

# N-glikozilacija imunoglobulina A u šećernoj bolesti tipa 1

---

Shkunnikova, Sofia

Master's thesis / Diplomski rad

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:163:554202>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

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



**Sofia Shkunnikova**

***N*-glikozilacija imunoglobulina A u šećernoj  
bolesti tipa 1**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

*Zahvaljujem dragoj mentorici, prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić na pruženoj prilici, motivaciji, korisnim savjetima i odvojenom vremenu.*

*Zahvaljujem Mateju Nemčiću, mag. biol. mol., na strpljenju, pomoći i društvu u labosu. Zahvaljujem dr. sc. Domagoju Kiferu na pomoći u snalaženju u šumi podataka.*

*Hvala svim članovima Zavoda i kolegici Pavli Kraljević na ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Hvala mojoj obitelji, mami, tati i sestri, dragim prijateljima i prijateljicama, kolegama i kolegicama te mom dečku na ljubavi i podršci tijekom studija. Uz vas mogu sve.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>2</b>
1.1. Šećerna bolest tipa 1 .....	3
1.2. Imunoglobulin A .....	6
1.3. Glikozilacija .....	8
1.4. <i>N</i> -glikozilacija IgA u šećernoj bolesti tipa 1 .....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
3.1. Ispitanici .....	16
3.2. Priprema uzoraka .....	16
3.3. Materijali .....	16
3.4. Priprema otopina i pufera .....	17
3.5. Postupak izolacije IgA iz plazme .....	18
3.6. Postupak deglikozilacije <i>N</i> -glikana IgA .....	19
3.7. Postupak obilježavanja <i>N</i> -glikana IgA .....	19
3.8. Postupak pročišćavanja <i>N</i> -glikana IgA .....	19
3.9. HILIC-UPLC analiza <i>N</i> -glikana IgA .....	20
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>21</b>
4.1. Kromatogramski profil <i>N</i> -glikana IgA .....	22
4.2. Usporedba zastupljenosti površine ispod glikanskih pikova <i>N</i> -glikana IgA .....	23
4.3. Usporedba zastupljenosti deriviranih svojstava u glikanskom profilu IgA .....	28
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>33</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>37</b>
<b>7. POPIS KRATICA</b> .....	<b>39</b>
<b>8. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>42</b>
<b>9. SAŽETAK</b> .....	<b>50</b>
<b>10. SUMMARY</b> .....	<b>52</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>54</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

## 1.1. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (engl. *type 1 diabetes mellitus*, T1DM) je multifaktorska, kronična i autoimuna bolest koja nastaje kao posljedica nedostatka endogene sekrecije inzulina iz pankreasnih  $\beta$ -stanica. Od T1DM najčešće obolijevaju djeca i adolescenti s učestalošću od oko 10% od ukupno oboljelih. Incidencija T1DM pokazuje značajne varijacije s obzirom na dob, spol, geografske i kalendarske osobitosti (Wild *et al.* 2004). Patogeneza bolesti započinje infiltracijom stanica imunskog sustava u tkivo pankreasa što dovodi do upalnog procesa, inzulitisa (Mathis *et al.* 2001).

Inzulitis prelazi u šećernu bolest uništavanjem tkiva  $\beta$ -stanica pankreasa što je potaknuto generacijom autoprotutijela, najčešće na inzulin (engl. *insulin autoantibody*, IAA) ili na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase autoantibody*, GADA) te se ta protutijela mogu naći u serumu bolesnika od nekoliko tjedana do čak 20 godina prije nastupa simptoma (Ilonen *et al.* 2019). Napredovanjem bolesti počinje stvaranje autoprotutijela na antigene na površini  $\beta$ -stanica (engl. *islet-cell autoantibody*, IA-2) i na transporter cinka ZnT8 (Redondo *et al.* 2013). Dakle, infiltracijom stanica imunskog sustava u pankreas te vezanjem autoprotutijela na  $\beta$ -stanice pankreasa započinje njihovo uništavanje pri čemu koncentracija inzulina u krvi pada. Točan mehanizam uništavanja  $\beta$ -stanica nije u potpunosti razjašnjen, međutim poznato je da veliku ulogu u tom procesu imaju autoreaktivne CD8+ citotoksične T-stanice. Inače, CD8+ limfociti prepoznaju epitope koje prezentiraju stanice s MHC I molekulama, dakle sve stanice s jezgrom (Pinkse *et al.* 2005).

Zbog nedostatka inzulina u krvi, regulacija unosa glukoze u stanice postaje nepravilna te se koncentracije glukoze u krvi povećava, odnosno dolazi do hiperglikemije. Najučestaliji simptomi T1DM posredovani hiperglikemijom uključuju kroničan umor, smanjenje energije, poliuriju, polidipsiju, naglo debljanje ili mršavljenje, neuobičajenu glad i zamućenje vida te posljedičnu sljepoću (Alshiekh *et al.* 2016). Uobičajena terapija za T1DM su pripravci inzulina odgovarajuće duljine terapijskog djelovanja za održavanje normoglikemije – kratkog, srednjeg ili dugog djelovanja (Hartman 2008). Osim toga, postoje i noviji pristupi liječenju T1DM kao što su bionička gušterača, imunosupresivna terapija kako bi se smanjio imunski odgovor, transplantacija  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića, genska terapija i terapija matičnim stanicama, čime se na kratko vrijeme može i ukloniti potreba za inzulinom (Tripathi *et al.* 2011). Do komplikacija T1DM dolazi ukoliko se pacijenti ne pridržavaju propisane terapije inzulinom pri čemu razlikujemo akutne i kronične komplikacije. Akutne komplikacije nastupaju u kratkom

vremenu i mogu biti opasne po život, a uključuju dijabetičku ketoacidozu, laktacidozu te hipoglikemijsku komu. Do dijabetičke ketoacidoze dolazi uslijed manjka inzulina – tada se aktivira lipaza koja uzrokuje porast slobodnih masnih kiselina u krvi. Višak slobodnih masnih kiselina prerađuje se u jetri do acetyl-CoA, a kada je on prisutan u većoj koncentraciji od uobičajene dolazi do kondenzacije u acetocetenu kiselinu, koja snižava pH krvi u uzrokuje metaboličku acidozu. Do laktatne acidoze dolazi zbog pojačanog stvaranja i/ili smanjenog iskorištavanja laktata u anaerobnim uvjetima. Hipoglikemija je najčešća akutna komplikacija T1DM, a s obzirom na to da je mozak najosjetljivije tkivo na nedostatak glukoze, takvi pacijenti mogu upasti i u stanje kome. Kronične komplikacije nastaju kao posljedica trajnog izostanka regulacije glikemije, a najčešće su kardiovaskularne bolesti, retinopatija, nefropatija, neuropatija, dijabetičko stopalo i posljedične amputacije donjih ekstremiteta. Zajednički mehanizam nastanka kroničnih komplikacija je oksidacijski stres do kojeg dolazi na dva načina – nastankom kasnih produkata glikiranja ili autooksidacijom glukoze što uzrokuje generaciju slobodnih radikala (Papatheodorou *et al.* 2015).

Dijagnoza šećerne bolesti postavlja se prema anamnezi, kliničkoj slici te laboratorijskim testovima. Referentni interval za koncentraciju glukoze u krvi je 4,4-6,4 mmol/L. Za postavljanje dijagnoze T1DM potrebno je imati barem 2 nalaza u kojem je glikemija natašte 7,0 mmol/L i/ili slučajna glikemija je iznad 12,2 mmol/L. Ukoliko je nalaz koncentracije glukoze u krvi unutar referentnog intervala, a ipak postoji sumnja da se radi o T1DM, potrebno je izvršiti oralni test tolerancije na glukozu (engl. *oral glucose tolerance test*, OGTT). Najvažniji pokazatelj dugoročne kontrole šećerne bolesti je glikirani hemoglobin (HbA1c), specifični ireverzibilni produkt glikacije hemoglobina, koji pokazuje kontrolu bolesti tijekom 2-3 mjeseca (koliko iznosi život eritrocita). Osim HbA1c, može se mjeriti i koncentracija fruktozamina, odnosno ketoamina proteina plazme, ali on odražava kontrolu glikemije unutar samo 2-3 tjedna. Iako se ne može smatrati zamjenom za HbA1c, ipak može biti koristan marker glikemije za bolesnike s anemijom i skraćenim životom eritrocita (Rahbar 2005, p. 1).

T1DM bolest je složene patogeneze koja obuhvaća i genetičke i okolišne faktore. Genski polimorfizmi koji uzrokuju povećanu sklonost razvitku bolesti T1DM dobro su definirani, dok je utjecaj vanjskih faktora još uvijek nepoznat. Najveći genetski faktor za povećanje rizika od oboljenja od T1DM pripisuje se genima iz porodice HLA (engl. *human leukocyte antigen*), posebno genotipovima HLA DR i HLA DQ, a povećan rizik povezuje se i uz inzulinski gen na kromosomu 11 (Nerup *et al.* 1974, Ilonen *et al.* 2019). Promatrajući bolest kroz povijest uz

pretpostavku da genski i okolišni čimbenici imaju jednaku važnost u nastanku bolesti, trebali bismo opaziti jednaki broj oboljelih iz godine u godinu. Međutim, u zadnjih nekoliko desetljeća primjećuje se trend porasta oboljelih od T1DM, što se može pripisati samo promjenama u okolišnim uvjetima i stila života. Mnoga istraživanja ukazuju na to da veliku ulogu u patogenezi T1DM imaju virusne infekcije (citomegalovirus, enterovirusi, echovirusi, Epstein Barr virus) koje mijenjaju imunski odgovor pojedinca i čine njegov imunski sustav podložniji razvoju autoimunih bolesti (Dotta i Sebastiani 2014). Osim toga, kao faktori koji povećavaju šansu za razvojem T1DM navode se i stanje mikrobiote crijeva pojedinca (Ilonen *et al.* 2019), starija dob roditelja (Dahlquist *et al.* 2005), razlike u prehrani kao što je konzumacija kravljeg mlijeka, deficit vitamina D i nizak unos cinka (Knip *et al.* 2014), te produljeno izlaganje stresnim situacijama i toksičnim supstancama (Snedeker i Hay 2012). Unatoč navedenom, stvarni razlog, kao i točni mehanizmi nastanka ove bolesti nedovoljno su poznati stoga je svako novo saznanje o ulozi pojedinih bioloških molekula u patogenezi T1DM od velike važnosti.

S obzirom na sve veći broj oboljelih od ove kronične autoimune bolesti i na to da okolišni čimbenici imaju veliku ulogu u razvoju T1DM, pokazuje se potreba za kreiranjem testova i pretraga koji će pokazati potencijal razvoja T1DM u pojedinca i pružiti mogućnost za preventivnim promjenama životnog stila koje će omogućiti odgodu ili sprječavanje razvoja bolesti i simptoma. Do sada, promjene N-glikozilacije proteina se pokazala kao izvrsni biomarker za patološke promjene u mnogim bolestima koje se manifestiraju nemogućnošću održavanja normoglikemije, uključujući šećernu bolest tipa 1 i 2, gestacijsku šećernu bolest, MODY i druge (Keser *et al.* 2017, Rudman *et al.* 2019).



## 1.2. Imunoglobulin A

Imunoglobulin A (IgA) može se u ljudskom organizmu pronaći u serumu i u sekretima koji oblažu sluznicu probavnog i respiratornog trakta, a može se u manjim količinama naći i u suzama, slini i kolostromu. U serumu se nalazi kao monomer u dva podrazreda (IgA1 i IgA2) u koncentraciji od 1-3 mg/mL, što ga stavlja na drugo mjesto po zastupljenosti u krvi. Brzina njegove sinteze dvostruko je veća od ostalih imunoglobulina kako bi se nadoknadilo njegovo kratko poluvrijeme u serumu (Yoo i Morrison 2005), a sintetizira ga se više nego svih imunoglobulina u tijelu zajedno, 60 mg na kilogram ljudskog tijela (de Sousa-Pereira i Woof 2019). Većina serumskog IgA je u obliku IgA1 te čini 85% ukupnog IgA u serumu i do 14% ukupnih imunoglobulina. Njegova zglobna regija ima 13 aminokiselina koje omogućavaju obranu od antigena inkapsuliranih bakterija. IgA2 nema zglobnu regiju te ima manji udio glikanskih struktura od IgA1. Mada je funkcionalno aktivniji od IgA1, ne aktivira komplement (Mattu *et al.* 1998).

Glikani su ključni za funkciju IgA. Sastav ugljikohidratnih jedinica O-vezanih glikana u zglobnom području je promjenjiv, a prevladavajući oblici uključuju disaharid *N*-acetilgalaktozamin-galaktoza i njegovi mono- i disijalinizirani oblici (Field *et al.* 1989). Zglobna regija se pretežno sastoji od aminokiselina prolina, serina i treonina te se u njoj nalazi mjesto za vezanje 5 O-vezanih glikanskih lanaca koje čini *N*-acetilgalaktozamin s  $\beta$ -1,3-vezanom galaktozom na koju se može nastavljati sijalinska kiselina (Novak *et al.* 2000).

Na sluznici nalazi se u obliku karakterističnog dimera (rijeđe tetramera) koji se naziva sekretorni IgA (sIgA). IgA ima karakterističnu građu imunoglobulina – monomer IgA građen je od dva teška i dva laka lanca. U dimer se IgA povezuje pomoću J-lanca (joining) te ima sekretornu komponentu koja služi za usmjeravanje za sekreciju iz plazma stanice prilikom njihove sinteze. Podrazredi IgA razlikuju se prema tipu teškog lanca koji može biti tipa  $\alpha$ 1 ili  $\alpha$ 2 te prema postojanju zglobne regije koja ima zaštitnu funkciju za djelovanje proteaza mikroorganizama (Steffen *et al.* 2020). Ljudske sluznice imaju površinu od 400 m<sup>2</sup>, a s obzirom na njihovu izloženost okolišu, može se zaključiti da IgA ima kritičnu ulogu u obrani organizma od različitih patogena (de Sousa-Pereira i Woof 2019).

IgA djeluje preko nekoliko mehanizama uništavanja patogena – neutralizacija, aktivacija komplementa te interakcija s receptorima preko Fc regije odnosno imunomodulacija. Neutralizacija podrazumijeva direktno vezanje IgA, točnije njegovih glikanskih struktura na antigene ili na cijele patogene u svrhu sprječavanja njihovog vezanja i prodiranja u organizam putem sluznice. Tako nastali agregati više nemaju sposobnost adsorpcije na mukozne površine.

Osim neutralizacije, IgA može djelovati putem aktivacije sustava komplementa i to alternativnim putem, ali njegova sposobnost za vezanje na lektin koji veže manozu (engl. *manose binding lectin*, MBL) uvelike ovisi o njegovom stupnju glikozilacije. Zadnji put djelovanja IgA podrazumijeva njegovo vezanje na stanične receptore, poglavito iz porodice Fc $\alpha$ RI i promjenu imunosnog odgovora posredovanog tim stanicama, kao što je fagocitoza, stvaranje reaktivnih kisikovih specija, poticanje eozinofilne degranulacije, modulacija humoralnog odgovora na parazite i slično. (de Sousa-Pereira i Woof 2019).

Zadnji mehanizam koji podrazumijeva vezanje na Fc $\alpha$ RI otvara brojne mogućnosti za terapijske opcije za različita tumorska oboljenja. Nedavna istraživanja pokazala su da se vezanjem monoklonskih IgA protutijela na Fc $\alpha$ RI receptore na neutrofile iste može privući na mjesto kolorektalnog karcinoma putem kemotaksije s leukotrijenima, što posljedično dovodi do uništavanja tumorskih stanica. U istoj studiji provodila se usporedba monoklonskih imunoglobulin G (IgG) protutijela za istu namjenu, međutim IgA se pokazao uspješnijim (Huls *et al.* 1999).

IgA vrlo je važan imunoglobulin te njegov nedostatak može uzrokovati brojne bolesti – selektivni manjak IgA podrazumijeva koncentracija IgA u serumu ispod 0,05 g/L. Klinički se taj manjak očituje u obliku čestih infekcija sinusa i gornjih i donjih dišnih puteva, kroničnih infekcija gastrointestinalnog trakta, alergija i pojave autoimunskih bolesti (Yazdani *et al.* 2017).

Može se zaključiti da IgA krasi brojne specifične i unikatne funkcije koje se mogu promatrati u kontekstu mnogih bolesti, ali i terapijskih opcija. Na primjer, postoje istraživanja koja dokazuju povezanost promjena koncentracije ukupnih imunoglobulina, IgG i IgA s razvojem šećerne bolesti kod novodijagnosticirane djece i kod starijih bolesnika (Svensson *et al.* 2012, Ali *et al.* 2017). Rezultati tih istraživanja pokazuju da je u početku bolesti smanjena koncentracija IgA u serumu, a koncentracija IgG u serumu je povišena. Kako bolest progredira, koncentracija oba Ig u serumu opada. Takvo opažanje može se objasniti time da hiperglikemija smanjuje proizvodnju Ig, međutim takav mehanizam dokazan je samo u *in vitro* uvjetima i ne može se ekstrapolirati na ljudski organizam. Osim toga, dokazano je da razlike u koncentracijama Ig ne koreliraju s dobi, spolom i indeksom tjelesne mase (Sayarifard *et al.* 2012).

IgA može imati i proinflamatorne i antiinflamatorne karakteristike – npr. IgA u serumu može inducirati proupalne reakcije, kao što je otpuštanje citokina i kemokina te fagocitoza. Brojna istraživanja su pokazala da serumski IgA doprinosi autoimunim bolestima, kao što je upalna bolest crijeva ili reumatoidni artritis (Hansen *et al.* 2019). Nasuprot tome, opisano je i

nekoliko protuupalnih učinaka IgA u serumu, sugerirajući da IgA ima zaštitnu ulogu u borbi s autoimunim mehanizmima i autoinflamacijom. Pokazano je da unakrsno povezivanje Fc $\alpha$ RI ili stimulacija s monomernim IgA inhibiralo je proizvodnju proupalnih citokina i induciralo ekspresiju IL-10 u ljudskim monocitima (Lecocq *et al.* 2013). Jedan od čimbenika koji utječe na pro- ili antiinflamatorne funkcije IgA je zasigurno glikozilacija. Otkriveno je da IgA sadrži velike količine galaktoze, sijalinske kiseline, *N*-acetilglukozamina i fukoze. (Plomp *et al.* 2018) Osim toga, pronađene su vrlo značajne razlike između glikozilacije IgA1 i IgA2. IgA1 ima više sijalinske kiseline i galaktoze te je pokazao više razine račvajućeg *N*-acetilglukozamina u usporedbi s IgA2 na zajedničkim mjestima glikozilacije. Zanimljivo je da su također pronađeni glikani koji nisu bili kompleksnog, već visokog manoznog ili hibridnog tipa (Steffen *et al.* 2020). Ovaj fenomen je u velikoj suprotnosti s IgG, za koji su glikani nekompleksnog tipa pronađeni samo u vrlo malim količinama. Osim toga, IgG je općenito puno manje sijaliniziran i galaktoziliran od IgA. Ta se činjenica može objasniti različitim položajima glikana u IgA i IgG, pri čemu su IgA glikani izloženiji vanjskoj strani molekule imunoglobulina, što može rezultirati većom dostupnošću, a time i većom brzinom galaktozilacije i sijalinizacije (de Haan *et al.* 2018). Trenutno nije poznato kako točno različita glikozilacijska mjesta IgA utječu na njegove efektorske funkcije. Promjena glikozilacijskog profila IgA, koji je ključan za definiranje proinflamatorne ili antiinflamatorne uloge IgA, slabo je istražena u kontekstu bolesti i upalnih stanja. Postoje podaci koji ukazuju na ulogu IgA u povećanju rizika za razvoj autoimunih bolesti, uključujući i T1DM, ali točna uloga IgA i procesi odgovorni za povećanje tog rizika ostaju nerazjašnjeni (Dzidic *et al.* 2017).

### 1.3. Glikozilacija

U zadnjih nekoliko desetljeća sve se veći naglasak stavlja na ulogu glikanskih struktura u kontekstu svojstava proteina kao što je topljivost i stabilnost, te poprimanja završne i aktivne konformacije (Jaeken 2016). Ranije, smatralo se da sve funkcije proteina potječu od slijeda aminokiselina koje posljedično uvjetuju njegovu konačnu konformaciju, a time i funkcionalnost. Međutim, danas je poznato da su glikani odgovorni za trodimenzionalnu strukturu proteina pomoću koje on stupa u interakciju sa svojim okolišem te su sastavni i nerazdvojni dio proteinske strukture (Moremen *et al.* 2012). Takve strukture nazivaju se glikokonjugati – to su makromolekule građene od ugljikohidratnih jedinica (glikana) kovalentno vezanih na proteine ili lipide putem atoma dušika (*N*-glikozilacija) ili kisika (*O*-glikozilacija) Glikanske funkcije mogu se podijeliti u četiri glavne skupine – strukturalne,

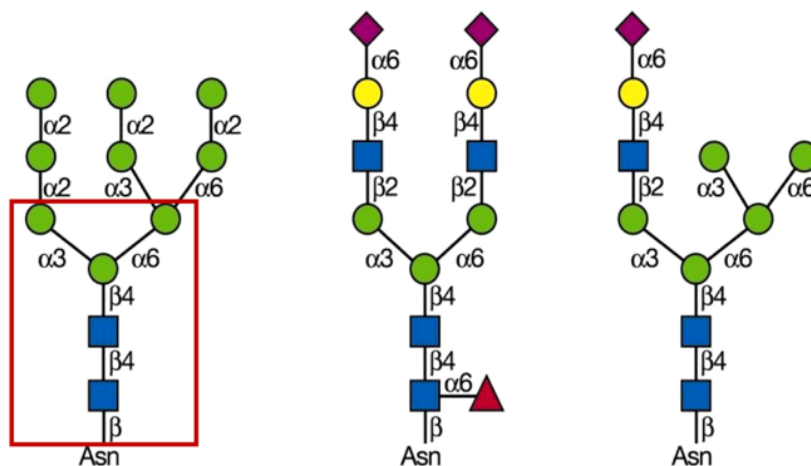
modularne, ekstrinzično prepoznavanje i molekularna mimikrija. Strukturalne i modulatorne funkcije glikana podrazumijevaju da glikani imaju važnu ulogu u tvorbi konačne i aktivne konformacije proteina, a vezanjem različitih glikanskih struktura na istu polipeptidnu okosnicu može se mijenjati funkcija konačnog proteina. Ekstrinzično prepoznavanje podrazumijeva da su glikani uključeni u većinu interakcija na površini stanice s toksinima, bakterijama i virusima te drugim stanicama (Scott *et al.* 2014). Važno je istaknuti da glikane nemaju samo eukarioti, već i prokarioti, a njima glikanske strukture služe kako bi se maskirale od imunskog sustava domaćina (Varki *et al.* 2009).

Otkriveno je više od 7000 različitih glikanskih struktura koje se mogu povezati putem kovalentnih veza s polipeptidom i dati konačni glikoprotein. S obzirom na to da se u izgradnji glikokonjugata koristi svega desetak monosaharida, njihova raznolikost nije velika. Međutim, glikom eukariota je izrazito je kompleksan, a čimbenici koji omogućavaju tako veliku raznolikost glikana jesu različit slijed monosaharida, položaj glikozidne veze, anomerna konfiguracija glikozidne veze ( $\alpha$  ili  $\beta$ ), broj mjesta grananja i položaj mjesta grananja. Raznolikost glikana posljedično značajno povećava i kompleksnost proteoma jer se jedan genski produkt može glikozilirati na velikom broju glikozilacijskih mjesta i s velikim brojem raznolikih glikanskih struktura pri čemu može tvoriti na tisuće glikoproteina koji mogu imati različite funkcije, ovisno o glikanima (Hülsmeier *et al.* 2007).

Procesom glikozilacije upravlja se pomoću velikog broja gena koji kodiraju za enzime koji posljedično tvore jednu dinamičku mrežu koja se kontinuirano mijenja. Enzimi za glikozilaciju su brojni, a jednim imenom nazivaju se glikoziltransferaze. Njihov krajnji produkt ovisi o regulacijskim faktorima kao i o različitim polimorfizmima samih enzima, epigenetičkim faktorima, okolišnim čimbenicima, dostupnosti supstrata i mnogim drugima. Regulacija biosintetskih puteva glikozilacije izrazito je kompleksna i na nju utječu brojni faktori kao što su dostupnost određenog mjesta glikozilacije, vrijeme provedeno u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu, dostupnost gradivnih jedinica i aktiviranih šećera te genetske osobitosti pojedinca (Varki *et al.* 2009).

Važnost pravilne sinteze glikoproteina može se vidjeti na primjeru nasljednih poremećaja glikozilacije. Ta su oboljenja uzrokovana pogreškama u sintezi *O*- ili *N*-vezanih glikana, dolikola, prekursora ili glikozilfosfatidilinozitolnih sidara (Hennet i Cabalzar 2015). Osim toga, sve veći broj studija povezuje promjene glikozilacije s autoimunim bolestima, raznim oblicima raka i težim oblicima/posljedicama zaraznih bolesti (Gornik i Lauc 2008).

Glikozilacija je ubikvitarna enzimatska modifikacija proteina koja se odvija u citosolu, endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. Glikani mogu se vezati na proteine *O*- ili *N*-glikozidnom vezom. U ovom diplomskom radu naglasak je na *N*-glikanima. *N*-glikozidna veza nastaje kada se *N*-acetilglukozamin na reducirajućem kraju šećernog lanca poveže s asparaginom u glikozilacijskom mjestu. Sve *N*-glikanske strukture dijele zajedničku šećernu jezgru slijeda  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ . Mjesto za *N*-glikozilaciju je slijed aminokiselina u nizu asparagin-X-serin/treonin unutar primarnog slijeda aminokiselina, a X predstavlja bilo koju aminokiselinu. *N*-glikani mogu se klasificirati su u tri osnovna tipa s obzirom na gradivne jedinice – oligomanozni, kompleksni i hibridni (redom, Slika 1). U oligomanoznom tipu na jezgru vezane su isključivo molekule manoze, dok se u kompleksnom tipu može naći i do 6 grananja koje započinju s GlcNAc, a svaka se od njih može produžiti ponavljanjem  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$  (LacNAc). U hibridnom tipu Man produžuje  $\text{Man}\alpha 1-6$  granu jezgre, dok jedna ili dvije molekule GlcNAc produžuju  $\text{Man}\alpha 1-3$  granu jezgre.



Slika 1. Tri osnovna tipa *N*-vezanih glikana, od kojih svaki sadrži sržnu strukturu  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$  označenu crvenim pravokutnikom krajnje lijevo. Zeleni krug – manoz, plavi kvadrat – *N*-acetilglukozamin, ružičasti romb – sijalinska kiselina, žuti krug – galaktoza, crveni trokut – fukoza (Varki et al. 2009)

*N*-glikani sintetiziraju se u dvije faze, a prva započinje kotranslacijski na citoplazmatskoj strani endoplazmatskog retikuluma. Prvi korak u vezanju *N*-glikana na protein je stvaranje oligosaharidnog prekursora koji je vezan na nosaču dolikol fosfatu (Dol-P) koji je smješten na citoplazmatskoj strani membrane ER. Dol-P je lipid koji je kod eukariota građen od 19 izoprenskih 5C jedinica. Prva šećerna jedinica koja se na njega veže je GlcNAc-1-P iz aktiviranog šećera UDP-GlcNAc te tako nastaje struktura Dol-P-P-GlcNAc. Na nju se veže još

jedna jedinica GlcNAc te 5 jedinica manoze koja je prethodno bila vezana na GDP tvoreći aktivirani šećer odnosno prekursor. Sada struktura Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> okreće se na luminalnu stranu ER uz pomoć enzima flipaze. Na luminalnoj strani ER na strukturu Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> dodaje se 4 molekule manoze koju nosi prekursor Dol-P-Man i 3 glukoze koju nosi Dol-P-Glc. Time nastaje zreli Dol-P-P-glikan te se osnovni glikan strukture Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> može prenijeti na već spomenute i opisane slijedove Asn-X-Ser/Thr ciljnog proteina. Unutar ER pod djelovanjem glukozidaza i manozidaza uklanjaju se netom dodane molekule glukoze i manoze. Te su reakcije, iako se mogu činiti nelogičnima, čine svojevrsnu kontrolu kvalitete trodimenzionalnog smatanja glikoproteina u konačnu aktivnu konformaciju uz pomoć pomoćnih proteina (kalneksin, kalretikulin) i određuju hoće li se protein prenijeti u GA gdje će se doraditi ili će biti ubikvitiniran i razgrađen.

Ukoliko se glikoprotein smota na odgovarajući način, on će se translocirati u GA gdje se proces uklanjanja manozida nastavlja, te se početni glikanski prekursor svodi se ponovno na svega 5 šećera – Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Na tu se jezgru u procesu terminalne glikozilacije dodaju razni šećeri od kojih su najčešći *N*-acetilglukozamin, galaktoza, sijalinska kiselina i fukoza. Terminalna se glikozilacija događa uz pomoć glikoziltransferaza koje uspostavljaju glikozidne veze i time sintetiziraju glikanski lanac te glikozidaza koje hidrolizom veze uzrokuju njegovo pucanje. Međusobna interakcija tih enzima omogućuje stvaranje raznolikih i kompleksnih glikanskih struktura koje im omogućuju čitav spektar funkcija koje obavljaju u gotovom glikoproteinu (Varki *et al.* 2009).

#### **1.4. *N*-glikozilacija IgA u šećernoj bolesti tipa 1**

Od prije je poznato da su razine specifičnih glikana vezanih za serumske proteine kod oboljelih od T1DM povišene, što se može objasniti porastom koncentracije samih glikoproteina u krvi s obzirom na povišenu koncentraciju glukoze u krvi i proces spontane glikacije. To je neenzimatska reakcija reduktivnih šećera i proteina, a najčešći produkt takve reakcije je glikirani hemoglobin koji u kliničkoj praksi služi za dugoročno praćenje održavanja normoglikemije kod oboljelih od šećerne bolesti. Međutim, u recentnijim istraživanjima potvrđeno je da se ne mijenja samo koncentracija glikana, već i njihova struktura. Iz toga se može zaključiti da glikani imaju određenu ulogu u patofiziologiji te bolesti.

Pretpostavljeni mehanizam oštećenja tkiva zbog visoke koncentracije glukoze u krvi je onaj posredovan putem biosinteze heksozamina. Tim se putem u zdravih osoba iskorištava do

3% ukupne glukoze. U uvjetima hiperglikemije postotak glukoze koja ulazi u taj biosintetski put povećat će se pri čemu će nastati više konačnog produkta. Konačni produkt tog puta je uridin difosfat *N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), aktivirani šećer vezan na nukleobazu. Ti aktivirani šećeri koriste se kao prekursori za sintezu glikanskih struktura, stoga je i logično da se kod takvih bolesnika povećava udio visokorazgranatih *N*-glikana proteina plazme. Promjene tog tipa se mogu uočiti i kod zdravih pojedinaca koji imaju rizik od razvoja šećerne bolesti u kasnijoj životnoj dobi. Osim prediktivnog potencijala *N*-glikana na proteinima plazme, promjena *N*-glikozilacije može se povezati i s komplikacijama T1DM. U recentnom istraživanju pokazano je da se kod bolesnika oboljenih od T1DM može uočiti povećanje udjela složenih *N*-glikana uz smanjenje udjela jednostavnijih biantenarnih *N*-glikana među ukupnim glikoformama. Te promjene koreliraju s višim udjelom HbA1c i većim omjerom albumina i kreatinina što odražava lošu kontrolu glikemije kod tih pacijenata te veći rizik za razvoj komplikacija. Pokazano je da su promjene glikozilacije u  $\alpha$ 1-kiselom glikoproteinu povezane s vaskularnim komplikacijama u T1DM.

Postoji mali broj studija koje povezuju IgA i T1DM. U radu kojeg sam predala za Rektorovu nagradu ak. god. 2020./21. pokazano je da se kod djece oboljele od T1DM udio visokorazgranatih, trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih glikana smanjio, a povećao udio oligomanoznih glikana u usporedbi s njihovom zdravom braćom i sestrama. Takav zaključak slaže se i s prethodnim studijama o promjeni glikozilacije u T1DM. Kako su takve promjene u glikozilaciji zabilježene na uzorcima koji su bili uzeti do tri mjeseca nakon dijagnoze T1DM, teško je ekstrapolirati i zaključiti jesu li one posljedica bolesti ili uzrok iste.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**



Promjene u *N*-glikozilacijskom profilu ukupnih proteina plazme i imunoglobulina G u mnogim istraživanjima pokazale su se kao potencijalni prognostički, dijagnostički, ali i terapijski biljeg raznih bolesti, a posebno onih upalnog karaktera. Iako je glikozilacija proteina u šećernoj bolesti tipa 1 (T1DM) područje interesa koje se otvorilo tek nedavno, postoje radovi čiji je cilj bio identificirati promjene glikanskog obrasca na ukupnim proteinima plazme i na imunoglobulinu G (IgG) kao zlatnom standardu za istraživanje glikana. U tim radovima primijećene su promjene kao što su povećani udio razgranatih glikana, oligomanozilacije, galaktozilacije i sijalinizacije. Posljedično, s obzirom da je T1DM karakteriziran promjenama u glikanskom profilu proteina plazme i IgG, zaključuje se da one nose veliki dijagnostički i prognostički potencijal za T1DM.

Glikozilacija imunoglobulina A (IgA) u različitim bolestima općenito je slabije istražena. Imunoglobulin A je protein čija je glavna uloga u organizmu obrana sluznica od napada patogena, primarno na način da ograničava vezanje patogena na mukozu. Osim toga, IgA dokazano ima ulogu u povećanju rizika za razvoj autoimunih bolesti, uključujući i T1DM, ali točan mehanizam nije poznat.

Nedavno su identificirani glikani koji se razlikuju kod djece i adolescenata s T1DM u odnosu na njihovu zdravu braću i sestre, odnosno glikani koji su promijenjeni na samom početku ove bolesti (Shkunnikova, 2021). Cilj ovog rada je identificirati promjene glikozilacije IgA u populaciji odraslih ispitanika s T1DM u odnosu na zdrave ispitanike.

# **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Ispitanici

Uzorci plazme analizirani u ovom diplomskom radu pripadaju bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 u rasponu godina 30-60 s medijanom od 45 godina. U istraživanju je analizirano 84 uzoraka oboljelih od T1DM te je svakom bolesniku pridružen je uzorak zdrave osobe koji odgovara po dobi i spolu koji je poslužio kao kontrola.

Studija je osmišljena u suglasnosti s Helsinškom deklaracijom te su svi sudionici studije potpisali informirani pristanak. Također, studija je odobrena od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

### 3.2. Priprema uzoraka

Po odmrzavanju, uzorci plazme bolesnika i zdravih osoba su centrifugirani 3 minute na 13400 RCF te je supernatant korišten u analizi. Uzorci te slijepa probe i standardi su randomizirani na dvije pločice kako bi se učinak vanjskih faktora sveo na minimum i smanjio broj sustavnih pogrešaka. Kao slijepa proba korištena je ultra čista voda.

### 3.3. Materijali

#### Anorganske kemikalije

Amonij bikarbonat, $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	<i>Acros Organics</i>
Natrij klorid, $\text{NaCl}$	<i>Carlo Erba</i>
Natrij hidrogenfosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	<i>Acros Organics</i>
Kalij dihidrogenfosfat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	<i>Sigma-Aldrich</i>
Kalij klorid, $\text{KCl}$	<i>EMD Milipore</i>
Kloridna kiselina, $\text{HCl}$	<i>Merck</i>

#### Organske kemikalije

Mravlja kiselina, $\text{HCOOH}$ (konc.)	<i>Merck</i>
Etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (96%)	<i>Merck</i>
Tris(hidroksimetil)aminometan, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	<i>Sigma-Aldrich</i>

2-pikolin boran	<i>Sigma-Aldrich</i>
Acetonitril LC-MS razine čistoće	<i>VWR Chemicals</i>
Dimetilsulfoksid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Natrij dodecilsulfat (SDS)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Igepal	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ledena octena kiselina, CH <sub>3</sub> COOH	<i>Merck</i>
Prokainamid	<i>Sigma-Aldrich</i>

## Enzimi

PNG-aza F ( <i>N</i> -glikozidaza)	<i>Promega</i>
------------------------------------	----------------

## 3.4. Priprema otopina i pufera

### Priprema 10xPBS pufera

Za pripremu 1L 10x PBS pufera potrebno je u ultra čistoj vodi otopiti odgovarajuću odvagnutu (Mettler Toledo) masu natrij klorida (NaCl), natrij hidrogenfosfata (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), kalij dihidrogenfosfata (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), i kalij klorida (KCl). Kada se sve soli otope, otopina se nadopuni do 1L u odmjernoj tikvici te se dobivena otopina profiltrira. Provjeri se pH otopine koji mora biti između 6,6 i 6,8.

### Priprema 1xPBS i 5xPBS pufera

Za pripremu 1x PBS pufera pripremljeni 10x PBS pufer razrijedi se u omjeru 1:9 s ultra čistom vodom, pH se prilagodi na 7,4 te se on skladišti u hladnjaku. Za pripremu 5x PBS pufera pripremljeni 10X PBS pufer se razrijedi u omjeru 1:4 s ultra čistom vodom.

### Priprema 0,1 M otopine mravlje kiseline

Za pripremu 200 mL 0,1 mravlje kiseline dodano je 574 µL koncentrirane mravlje kiseline u ultra čistu vodu. Provjeren je pH koji mora biti oko 2,5 te je pohranjen u hladnjaku.

## Priprema otopine za pohranu

Otopina za pohranu priprema se otapanjem TRIS u ultra čistoj vodi, nakon čega se doda etanol tako da njegov ukupni maseni udio bude 20%. Vrijednost pH se prilagodi na 8,5 dodavanjem otopine HCl.

### 3.5. Postupak izolacije IgA iz plazme

Kako bi se mogla provesti deglikozilacija i analiza profila *N*-glikana plazmatskog IgA, potrebno je prvo izolirati IgA od ostalih plazmatskih proteina. U te svrhe korišten je CaptureSelect™ IgA afinitetni matriks (*ThermoFisher*). Matriks je oblikovan u kuglice koje na sebe specifično i selektivno vežu IgA te omogućavaju njegovu izolaciju od ostalih proteina plazme. CaptureSelect™ kuglice nanose se na Orochem filter ploču. Prije nanošenja pripremljenih uzoraka na afinitetni matriks, potrebno ga je pripremiti ispiranjem nizom otopina prema uputama proizvođača. Matriks se redom ispiru ultra čistom vodom, 0,1 M mravljom kiselinom, 10x PBS puferom i 1x PBS puferom te se između svakog ispiranja tekućina isušuje uz pomoć vakuumske pumpe (*Pall Corporation*). Nakon pripreme matriksa, Orochem ploča stavi se na pločicu za sakupljanje od 1 mL (*Waters*) te se na njega se nanosi 40 µL pripremljenih uzoraka, standarda i slijepe probe. Uzorci se inkubiraju s matriksom 10 minuta uz neprekidno treskanje na tresilici (*IKA - Schüttler MTS 4*) te se ostatak plazme povuče vakuuskom pumpom u pločicu za sakupljanje. Postupak se ponovi još dva puta za što učinkovitije vezanje IgA na afinitetni matriks. Nespecifična vezanja sastojaka plazme na afinitetni matriks se uklanjaju višestrukim ispiranjem kuglica pomoću 1x PBS otopine. Nakon što je vezani IgA pročišćen ispiranjima, isti se za daljnju analizu treba skinuti s matriksa. To se izvodi ispiranjem s 0,1 M mravljom kiselinom, koja se u pločici za sakupljanje neutralizira s prethodno dodanim 1,0 M amonijevim bikarbonatom. Nakon toga, uzorci se suše do liofilizata za daljnju obradu (*SpeedVac, Thermo Fisher*). Matriks se nakon korištenja mora regenerirati ispiranjem redom s 0,1 M mravljom kiselinom, 10xPBS puferom, 1xPBS puferom i puferom za pohranu. Pločica s matriksom potopi se u pufer za pohranu te se može koristiti ponovno.

### 3.6. Postupak deglikozilacije *N*-glikana IgA

Izolirani IgA se nakon toga deglikoziliraju, odnosno s njega se mogu enzimski skinuti *N*-glikani koji će se poslije analizirati. U liofilizirani uzorak doda se 1,33% SDS, otopina se inkubira 10 minuta na 65 °C, ohladi se i centrifugira (*Centifuge 5804 Eppendorf*). U ohlađeni uzorak doda se 4% IgePal te se otopina inkubira 15 minuta na tresilici. IgePal je deterdžent koji čuva enzim PNGazu od snažnog denaturirajućeg djelovanja SDS-a. Tim postupkom omogućena je denaturacija IgA. Deglikozilacija provodi se enzimskom otopinom koja sadrži 5x PBS i enzim PNGazu. Otopina se doda denaturiranom IgA te se sve zajedno inkubira 18 sati na 37 °C.

### 3.7. Postupak obilježavanja *N*-glikana IgA

Nakon deglikozilacije, glikani se moraju obilježiti kako bi se mogli detektirati na fluorescencijskom kromatografskom detektoru. Obilježavanje glikana obavlja se pomoću otopine za obilježavanje koja sadrži octenu kiselinu otopljenu u dimetilsulfoksidu, prokainamid i pikolinboran u odgovarajućim omjerima. Navedena otopina doda se svakom uzorku te se sve zajedno inkubira 10 minuta na tresilici, a zatim 2 sata na 65 °C. Nakon 2 sata, uzorci se izvade i ohlade.

### 3.8. Postupak pročišćavanja *N*-glikana IgA

Nakon obilježavanja uzoraka, oni se moraju pročititi od svih zaostalih nečistoća u postupku obilježavanja. Pročišćavanje se radi na GHP filter pločicama (*Pall*) koje se prije korištenja moraju isprati redom 70%-nom otopinom etanola, ultra čistom vodom i 96%-nim acetonitrilom (ACN). Uzorci se zatim nanese na GHP pločicu uz 100%-ni ACN, inkubiraju se 2 minute te se tekućina povuče vakuumskom pumpom. Vezani glikani na GHP pločici isperu se četiri puta s 96%-nim ACN. U GHP pločicu se ponovno ispipetira 96%-ni ACN te se ona centrifugira 5 minuta na 1000 rpm. GHP pločica stavi se na PCR pločicu (*FrameStar*), u nju se ispipetira ultra čista voda te se sve zajedno inkubira 15 minuta na tresilici. Zatim se centrifugira 5 minuta na 1000 rpm. Postupak s ultra čistom vodom se ponovi još jednom. Nakon toga se uzorci hermetički zatvore i pohrane u hladnjaku.

### 3.9. HILIC-UPLC analiza N-glikana IgA

Pročišćeni i obilježeni uzorci analizirani su tekućinskom kromatografijom ultra-visoke učinkovitosti koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC) na *Waters Acquity* UPLC instrumentu (*Waters, Milford, MA, USA*). Uvjeti razdvajanja glikana navedeni su u Tablici 1. Pri početnim uvjetima protoka otapalo A činio je 28% mobilne faze, dok je otapalo B činilo 72%. Protok se kroz 23 minute dizao tako da otapalo A u konačnici čini 41%, a otapalo B 59%. Instrument se sastoji od četiri dijela - pumpe koja propušta mobilnu fazu, kolone, automatskog injektora za uzorak i fluorescentnog detektora. Podešavanje uvjeta regulira se pomoću Empower programa (*Waters*), iz kojeg se dobivaju rezultati analiza. Rezultati obrađuju u istom programu, pri čemu se ručno integriraju površine ispod kromatografa, nakon čega slijedi statistička obrada podataka u Excelu (verzija 1808, *Microsoft Office*) i programu R (verzija 3.3.3, <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.3.3/>).

Tablica 1. *Optimizirani uvjeti za razdvajanje N-glikana s IgA*

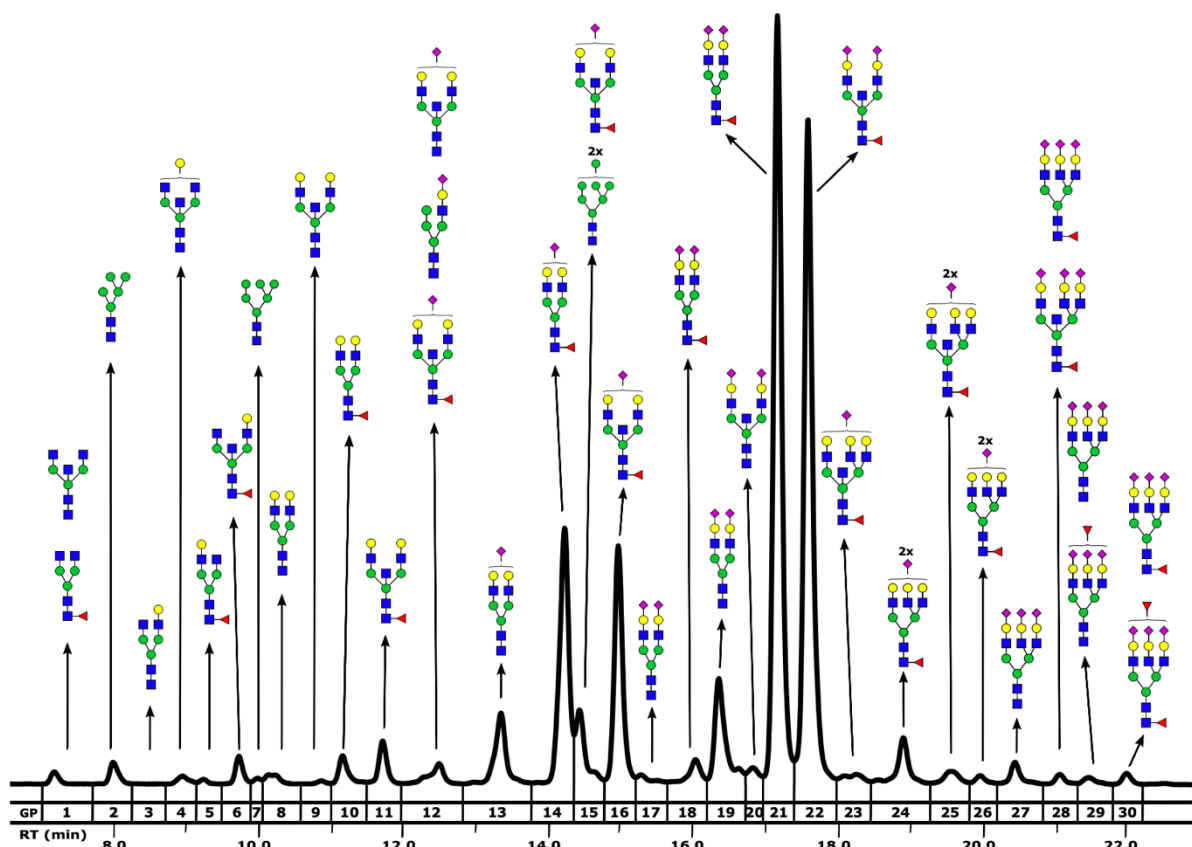
PARAMETAR	OPIS
Kolona	ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide Column 150 mm
Veličina čestica kolone	1,7 µm (veličina pora - 130Å)
Otopina A	0,1 M amonijev formijat (pH 4,4)
Otopina B	Acetonitril
Brzina protoka	0,561 mL/min
Temperatura kolone	60 °C
Temperatura uzoraka	10 °C
Valna duljina ekscitacije	310 nm
Valna duljina detekcije	370 nm

## **4. REZULTATI**



#### 4.1. Kromatogramski profil N-glikana IgA

Analizom glikana HILIC-UPLC metodom određuje se retencijsko vrijeme svih glikanskih struktura prisutnih u uzorcima, što se grafički prikazuje na kromatogramu. Glikanske strukture koje imaju manji broj šećernih podjedinica (manje negativnog naboja) hidrofobnije su i zbog toga će ranije izaći iz hidrofilne kolone. Glikanske strukture koje imaju veći broj podjedinica, odnosno one koje su polarnije i s više naboja, dulje će se zadržavati na stacionarnoj fazi kolone koja je hidrofilna i polarna. Na Slici 2. prikazan je kromatogram N-glikanskog profila IgA dobiven HILIC-UPLC analizom. Kromatogram sadrži 30 glikanskih pikova (GP), pri čemu svaki sadrži jednu ili više glikanskih struktura. Površina ispod svakog GP-a predstavlja relativnu koncentraciju glikana iz dane skupine u ukupnom sadržaju glikana IgA.



Slika 2. Reprezentativni kromatogram N-glikana s IgA. Na x-osi navedena su retencijska vremena određenih glikanskih struktura, a na y-osi intenzitet pikova. Prikazane su glavne glikanske strukture koje odgovaraju pojedinom piku. Plavi kvadrat odgovara N-acetilglukozaminu, zeleni krug manozu, žuti krug galaktozi, crveni trokut fukozi, a ljubičasti romb N-acetilneuraminskoj kiselinu.

#### 4.2. Usporedba zastupljenosti površine ispod glikanskih pikova *N*-glikana IgA

Analizirano je ukupno 172 uzorka, pri čemu je u statističkoj obradi izbačeno 4 uzorka kako bi broj oboljelih od T1DM i zdravih bio podjednak. U statističku analizu u konačnici ušlo je 84 uzorka za svaku skupinu od čega polovicu čine osobe muškog spola, a drugu polovicu osobe ženskog spola. Rezultati analize 168 uzoraka prema pojedinim glikanskim skupinama i prema dijagnozi T1DM vidljivi su u tablici 3.

Tablica 2. *N*-glikom IgA

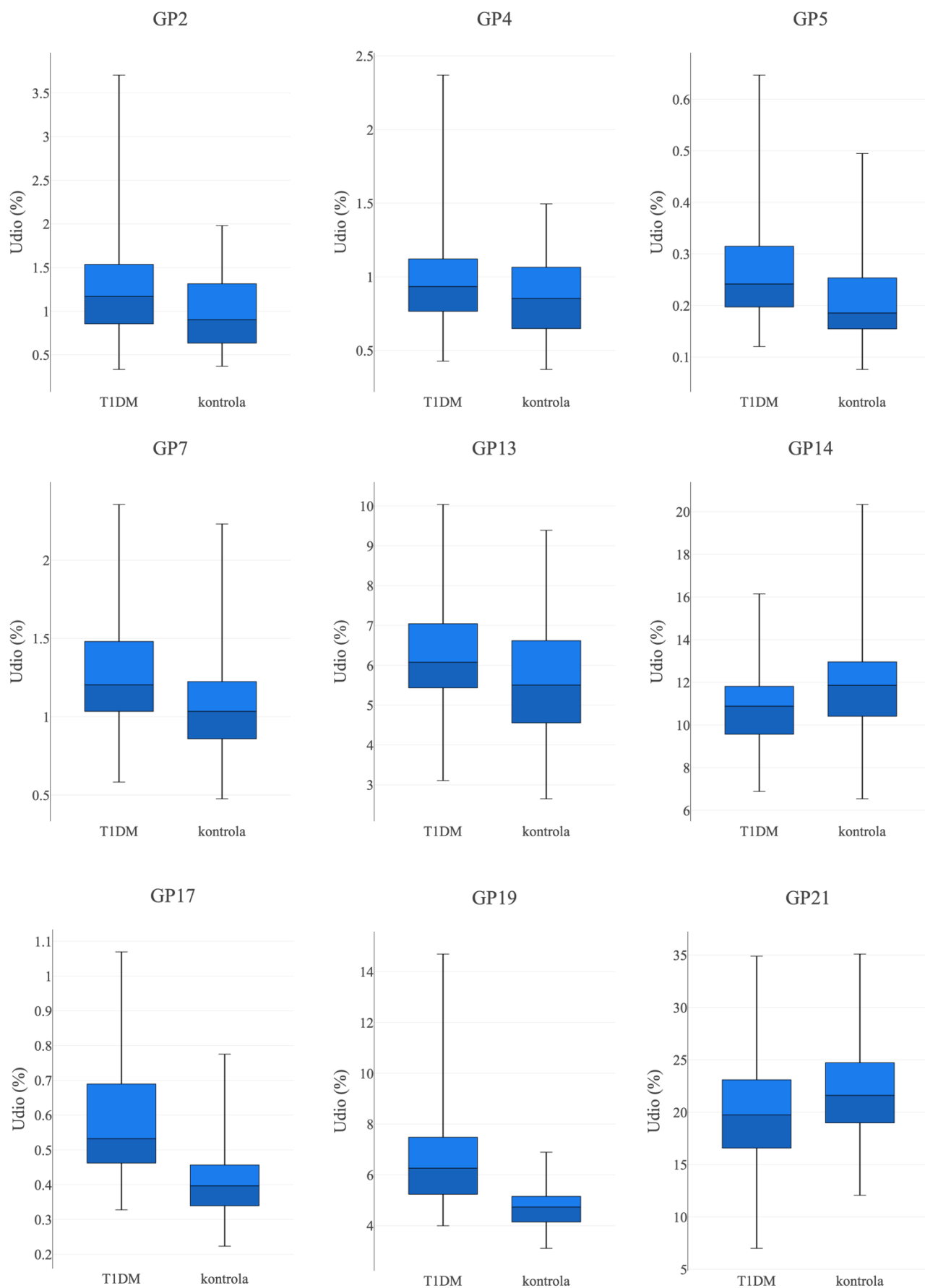
GLIKANSKI PIK	GLIKANSKA STRUKTURA	OPIS
GP1	A2B;	biantenarni s račvajućim GlcNAc;
	FA2	sržna fukoza, biantenarni
GP2	M5	oligomanozni
GP3	A2G1	monogalaktozilirani, biantenarni
GP4	A2BG1;	monogalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc;
	FA2G1;	sržna fukoza i monogalaktozilirani, biantenarni;
	M5A1	hibridni
GP5	FA2G1	sržna fukoza i monogalaktozilirani, biantenarni
GP6	FA2BG1	sržna fukoza i monogalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc
GP7	M6	oligomanozni
GP8	A2G2;	digalaktozilirani, biantenarni;
	A1G1S1	monogalaktozilirani i monosijaliniziranimonoantennary;
GP9	A2BG2	digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc
GP10	FA2G2;	sržna fukoza, digalaktozilirani, biantenarni;
	FA1G1S1;	sržna fukoza, monogalaktozilirani i monosijalinizirani monoantennarni;
	M6A1;	hibridni;
	A2G1S1	monogalaktozilirani i monosijalinizirani biantenarni
GP11	FA2BG2	sržna fukoza, digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc
GP12	A2BG1S1;	monogalaktozilirani i monosijalinizirani biantenarni s račvajućim GlcNAc;
	M4A1G1S1;	hibridni, monogalaktozilirani i monosijalinizirani;
	FA2BG1S1	sržna fukoza, monogalaktozilirani, monosijalinizirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc
GP13	A2G2S1	digalaktozilirani i monosijalinizirani, biantenarni
GP14	FA2G2S1	sržna fukoza, digalaktozilirani i monosijalinizirani, biantenarni
GP15	FA2BG2S1;	sržna fukoza, digalaktozilirani i monosijalinizirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc;
	M8	oligomanozni
GP16	FA2BG2S1	sržna fukoza, digalaktozilirani i monosijalinizirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc
GP17	A2G2S2	digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni

<b>GP18</b>	FA2G2S2;	sržna fukoza, digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni;
	M9	oligomanozni
<b>GP19</b>	A2G2S2	digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni
<b>GP20</b>	A2BG2S2	digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni s račvajućim GlcNAc
<b>GP21</b>	FA2G2S2	sržna fukoza, digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni
<b>GP22</b>	FA2BG2S2	sržna fukoza, digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni s račvajućim GlcNAc
<b>GP23</b>	FA3BG3S1	sržna fukoza, trigalaktozilirani i monosijalinizirani triantenarni s račvajućim GlcNAc
<b>GP24</b>	FA3G3S2	sržna fukoza, trigalaktozilirani i disijalinizirani triantenarni
<b>GP25</b>	FA3BG3S2	sržna fukoza, trigalaktozilirani i disijalinizirani triantenarni s račvajućim GlcNAc
<b>GP26</b>	FA3G3S2	sržna fukoza, trigalaktozilirani i disijalinizirani triantenarni
<b>GP27</b>	A3G3S3	trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni
<b>GP28</b>	FA3G3S3;	sržna fukoza, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni;
	FA3BG3S3	sržna fukoza, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni s račvajućim GlcNAc
<b>GP29</b>	A3G3S3;	trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni;
	A3F1G3S3	antenarna fukozilacija, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni;
<b>GP30</b>	FA3G3S3;	sržna fukoza, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni;
	FA3F1G3S3	sržna i antenarna fukozilacija, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni

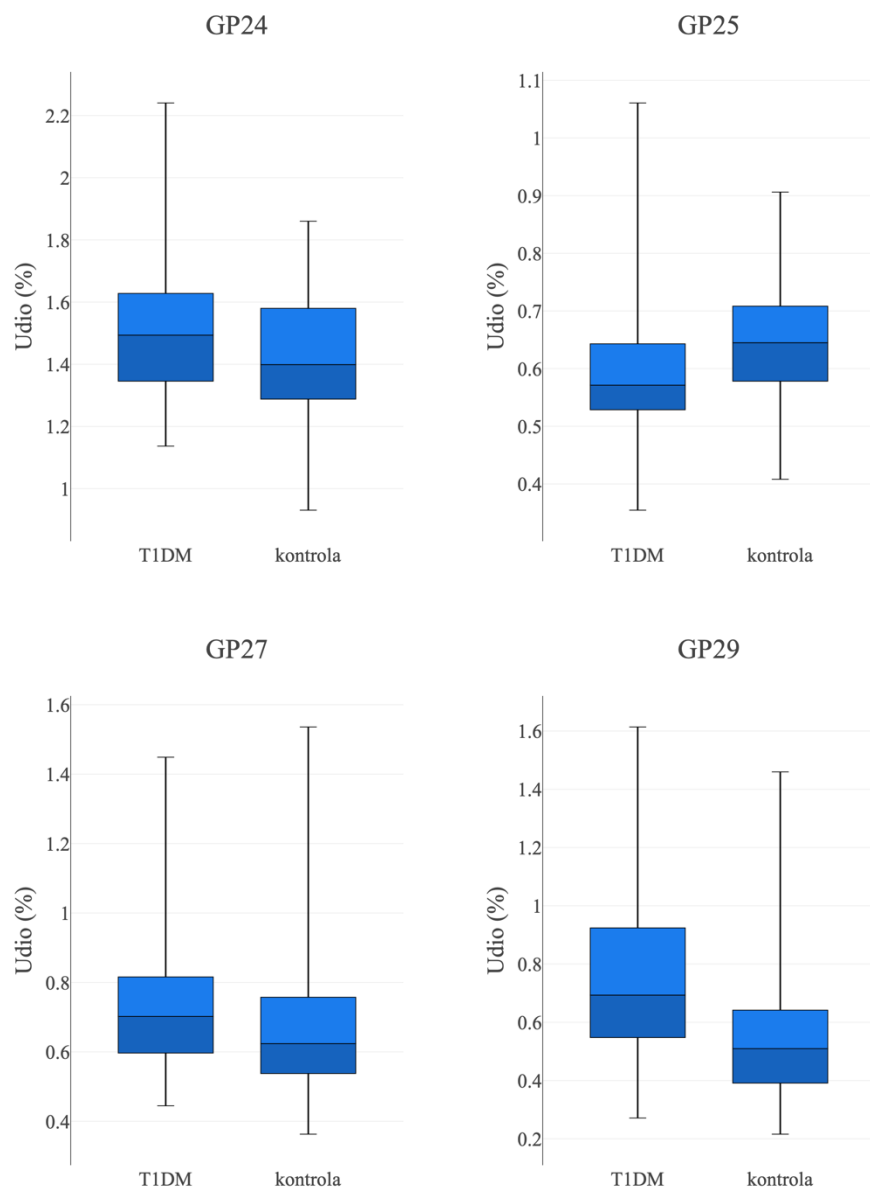
Za svaku glikansku skupinu neparametrijskim statističkim Mann-Whitney testom napravljena je usporedba kako bi se ustanovilo postoje li značajne razlike između oboljelih od T1DM i kontrola za tu glikansku skupinu. One skupine glikana u kojima je testom izračunata *p*-vrijednost bila manja od 0,05 smatraju se statistički značajno različitim između oboljelih od T1DM i kontrole. Prema podacima u tablici 2. i odabranoj razini značajnosti vidljivo je da je nakon korekcije za višestruko testiranje ustanovljena značajna razlika između oboljelih od T1DM i kontrole za glikanske skupine GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19, GP21, GP24, GP25, GP27 i GP29. Grafički prikaz uspoređivanih GP-ova koje se razlikuju vidljiv je na slici 3 i 4.

Tablica 3. Rezultati usporedbe pojedinih kromatografskih pikova, odnosno glikanskih struktura, između populacije oboljelih od T1DM i odgovarajućih kontrola.

GP	MEDIJAN (MINIMUM-MAKSIMUM) %		P-VRIJEDNOST	KORIGIRANA P-VRIJEDNOST
	T1DM	ZDRAVI		
GP1	1,017 (0,381-3,314)	0,930 (0,329-3,020)	0,0877	0,1504
GP2	1,169 (0,332-3,704)	0,901 (0,369-1,980)	0,0000	<b><u>0,0002</u></b>
GP3	0,065 (0,028-0,341)	0,060 (0,023-0,314)	0,2157	0,3193
GP4	0,934 (0,428-2,369)	0,854 (0,371-1,495)	0,0079	<b><u>0,0169</u></b>
GP5	0,242 (0,120-0,647)	0,185 (0,076-0,495)	0,0001	<b><u>0,0004</u></b>
GP6	1,013 (0,548-3,135)	1,067 (0,539-1,957)	0,7373	0,7657
GP7	1,204 (0,583-2,355)	1,034 (0,476-2,231)	0,0001	<b><u>0,0004</u></b>
GP8	0,302 (0,110-0,931)	0,296 (0,067-0,714)	0,6860	0,7657
GP9	1,221 (0,757-2,491)	1,150 (0,791-2,274)	0,3303	0,4299
GP10	0,275 (0,048-2,287)	0,278 (0,079-0,676)	0,7283	0,7657
GP11	1,907 (0,037-4,370)	2,098 (0,592-5,359)	0,5332	0,6546
GP12	1,690 (0,010-5,110)	1,572 (0,473-2,842)	0,1666	0,2647
GP13	6,075 (3,105-10,037)	5,504 (2,647-9,389)	0,0019	<b><u>0,0050</u></b>
GP14	10,883 (6,883-16,148)	11,863 (6,537-20,342)	0,0002	<b><u>0,0007</u></b>
GP15	3,021 (1,804-5,355)	3,003 (2,007-4,991)	0,7219	0,7657
GP16	9,200 (6,231-13,749)	9,613 (5,814-13,697)	0,7941	0,7941
GP17	0,532 (0,328-1,069)	0,396 (0,223-0,775)	0,0000	<b><u>0,0000</u></b>
GP18	1,041 (0,751-1,684)	1,023 (0,577-1,710)	0,0350	0,0681
GP19	6,262 (3,995-14,696)	4,731 (3,103-6,890)	0,0000	<b><u>0,0000</u></b>
GP20	0,596 (0,352-0,972)	0,583 (0,356-1,555)	0,6614	0,7657
GP21	19,744 (7,001-34,895)	21,611 (12,065-35,099)	0,0005	<b><u>0,0015</u></b>
GP22	22,855 (14,086-32,189)	24,066 (16,826-34,296)	0,2444	0,3385
GP23	0,632 (0,295-0,942)	0,578 (0,366-1,169)	0,7327	0,7657
GP24	1,494 (1,137-2,240)	1,399 (0,931-1,860)	0,0202	<b><u>0,0412</u></b>
GP25	0,571 (0,355-1,061)	0,645 (0,408-0,906)	0,0017	<b><u>0,0048</u></b>
GP26	0,321 (0,184-0,527)	0,332 (0,185-0,539)	0,2093	0,3193
GP27	0,702 (0,445-1,449)	0,624 (0,363-1,536)	0,0042	<b><u>0,0095</u></b>
GP28	0,388 (0,203-0,709)	0,404 (0,244-0,576)	0,1383	0,2282
GP29	0,693 (0,271-1,614)	0,510 (0,216-1,460)	0,0000	<b><u>0,0000</u></b>
GP30	0,603 (0,295-1,052)	0,559 (0,326-0,964)	0,7480	0,7657



Slika 3. Prikaz rezultata usporedbe glikanskih pikova GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19 i GP21 ispitanika s T1DM i kontrola



Slika 4. Prikaz rezultata usporedbe glikanskih pikova GP24, GP25, GP27 i GP29 ispitanika s T1DM i kontrola

### 4.3. Usporedba zastupljenosti deriviranih svojstava u glikanskom profilu IgA

Osim izravno izmjerenih glikana, izračunata je i veličina efekta povezanosti 12 deriviranih glikozilacijskih svojstava s pojavom T1DM na temelju grupiranja svih izravno izmjerenih *N*-glikana prema zajedničkim kompozicijskim svojstvima (npr. broj grananja, prisutnost sržne fukoze, oligomanozni glikani...). Ukupno je izdvojeno 12 deriviranih svojstava za IgA *N*-glikom. U glikane s niskim stupnjem grananja spadaju GP1, GP3-6 i GP8-22. U glikane s visokim stupnjem grananja spadaju GP23-30. U agalaktozilirane glikane spada struktura označena s GP1. U monogalaktozilirane glikane spadaju GP3-6 i GP12, dok u digalaktozilirane spadaju GP8-11 i GP13-22. U trigalaktozilirane glikane spadaju strukture GP23-30. U monosijalinizirane glikane spadaju GP12-16 i GP23, u disijalinizirane GP17-22 i GP24-26, a u trisijalinizirane GP27-30. U glikane s račvajućim *N*-acetilglukozaminom spadaju strukture GP1, 3, 6, 11, 12, 15, 16, 20, 22, 23 i 25. U glikane sa sržnom fukožilacijom spadaju GP5, 6, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 21-26, 28 i 30. U oligomanozne glikane spadaju strukture GP2 i GP7. Sve glikanske strukture prikazane su na Slici 2. te u Tablici 2. U Tablici 4. prikazan je izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma IgA.

*P*-vrijednosti za svako biološki značajno derivirano obilježje glikanskih struktura iznad je statistički značajne granice od  $p < 0,05$ , kako je vidljivo prikazanim rezultatima (Tablica 5). Iz navedene je tablice vidljivo da su statistički značajne skupine s visokim grananjem, trigalaktozilacijom, trisijalinizacijom i oligomanozilacijom. Grafički prikaz uspoređivanih deriviranih skupina koje se razlikuju vidljiv je na Slikama 5, 6 i 7.

Tablica 4. *Izračun deriviranih svojstava IgA N-glikoma*

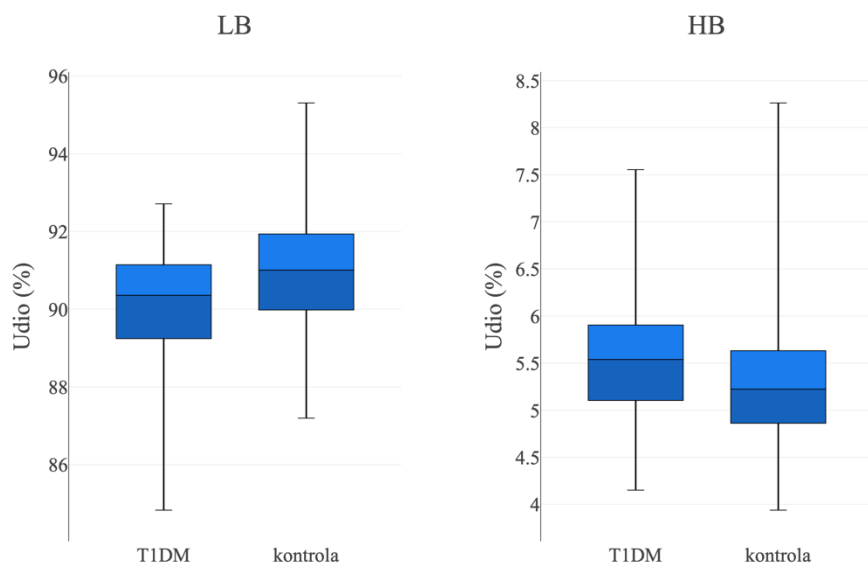
<b>GP</b>	<b>LB</b>	<b>HB</b>	<b>G0</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>B</b>	<b>CF</b>	<b>HM</b>
<b>GP1</b>	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
<b>GP2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
<b>GP3</b>	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
<b>GP4</b>	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>GP5</b>	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP6</b>	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00
<b>GP7</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
<b>GP8</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>GP9</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
<b>GP10</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP11</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00
<b>GP12</b>	1,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,67	0,33	0,00
<b>GP13</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>GP14</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP15</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00
<b>GP16</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00
<b>GP17</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>GP18</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP19</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>GP20</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00
<b>GP21</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP22</b>	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00
<b>GP23</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00
<b>GP24</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP25</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,50	1,00	0,00
<b>GP26</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP27</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
<b>GP28</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<b>GP29</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
<b>GP30</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00



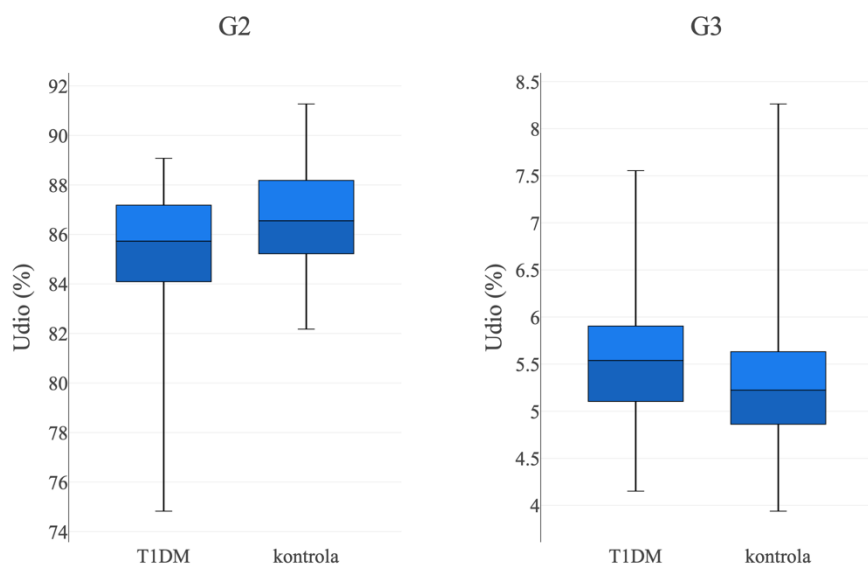
Tablica 5. Rezultati usporedbe pojedinih deriviranih svojstava između populacije oboljelih od T1DM i odgovarajućih kontrola

SKUPINA	MEDIJAN (MINIMUM-MAKSIMUM) %		P-VRIJEDNOST	KORIGIRANA P-VRIJEDNOST
	T1DM	ZDRAVI		
LB	90,358 (84,829-92,711)	91,005 (87,197-95,306)	0,0001	<b><u>0,0004</u></b>
HB	5,539 (4,151-7,554)	5,224 (3,938-8,262)	0,0022	<b><u>0,0052</u></b>
G0	1,017 (0,381-3,314)	0,930 (0,329-3,020)	0,0877	0,1504
G1	2,887 (1,372-6,945)	2,715 (1,600-4,383)	0,0733	0,1367
G2	85,731 (74,824-89,075)	86,554 (82,176-91,270)	0,0003	<b><u>0,0009</u></b>
G3	5,539 (4,151-7,554)	5,224 (3,938-8,262)	0,0022	<b><u>0,0052</u></b>
S1	32,096 (24,775-41,216)	32,617 (24,593-42,079)	0,2911	0,3907
S2	54,261 (39,611-65,097)	54,606 (43,294-63,768)	0,2420	0,3385
S3	2,403 (1,486-3,940)	2,163 (1,523-4,389)	0,0000	<b><u>0,0002</u></b>
B	44,042 (31,105-56,964)	44,455 (31,053-59,413)	0,4548	0,5747
CF	76,850 (61,963-83,302)	79,546 (71,508-87,987)	0,0000	<b><u>0,0000</u></b>
HM	2,434 (0,915-6,059)	1,933 (0,939-4,211)	0,0000	<b><u>0,0001</u></b>

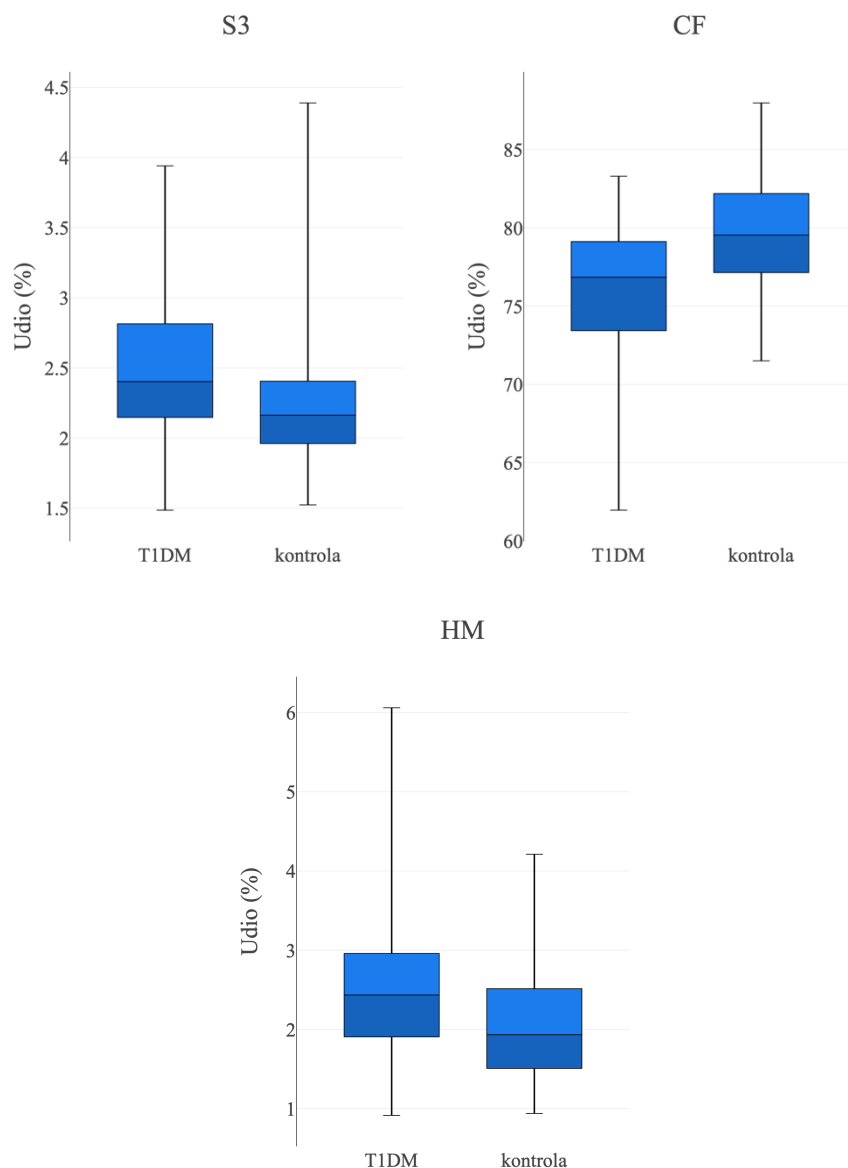
LB – nisko razgranati glikani, HB – visoko razgranati glikani, G0 – agalaktozilirani glikani, G1 – monogalaktozilirani glikani, G2 – digalaktozilirani glikani, G3 – trigalaktozilirani glikani, S1 – monosijalinizirani glikani, S2 – disijalinizirani glikani, S3 – trisijalinizirani glikani, B – glikani s računajućim N-acetilglukozaminom, CF – glikani sa sržnom fukozom, HM – oligomanozni glikani



Slika 5. Prikaz rezultata usporedbe nisko i visoko razgranatih glikanskih struktura u uzorcima ispitanika s T1DM i kontrola, koji se statistički značajno razlikuju



Slika 6. Prikaz rezultata digalaktosiliranih i trigalaktosiliranih glikanskih struktura u uzorcima ispitanika s T1DM i kontrola, koji se statistički značajno razlikuju



Slika 7. Prikaz rezultata usporedbe trisijaliniziranih glikanskih struktura, glikanskih struktura sa sržnom fukozom i oligomanozilirani glikanskih struktura u uzorcima ispitanika s T1DM i kontrola, koji se statistički značajno razlikuju

# **5. RASPRAVA**

U ovom diplomskom radu analizirani su *N*-glikani IgA kod 168 odraslih ispitanika HILIC-UPLC metodom. Od ukupnog broja ljudi uključenih u ovom istraživanju, 84 ispitanika su s dijagnozom T1DM. U kontrolnoj skupini su odabrani ispitanici koji imaju istu dob i isti spol kao u prethodnoj skupini, ali bez dijagnoze T1DM. Do sada u literaturi ne postoji analiza povezanosti promjena u *N*-glikomu IgA i T1DM kod odraslih ispitanika te je ovo prvo takvo istraživanje. Prethodna istraživanja promjena u *N*-glikozilaciji IgA provedena su na uzorcima djece i adolescenata kojima je T1DM tek dijagnosticirana. Za razliku od njihove zdrave braće i sestara, *N*-glikom oboljele djece sadržavao je više oligomanoznih glikana, a udio visoko razgranatih, trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih glikana je smanjen (Shkunnikova 2021).

Do sada su provedena slična istraživanja povezanosti T1DM s promjenama u *N*-glikomu. Proučavane su promjene *N*-glikoma ukupnih proteina plazme, te promjene glikozilacije IgG-a kao zlatnog standarda za proučavanje glikana. Zanimljivo je da su zaključci slični – opažen je pomak *N*-glikana s razgranatih, složenijih struktura prema jednostavnijima, manje razgranatim strukturama. Tako je povećan udio *N*-glikana s terminalnim GlcNAc i manoznim ostacima na IgG-u i plazmatskim proteinima, nekim biantenarnim *N*-glikanima ukupnih plazmatskih proteina i *N*-glikanima s računjućim GlcNAc. Osim toga, uočen je porast udjela disijaliniziranih struktura i pad udjela asijaliniziranih i monogalaktoziliranih struktura (Rudman *et al.* 2022). Opisane promjene specifične su za nastup T1DM i ukazuju na to da imaju ulogu u samoj patogenezi bolesti.

S druge strane, kod bolesnika koji već dulje vrijeme boluju od T1DM, pronađene su druge vrste promjena na ukupnim plazmatskim proteinima i IgG-u. Kod takvih bolesnika pronađen je pomak prema kompleksnijim triantenarnim i tetraantenarnim *N*-glikanima na plazmatskim proteinima (Colombo *et al.* 2021).

U ovom diplomskom radu otkriveno je da kod odraslih ispitanika s dijagnozom T1DM dolazi do statistički značajne promjene u udjelu glikanskih struktura GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19, GP21, GP24, GP25, GP27 i GP29 u usporedbi s kontrolom. Ako te promjene promatramo kroz derivirana svojstva, vidljivo je da je kod odraslih ispitanika oboljelih od T1DM došlo do smanjenja udjela nisko razgranatih glikana, a do povećanja visoko razgranatih glikana. Nadalje, vidljivo je smanjenje udjela digalaktoziliranih glikana i porasta udjela trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih glikana kod oboljelih od T1DM. Udio glikana sa sržnom fukozom znatno je smanjen kod bolesnika od T1DM u usporedbi s kontrolama, dok je udio oligomanoznih glikana znatno porastao.

Važno je naglasiti da kod djece i adolescenata je statistički značajno promijenjen samo udio GP2. Za usporedbu deriviranih svojstava, kod djece i adolescenata s T1DM pronađeno je

smanjenje udjela visoko razgranatih, trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih glikana, a povećanje udjela oligomanoznih glikana u usporedbi s njihovim zdravim braćom i sestrama (Shkunnikova 2021). Razlika u promjenama u glikozilaciji uzrokovanom T1DM između populacije djece i adolescenata kojima je tek otkrivena bolest i odraslih koji već dugo žive uz bolest može ukazivati da različiti profili *N*-glikoma ukazuju na sam početak bolesti, a potpuno drugačiji kao posljedica oštećenja tkiva uslijed trajnije hiperglikemije. Time se potencijalno dodatno otvara dijagnostički potencijal *N*-glikoma IgA, koji bi se mogao koristiti za rani probir bolesnika na T1DM, kao i za praćenje bolesti. Karakteristična protutijela na T1DM su prisutna u krvi i prije pojave prvih simptoma T1DM, te ovaj pristup ima veliki preventivni potencijal kako za rano otkrivanje povećanog rizika od nastanka T1DM, tako i prognostički potencijal za identifikaciju pacijenata s lošom glikemijskom kontrolom.

Pokazano je da heksozamin-biosintetski put ima veliku ulogu u promjeni glikanskog profila kod osoba oboljelih od šećerne bolesti (Marshall *et al.* 1991). Naime, u fiziološkim uvjetima u tom putu se iskorištava oko 3% od ukupne glukoze. Međutim, u uvjetima hiperglikemije dolazi do povećanog ulaska glukoze u taj metabolički put čiji je produkt UDP-GlcNAc, prekursor za sintezu visoko razgranatih glikana (McClain 2002). Porast koncentracije UDP-GlcNAc dovodi do porasta udjela visoko razgranatih glikana, te se smatra se da je to jedan od mehanizama porasta visoko razgranatih glikana u T1DM, što je opaženo i u ovom radu.

Razina sijaliniziranih *N*-glikana proteina plazme povećana je u različitim upalnim bolestima (Keser *et al.* 2017). Primjerice, sijalinizacija Fc fragmenta IgG smanjuje afinitet vezanja protutijela na FcγRIIIa receptore na NK stanicama, što se povezuje se sa smanjenom citotoksičnošću ovisnom o protutijelima. Taj je proces važan tijekom eliminacije patogena. Pretpostavlja se da je jedan od okidača nastanka T1DM upravo imunosna reakcija na neki patogen (Scallon *et al.* 2007). Osim toga, uočena je korelacija promjene *N*-glikanskog profila plazmatskih proteina i IgG u korist porasta udjela trisijaliniziranih i trigalaktoziliranih glikanskih struktura s komplikacijama T1DM koje uključuju veće vrijednosti glikiranog Hb1Ac, koji odražava kontrolu glikemije i narušavanje bubrežne funkcije (Bermingham *et al.* 2018, Colombo *et al.* 2021). Konačno, visoke razine sijalinske kiseline povezane su oštećenjima mikrovaskulature kod odraslih ispitanika sa T1DM (Crook *et al.* 2001). Dobiveni rezultati istraživanja ovog diplomskog rada u skladu su s ovim spoznajama.

Povećanje udjela oligomanoznih *N*-glikana na IgA pokazano je već na uzorcima djece i adolescenata oboljelih od T1DM (Shkunnikova 2021). Osim toga, ta spoznaja slaže se i s prethodnim studijama o promjeni glikozilacija u T1DM na proteinima plazme i IgG. Naime u reumatoidnom artritisu, bolesti autoimune etiologije, uočeno je da *N*-glikani na IgG koji

završavaju s GlcNAc aktiviraju sustav komplementa vezanjem MBL (Malhotra *et al.* 1995). Postoje i studije koje govore o povećanju koncentracije MBL i njegovih pridruženih serinskih proteaza kod oboljelih od T1DM (Hansen *et al.* 2003, Jenny *et al.* 2015). MBL dijeli isti afinitet vezanja za strukturu manoze, glukoze, GlcNAc i L-fukoze na terminalnim položajima glikana (Lee *et al.* 1991). Osim toga, gen koji kodira glavni protein na putu aktivacije komplementa, protein komplementa C3, povezuje se s povećanim rizikom od razvoja T1DM među nositeljima HLA-DR4/478, jednim od genotipova s najvećim rizikom povezanim s ovom bolešću (Janssen *et al.* 2005, The TEDDY Study Group *et al.* 2016). Slijedom navedenog, može se pretpostaviti da povećani udio oligomanoznih glikana na IgA povećava mogućnost aktivacije komplementa i da do ove promjene dolazi već u početku patogeneze T1DM. Slično se zapazilo i pri istraživanju reumatoidnog artritisa, gdje je višestruka prezentacija oligomanoznih glikana dovela do aktivacije MBL-ovisnog puta aktivacije sustava komplementa u zahvaćenim zglobovima te da se promjene u *N*-glikozilaciji mogu primijetiti i prije nastupa same bolesti (Dzidic *et al.* 2017).

Zaključno, ovo istraživanje nastavak je rada kojeg sam predala na natječaj za Rektorovu nagradu u ak. god. 2020./21. u kojem su bile identificirane promjene *N*-glikozilacije IgA koje se pojavljuju u početku bolesti. U ovom diplomskom radu identificirane su nove, dodatne promjene u *N*-glikozilaciji koje se pojavljuju kod odraslih ispitanika u T1DM. Evidentno je da je *N*-glikozilacija IgA, kao i drugih plazmatskih proteina, povezana ne samo s nastankom, već i s razvojem i progresijom T1DM.

## **6. ZAKLJUČCI**



Analiza *N*-glikanskog profila imunoglobulina A (IgA) izoliranog iz plazme odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (T1DM) pokazala je statistički značajnu razliku u glikanskim pikovima GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19, GP21, GP24, GP25, GP27 i GP29 u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Strukturne značajke promijenjene u glikanima pacijenata s T1DM očituju se u promjeni udjela nisko- i visoko-razgranatih glikana u korist visoko-razgranatih, povećanju udjela trigalaktoziliranih, trisijaliniziranih i oligomanoznih glikana i smanjenju udjela digalaktoziliranih glikana i glikana sa sržnom fukozom.

Udio oligomanoznih glikana promijenjen je i kod djece i adolescenata s T1DM i kod odraslih s uznapređovalom bolešću, što ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u patogenezi same bolesti.

Činjenica da ostale promjene u profilu *N*-glikana koje su identificirane u ovom diplomskom radu nisu pronađene i kod djece, sugerira da do tih promjena dolazi prilikom progresije bolesti, kao posljedica promjena regulacije mehanizama glikozilacije uslijed neadekvatne glikemijske kontrole.

# **7. POPIS KRATICA**

ACN	acetonitril
B	glikani s račvujućim <i>N</i> -acetilglukozaminom
CF	glikani sa sržnom fukozom
Dol	dolikal
Dol-P	dolikal fosfat
ER	endoplazmatski retikulum
G0	agalaktozilirani glikani
G1	monogalaktozilirani glikani
G2	digalaktozilirani glikani
G3	trigalaktozilirani glikani
GA	Golgijev aparat
GADA	autoprotutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. <i>glutamic acid decarboxylase autoantibody</i> )
Gal	galaktoza
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalaktozamin
GDP	gvanozin difosfat
Glc	glukoza
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GP	glikanski pik
HB	visoko razgranati glikani (engl. <i>high branching</i> )
HbA1c	glikirani hemoglobin
HILIC-UPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofobnim interakcijama (engl. <i>Hydrophilic Interaction Liquid Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
HM	oligomanozni glikani
IA-2	autoprotutijela na antigene na površine $\beta$ -stanica gušterače (engl. <i>islet-cell autoantibody</i> )
IAA	autoprotutijela na inzulin (engl. <i>insulin autoantibody</i> )
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IL-10	interleukin 10
LB	nisko razgranati glikani (engl. <i>low branching</i> )

Man	manoza
MBL	lektin koji veže manozu (engl. <i>manose binding lectin</i> )
MODY	engl. <i>maturity onset diabetes of the young</i>
OGTT	oralni test tolerancije na glukozu (engl. <i>oral glucose tolerance test</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
RCF	relativna centrifugalna sila (engl. <i>Relative Centrifugal Force</i> )
S1	monosijalinizirani glikani
S2	disijalinizirani glikani
S3	trisijalinizirani glikani
Sia	sijalinska kiselina
sIgA	sekretorni IgA
T1DM	šećerna bolest tipa 1 (engl. <i>type 1 diabetes mellitus</i> )
UDP-GlcNAc	uridin difosfat <i>N</i> -acetilglukozamin

# **8. POPIS LITERATURE**

Ali B A-M, Sayed M A, Moness H M, i Mohammed M. Assessment of serum levels of immunoglobulin A and immunoglobulin G in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus (T1D). *Diabetes mellitus*, 2017, 21 (4), 5.

Alshiekh S, Larsson H E, Ivarsson S-A, i Lernmark Å. Autoimmune Type 1 Diabetes. *In: R.I.G. Holt, C.S. Cockram, A. Flyvbjerg, i B.J. Goldstein, eds. Textbook of Diabetes*, 2016. Chichester, UK: John Wiley i Sons, Ltd, 143–153.

Bermingham M L, Colombo M, McGurnaghan S J, Blackbourn L A K, Vučković F, Pučić Baković M, Trbojević-Akmačić I, Lauc G, Agakov F, Agakova A S, Hayward C, Klarić L, Palmer C N A, Petrie J R, Chalmers J, Collier A, Green F, Lindsay R S, Macrury S, McKnight J A, Patrick A W, Thekkepat S, Gornik O, McKeigue P M, i Colhoun H M. *N*-Glycan Profile and Kidney Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 2018, 41 (1), 79–87.

Colombo M, Asadi Shehni A, Thoma I, McGurnaghan S J, Blackbourn L A K, Wilkinson H, Collier A, Patrick A W, Petrie J R, McKeigue P M, Saldova R, Colhoun H M, i the Scottish Diabetes Research Network (SDRN) Type 1 Bioresource Investigators. Quantitative levels of serum *N*-glycans in type 1 diabetes and their association with kidney disease. *Glycobiology*, 2021, 31 (5), 613–623.

Crook M A, Pickup J C, Lumb P J, Georgino F, Webb D J, Fuller J H, i The EURODIAB IDDM Complications Study Group. Relationship Between Plasma Sialic Acid Concentration and Microvascular and Macrovascular Complications in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 2001, 24 (2), 316–322.

Dahlquist G G, Pundziūtė-Lyckå A, Nyström L, i Swedish Childhood Diabetes Study and the Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS) Groups. Birthweight and risk of type 1 diabetes in children and young adults: a population-based register study. *Diabetologia*, 2005, 48 (6), 1114–1117.

Dotta F i Sebastiani G. Enteroviral Infections and Development of Type 1 Diabetes: The Brothers Karamazov Within the CVBs. *Diabetes*, 2014, 63 (2), 384–386.

Dzidic M, Abrahamsson T R, Artacho A, Björkstén B, Collado M C, Mira A, i Jenmalm M C. Aberrant IgA responses to the gut microbiota during infancy precede asthma and allergy development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 139 (3), 1017-1025.e14.

Field M C, Dwek R A, Edge C J, i Rademacher T W. O-Linked oligosaccharides from human serum immunoglobulin A1. *Biochemical Society Transactions*, 1989, 17 (6), 1034–1035.

Gornik O i Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Disease Markers*, 2008, 25 (4–5), 267–278.

de Haan N, Boeddha N P, Ekinci E, Reiding K R, Emonts M, Hazelzet J A, Wuhrer M, i Driessen G J. Differences in IgG Fc Glycosylation Are Associated with Outcome of Pediatric Meningococcal Sepsis. *mBio*, 2018, 9 (3), e00546-18.

Hansen I S, Baeten D L P, i den Dunnen J. The inflammatory function of human IgA. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76 (6), 1041–1055.

Hansen T K, Thiel S, Knudsen S T, Gravholt C H, Christiansen J S, Mogensen C E, i Poulsen P L. Elevated Levels of Mannan-Binding Lectin in Patients with Type 1 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology i Metabolism*, 2003, 88 (10), 4857–4861.

Hartman I. Insulin Analogs: Impact on Treatment Success, Satisfaction, Quality of Life, and Adherence. *Clinical Medicine i Research*, 2008, 6 (2), 54–67.

Hennet T i Cabalzar J. Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycolyx dysfunction. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40 (7), 377–384.

Huls G, Heijnen I A, Cuomo E, van der Linden J, Boel E, van de Winkel J G, i Logtenberg T. Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 1999, 59 (22), 5778–5784.

Hülsmeier A J, Paesold-Burda P, i Hennet T. N-Glycosylation Site Occupancy in Serum Glycoproteins Using Multiple Reaction Monitoring Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecular i Cellular Proteomics*, 2007, 6 (12), 2132–2138.

Ilonen J, Lempainen J, i Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, 15 (11), 635–650.

Jaeken J. Glycosylation and its Disorders: General Overview. *In: Reference Module in Biomedical Sciences*, 2016. Elsevier, B9780128012383046000.

Janssen B J C, Huizinga E G, Raaijmakers H C A, Roos A, Daha M R, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, i Gros P. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*, 2005, 437 (7058), 505–511.

Jenny L, Ajjan R, King R, Thiel S, i 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: MASPs in diabetes. *Clinical i Experimental Immunology*, 2015, 180 (2), 227–232.

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 F, Charutvedi N, Perola M, Campbell H, Lauc G, i Gornik O. Increased plasma *N*-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2017, 60 (12), 2352–2360.

Knip M, Åkerblom H K, Becker D, Dosch H-M, Dupre J, Fraser W, Howard N, Ilonen J, Krischer J P, Kordonouri O, Lawson M L, Palmer J P, Savilahti E, Vaarala O, i Virtanen S M. Hydrolyzed Infant Formula and Early  $\beta$ -Cell Autoimmunity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 2014, 311 (22), 2279.

Lecocq M, Detry B, Guisset A, i Pilette C. Fc $\alpha$ RI-Mediated Inhibition of IL-12 Production and Priming by IFN- $\gamma$  of Human Monocytes and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 2013, 190 (5), 2362–2371.

Lee R T, Ichikawa Y, Fay M, Drickamer K, Shao M C, i Lee Y C. Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (8), 4810–4815.



Malhotra R, Wormald M R, Rudd P M, Fischer P B, Dwek R A, i Sim R B. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*, 1995, 1 (3), 237–243.

Marshall S, Bacote V, i Traxinger R R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (8), 4706–4712.

Mathis D, Vence L, i Benoist C.  $\beta$ -Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 2001, 414 (6865), 792–798.

Mattu T S, Pleass R J, Willis A C, Kilian M, Wormald M R, Lellouch A C, Rudd P M, Woof J M, i Dwek R A. The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of *N*-Glycosylation on Fc $\alpha$  Receptor Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (4), 2260–2272.

McClain D A. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2002, 16 (1), 72–80.

Moremen K W, Tiemeyer M, i Nairn A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13 (7), 448–462.  
Nerup J, Platz P, Andersen O O, Christy M, Lyngsøe J, Poulsen J E, Ryder L P, Thomsen M, Nielsen L S, i Svejgaard A. HL-A ANTIGENS AND DIABETES MELLITUS. *The Lancet*, 1974, 304 (7885), 864–866.

Novak J, Tomana M, Kilian M, Coward L, Kulhavy R, Barnes S, i Mestecky J. Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1. *Molecular Immunology*, 2000, 37 (17), 1047–1056.

Papatheodorou K, Banach M, Edmonds M, Papanas N, i Papazoglou D. Complications of Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 2015, 1–5.

Pinkse G G M, Tysma O H M, Bergen C A M, Kester M G D, Ossendorp F, van Veelen P A, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout J W, i Roep B O. Autoreactive CD8 T cells associated with cell destruction in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (51), 18425–18430.

Plomp R, de Haan N, Bondt A, Murli J, Dotz V, i Wuhrer M. Comparative Glycomics of Immunoglobulin A and G From Saliva and Plasma Reveals Biomarker Potential. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9, 2436.

Rahbar S. The Discovery of Glycated Hemoglobin: A Major Event in the Study of Nonenzymatic Chemistry in Biological Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1043 (1), 9–19.

Redondo M J, Rodriguez L M, Escalante M, Smith E O, Balasubramanyam A, i Haymond M W. Types of pediatric diabetes mellitus defined by anti-islet autoimmunity and random C-peptide at diagnosis: Forms of pediatric diabetes. *Pediatric Diabetes*, 2013, 14 (5), 333–340.

Rudman N. N-glikom i genom u razumijevanju šećerne bolesti tipa 1. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Doktorska rad, 2022.

Rudman N, Gornik O, i Lauc G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Letters*, 2019, 593 (13), 1598–1615.

Rudman N, Kifer D, Kaur S, Simunović V, Cvetko A, Pociot F, Morahan G, i Gornik O. Children at onset of type 1 diabetes show altered N-glycosylation of plasma proteins and IgG. *Diabetologia*, 2022, 65 (8), 1315–1327.

Sayarifard F, Aghamohammadi A, Haghi-Ashtiani M T, Rajab A, Irani H, Ahmadian J H, Zaridoost A, Parvaneh N, Rezaei N, i Rabbani A. Evaluation of serum IgA levels in Iranian patients with type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 2012, 49 (2), 131–135.

Scallon B J, Tam S H, McCarthy S G, Cai A N, i Raju T S. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular Immunology*, 2007, 44 (7), 1524–1534.

Scott K, Gadomski T, Kozicz T, i Morava E. Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2014, 37 (4), 609–617.

Shkunnikova S. N-glikozilacije imunoglobulina A u šećernoj bolesti tipa 1 kod djece. Sveučilište u Zagrebu. Rektorova nagrada 2020./21. Dostupno na <https://apps.unizg.hr/rektorova-nagrada/javno/radovi/1106/preuzmi> (pristupljeno 21. kolovoza, 2022.)

Snedeker S M i Hay A G. Do Interactions Between Gut Ecology and Environmental Chemicals Contribute to Obesity and Diabetes? *Environmental Health Perspectives*, 2012, 120 (3), 332–339.

De Sousa-Pereira P i Woof J M. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies*, 2019, 8 (4), 57.

Steffen U, Koeleman C A, Sokolova M V, Bang H, Kleyer A, Rech J, Unterweger H, Schicht M, Garreis F, Hahn J, Andes F T, Hartmann F, Hahn M, Mahajan A, Paulsen F, Hoffmann M, Lochnit G, Muñoz L E, Wuhler M, Falck D, Herrmann M, i Schett G. IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nature Communications*, 2020, 11 (1), 120.

Svensson J, Eising S, Mortensen H B, Christiansen M, Laursen I, Lernmark Å, Nilsson A, Simonsen L B, Carstensen B, Pociot F, i Johannesen J. High levels of immunoglobulin E and a continuous increase in immunoglobulin G and immunoglobulin M by age in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Human Immunology*, 2012, 73 (1), 17–25.

The TEDDY Study Group, Törn C, Liu X, Hagopian W, Lernmark Å, Simell O, Rewers M, Ziegler A-G, Schatz D, Akolkar B, Onengut-Gumuscu S, Chen W-M, Toppari J, Mykkänen J, Ilonen J, Rich S S, She J-X, Sharma A, Steck A, i Krischer J. Complement gene variants in relation to autoantibodies to beta cell specific antigens and type 1 diabetes in the TEDDY Study. *Scientific Reports*, 2016, 6 (1), 27887.

Tripathi P, Srivatava R, Pandey A, Pandey R, i Goswami S. Alternative therapies useful in the management of diabetes: A systematic review. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2011, 3 (4), 504.

Varki A, Cummings R D, Esko J D, Freeze H H, Stanley P, Bertozzi C R, Hart G W, i Etzler M E, eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. 2009. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, i King H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 2004, 27 (5), 1047–1053.

Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, i Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2017, 85 (1), 3–12.

Yoo E M i Morrison S L. IgA: An immune glycoprotein. *Clinical Immunology*, 2005, 116 (1), 3–10.

## **9. SAŽETAK**

Šećerna bolest tipa 1 (T1DM) multifaktorska je, kronična i autoimuna bolest koja nastaje kao posljedica nedostatka endogenog lučenja inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače. Trenutno su dostupna dva biomarkera koji ukazuju na dugoročnu kontrolu dijabetesa – HbA1c i fruktozamin, ali oba imaju svoja ograničenja. Stoga, postoji velika potreba za markerom koji bi na precizniji način omogućio longitudinalno praćenje T1DM.

Promjene u profilu *N*-glikozilacije ukupnih proteina plazme i imunoglobulina G u mnogim su se studijama pokazale kao potencijalni prognostički, dijagnostički i terapijski markeri raznih bolesti, posebice onih upalne prirode kao što je T1DM. Glikozilacija imunoglobulina A u različitim bolestima općenito je manje proučavana, a tek prije nekoliko godina započela su intenzivna istraživanja uloge njegove glikozilacije u T1DM.

Cilj ovog istraživanja je identificirati promjene u IgA *N*-glikozilaciji u populaciji odraslih bolesnika s T1DM te ih usporediti sa zdravim osobama. Analiza glikana učinjena je HILIC-UPLC metodom. U ovom diplomskom radu je otkriveno da kod odraslih ispitanika s dijagnosticiranim T1DM postoji statistički značajna promjena udjela glikanskih struktura GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19, GP21, GP24, GP25, GP27 i GP29. Detaljnije proučavanje deriviranih svojstava pokazalo je smanjenje udjela nisko razgranatih glikana, a povećanje visoko razgranatih glikana. Nadalje, smanjenje udjela digalaktoziliranih glikana i povećanje udjela trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih glikana pronađeno je u bolesnika s T1DM. Udio glikana s sržnom fukozom značajno je smanjen u bolesnika s T1DM, dok je udio oligomanoznih glikana značajno povećan.

Ove promjene u glikozilaciji IgA upućuju na njegovu moguću ulogu u progresiji bolesti te na potrebu daljnjeg ispitivanja njegove prognostičke vrijednosti.

# 10. SUMMARY

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a multifactorial, chronic, and autoimmune disease that results from a lack of endogenous insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. There are two markers currently available that indicate long-term diabetes control – HbA1c and fructosamine, but both have their limitations. Therefore, there is a great need for a marker that would show the longitudinal progression of T1DM in a more precise way.

Changes in the *N*-glycosylation profile of total plasma proteins and immunoglobulin G in many studies have proven to be a potential prognostic, diagnostic and therapeutic marker of various diseases, especially those of an inflammatory nature, such as T1DM. Glycosylation of immunoglobulin A in various diseases has generally been less studied, and only a few years ago, intensive research into the role of its glycosylation in T1DM began.

The aim of this study is to identify changes in IgA *N*-glycosylation in the population of adult patients that developed complications of T1DM and compare them with healthy individuals. Glycan analysis was done by ultra performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions. In this thesis, it was discovered that in adult subjects diagnosed with T1DM there is a statistically significant change in the proportion of glycan structures GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19, GP21, GP24, GP25, GP27 and GP29. A more detailed study of the derived traits showed a decrease in the proportion of low-branched glycans, and an increase in highly branched glycans. Furthermore, a reduction in the proportion of digalactosylated glycans and an increase in the proportion of trigalactosylated and trisialinised glycans is found in T1DM patients. The proportion of glycans with core fucose was significantly reduced in T1DM patients, while the proportion of high mannose glycans was significantly increased.

These changes in IgA glycosylation indicate that it has a possible role in the disease progression and the need for further examination of its prognostic value.



# 11. ŽIVOTOPIS

Sofia Shkunnikova rođena je 29. lipnja 1998. godine u Voronežu, Ruska Federacija. Završila je Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju u Rijeci, a trenutno studira na 5. godini Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Tijekom studiranja aktivno se angažira u znanstvenom radu. U akademskoj godini 2018./19. volontira na Zavodu za analitičku kemiju gdje ujedno radi i kao demonstrator na kolegiju Analitička kemija 2. Od akademske godine 2020./21. volontira na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju gdje je izradila rad za koji je dobila Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad u ak. god. 2020./21 pod nazivom „*N*-glikozilacija imunoglobulina A u šećernoj bolesti tipa 1 kod djece“. Osim toga, dobitnica je još 2 rektorove nagrade (nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici, Projekt *CinePharm* i Projekt *Studenti farmacije i medicinske biokemije u izazovima pandemije*), dekanove nagrade za studentski rad „Uloga supstituenata u Hofmann-Löffler-Freytagovoj sintezi nikotina: kvantno-kemijska studija“, te dvije pohvalnice dekanice za najbolji prosjek na studiju. Uz to, predsjednica je Studentskog zbora FBF-a i aktivna članica Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA).

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

**Shkunnikova, Sofia**; Zipse, Hendrik; Šakić, Davor:

Role of substituents in the Hofmann-Löffler-Freytag reaction. A quantum-chemical case study on nicotine synthesis.

*Organic i Biomolecular Chemistry*. **2021**, 19, 854-865; doi:10.1039/D0OB02187C

**Shkunnikova, Sofia**; Širac, Tea; Lalić, Katarina; Kulišić, Ankica; Jablan, Jasna:

Comparison of Zn Content in Rapid-acting Insulin and Biphasic Suspension by FAAS

*Croatica Chemica Acta*. **2021**, 94, 95-102; doi: 10.5562/cca3830

Zubčić, Gabrijel; **Shkunnikova, Sofia**; Šakić, Davor; Marijan, Marijan

Renaissance of the Hofmann-Löffler-Freytag Reaction – Development of C–H Functionalisation Strategies Based on Green Chemistry Principles

*Kemija u industriji*. **2022**, 71, 359-373; doi:10.15255/KUI.2021.070

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA A U ŠEĆERNOJ BOLESTI TIP 1

Sofia Shkunnikova

### SAŽETAK

Šećerna bolest tipa 1 (T1DM) multifaktorska je, kronična i autoimuna bolest koja nastaje kao posljedica nedostatka endogenog lučenja inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače. Trenutno su dostupna dva biomarkera koji ukazuju na dugoročnu kontrolu dijabetesa – HbA<sub>1c</sub> i fruktozamin, ali oba imaju svoja ograničenja. Stoga, postoji velika potreba za markerom koji bi na precizniji način omogućio longitudinalno praćenje T1DM.

Promjene u profilu *N*-glikozilacije ukupnih proteina plazme i imunoglobulina G u mnogim su se studijama pokazale kao potencijalni prognostički, dijagnostički i terapijski markeri raznih bolesti, posebice onih upalne prirode kao što je T1DM. Glikozilacija imunoglobulina A u različitim bolestima općenito je manje proučavana, a tek prije nekoliko godina započela su intenzivna istraživanja uloge njegove glikozilacije u T1DM.

Cilj ovog istraživanja je identificirati promjene u IgA *N*-glikozilaciji u populaciji odraslih bolesnika s T1DM te ih usporediti sa zdravim osobama. Analiza glikana učinjena je HILIC-UPLC metodom. U ovom diplomskom radu je otkriveno da kod odraslih ispitanika s dijagnosticiranim T1DM postoji statistički značajna promjena udjela glikanskih struktura GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19, GP21, GP24, GP25, GP27 i GP29. Detaljnije proučavanje deriviranih svojstava pokazalo je smanjenje udjela nisko razgranatih glikana, a povećanje visoko razgranatih glikana. Nadalje, smanjenje udjela digalaktoziliranih glikana i povećanje udjela trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih glikana pronađeno je u bolesnika s T1DM. Udio glikana s sržnom fukozom značajno je smanjen u bolesnika s T1DM, dok je udio oligomanoznih glikana značajno povećan.

Ove promjene u glikozilaciji IgA upućuju na njegovu moguću ulogu u progresiji bolesti te na potrebu daljnjeg ispitivanja njegove prognostičke vrijednosti.

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

Rad sadrži: 55 stranica, 7 grafičkih prikaza, 5 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *N*-glikozilacija, šećerna bolest tipa 1, HILIC-UPLC, imunoglobulin A

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

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

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

**Dr. sc. Donatella Verbanac**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **N-GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN A IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS**

**Sofia Shkunnikova**

#### **SUMMARY**

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a multifactorial, chronic, and autoimmune disease that results from a lack of endogenous insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. There are two markers currently available that indicate long-term diabetes control – HbA1c and fructosamine, but both have their limitations. Therefore, there is a great need for a marker that would show the longitudinal progression of T1DM in a more precise way.

Changes in the *N*-glycosylation profile of total plasma proteins and immunoglobulin G in many studies have proven to be a potential prognostic, diagnostic and therapeutic marker of various diseases, especially those of an inflammatory nature, such as T1DM. Glycosylation of immunoglobulin A in various diseases has generally been less studied, and only a few years ago, intensive research into the role of its glycosylation in T1DM began.

The aim of this study is to identify changes in IgA *N*-glycosylation in the population of adult patients with T1DM and compare them with healthy individuals. Glycan analysis was done by ultra performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions. In this thesis, it was discovered that in adult subjects diagnosed with T1DM there is a statistically significant change in the proportion of glycan structures GP2, GP4, GP5, GP7, GP13, GP14, GP17, GP19, GP21, GP24, GP25, GP27 and GP29. A more detailed study of the derived traits showed a decrease in the proportion of low-branched glycans, and an increase in highly branched glycans. Furthermore, a reduction in the proportion of digalactosylated glycans and an increase in the proportion of trigalactosylated and trisialinised glycans is found in T1DM patients. The proportion of glycans with core fucose was significantly reduced in T1DM patients, while the proportion of high mannose glycans was significantly increased.

These changes in IgA glycosylation indicate that it has a possible role in the disease progression and the need for further examination of its prognostic value.

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

Thesis includes: 55 pages, 7 figures, 5 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *N*-glycosylation, type 1 diabetes, HILIC-UPLC, immunoglobulin A

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

Reviewers: **Olga Gornik Kljaić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Gordan Lauc, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Donatella Verbanac, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2022