilaciju u šećernoj bolesti tipa 1.

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

Rad sadrži: 92 stranice, 13 slika, 16 tablica i 186 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *N*-glikani, novodijagnosticirana šećerna bolest tipa 1, prediktivni model, ukupni plazmatski proteini, imunoglobulin G, genomska asocijacijska studija

Mentor: prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Jerka Dumić
doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
prof. dr. sc. Lea Smirčić Duvnjak

Rad prihvaćen: 18. svibnja 2022.

Basic documentation card

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

Doctoral dissertation

N-glycome and genome in comprehension of type 1 diabetes

Najda Rudman

SUMMARY

Alterations of plasma *N*-glycosylation have mostly been studied in association to diabetes complications, whereas the role of these changes in type 1 diabetes onset is largely unknown. The present study was undertaken to determine plasma *N*-glycans representative of the type 1 diabetes onset and to gain the knowledge of genes regulating these changes. Plasma and IgG *N*-glycans were chromatographically analysed in a recent-onset 1917 type 1 diabetes cases (0.6-19.1 years) and their 244 unaffected siblings whose plasma samples were collected through the Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes. This study identified an increase in the proportion of plasma and IgG high-mannose and bisecting GlcNAc structures, a decrease in monogalactosylation, and an increase in IgG disialylation characteristic of the early phase of type 1 diabetes. A notable discriminative power between children with type 1 diabetes and their healthy siblings was yielded with models including age, gender, and *N*-glycans with AUCs of 0.915 and 0.869 for addition of plasma and IgG *N*-glycans, respectively. Increasing the efficacy of models to determine individuals at risk of disease development would be a considerable asset for type 1 diabetes prevention trials. 183,546 single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the commercially available ImmunoChip that covers all major autoimmune diseases were determined for 1105 study participants and genetic association study on plasma and IgG *N*-glycome data in type 1 diabetes was conducted. Three of the previously established *N*-glycosylation loci (*MGAT3*, *MGAT5*, and *ST6GAL1*) were significantly associated with *N*-glycosylation in the discovery cohort, as well as a novel locus on chromosome 19 encoding the C3, the pivotal protein of the complement activation pathway. This study of type 1 diabetes cases revealed a new genetic association of the *C3* gene with *N*-glycosylation, namely of two *C3* SNPs (synonymous and non-synonymous) with the Man9 glycan of total plasma proteins. Since such Man9 glycan is located on the domain implicated in pathogen binding on the C3 protein, the identified *N*-glycan alterations might potentially be implicated in the complement activation in type 1 diabetes. These findings offer starting points for further functional follow-up studies of mechanisms regulating *N*-glycosylation in type 1 diabetes.

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

Thesis includes: 92 pages, 13 figures, 16 tables and 186 references. The original is in Croatian language.

Keywords: *N*-glycans, type 1 diabetes onset, predictive model, plasma proteins, IgG, genetic association study

Mentor: Dr. Olga Gornik Kljaić, Professor

Reviewers: Dr. Jerka Dumić, Professor
Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. Lea Smirčić Duvnjak, Professor

The thesis was accepted: May 18th 2022