

Visokoprotlačna analiza N-glikozilacije komponente komplementa C3 kao biljega šećerne bolesti tipa 1

Šoić, Dinko

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:163:112904>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-13**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Dinko Šoić

**VISOKOPROTOČNA ANALIZA
N-GLIKOZILACIJE KOMPONENTE
KOMPLEMENTA C3 KAO BILJEGA
ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Dinko Šoić

**VISOKOPROTOČNA ANALIZA
N-GLIKOZILACIJE KOMPONENTE
KOMPLEMENTA C3 KAO BILJEGA
ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dinko Šoić

**HIGH-THROUGHPUT N-GLYCOSYLATION
ANALYSIS OF COMPLEMENT
COMPONENT C3 AS BIOMARKER OF
TYPE 1 DIABETES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Prof. Olga Gornik Kljaić, PhD

Zagreb, 2023.

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 farmacija.

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) i Australiji (Centre for Diabetes Research, University of Western Australia) te Sveučilištem u Kopenhagenu (Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen) i Kliničkom bolnicom Merkur, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*O, mjeseci, da barem zadnji put
Moj jad i muku gledaš, sjajnožit,
Jer mnogu već sam ponoć za tim stolom
Dočeku budan, mučen bolom:
Tu često ponad knjiga lik se tvoj
Ukazu meni, sjetni družu moj!
Ah, da mi je po visovima stupat,
U tvome svjetlu da se mogu kupat,
I s duhovima lebdjet oko spilja,
Po livadama lutati bez cilja,
Da odbacim sveg pustog znanja dim
I rosom tvojom miven ozdravim!*

J. W. Goethe: Faust (preveo Tito Strozzi)

I was gratified to be able to answer promptly, and I did. I said I didn't know.

Mark Twain

ZAHVALE

Mentorici prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić ovim putem zahvaljujem na najbezbolnijem mogućem uvodu u akademski i poslovni svijet. Svijet je to u kojem nikad nije postala „šef“ u onom rigidnom smislu te riječi, već se u svojim postupcima uvijek vjerno nadahnjivala idealima eponimiziranog *Mentora* iz Homerove Odiseje – ne samo da je poticala i odgajala samostalnost i razboritost, već ih je svojim primjerom blistavo utjelovljivala. Draga Olga, ispričavam se na svim pokidanim žvcima koje sam Vam priuštio. Bit ću bolji.

Mentoru mog diplomskog rada doc. dr. sc. Tomi Keseru zahvaljujem na strpljivom i uzbudljivom uvodu u područje glikobiologije, kromatografije i spektrometrije masa, i to u vrijeme kada nisam ni znao da me te stvari zanimaju. Dragi Toma, hvala na svim impromptu osmišljenim pokusima koji su me uvjerali da znanost uistinu može biti genijalno zabavna, kao i savjetima za održavanje razumne količine analitičnosti i sistematičnosti u općeprisutnom kaosu (laboratorijskog) rada.

Zahvaljujem i dr. sc. Mislavu Novokmetu na pristupačnom i otrežnjavajućem vodstvu tijekom mojih prvih koraka u svijetu *jedne jako jako jako precizne vage*: od inicijalnih besciljnih kopanja po spektrima do finalnih anotacija struktura. Zahvaljujem mu i na kvalitetnom tečaju za majstore, kao i usputnom lingvističkom tečaju, bez kojih bi runnovi i dalje pucali, a uzorci i dalje čekali da se odvoze.

Zavodskim kolegama Ani, Najdi i Marku hvala na nesebičnom dijeljenju njihovih glikanskih ekspertiza, ali i onih životnih. Čitavom Zavodu zahvaljujem na svim zajedničkim ručkovima, raspravama i salvama smijeha koji su me svakog dana činili sitim – na svim razinama.

Mojim partnerima u zločinu, odnosno kolegama na projektu, Borni, Branimiru i Mateju, zahvaljujem na zajedničkom dijeljenju usvojenih i prisutnih vještina, kao i na svim ispijenim pivama tijekom kojih smo prolazili kroz znanstvene i ne tako znanstvene teme, te kovali karijerne planove i loše fore. Ako je ostala još ijedna fora s glikanima, a da ju mi nismo smislili – bit će mi *slatko* zaspati.

Hvala svima koji su sa mnom čekali duge inkubacije, ili me pak vozili u labos u luda vremena.

Zahvaljujem i svim FBF asistentima koji su mi doktorat pretvorili u pravi produženi studentski doživljaj – svijet se uz vas činio dohvatljivim, a ljudi uistinu njegovim najfrapantnijim biserom.

SAŽETAK

Ubrzani razvoj analitičkih tehnika u posljednjih nekoliko desetljeća omogućio je temeljito istraživanje procesa N-glikozilacije u brojnim patofiziološkim stanjima, a uočene promjene u mnogima od njih dovele su do strelovitog rasta interesa za glikobiologiju. Promjene u N-glikozilaciji danas se smatraju vrijednim biljezima raznih bolesti, te se njihova specifičnost pokušava iskoristiti u diferencijalne, dijagnostičke i prognostičke svrhe. Prethodne studije pokazale su da je N-glikanski profil plazmatskih proteina promijenjen u šećernoj bolesti tipa 1 (ŠBT1) i to kako u mladoj populaciji u ranoj fazi bolesti, tako i u odrasloj populaciji s komplikacijama ove bolesti. Jedna od izraženije uočenih promjena bila je ona u zastupljenosti visoko-manoznih glikanskih struktura u plazmatskom N-glikomu. Ove strukture dominantno bi mogle potjecati s komponente komplementa C3, budući da je to glikoprotein s isključivo visoko-manoznim glikanima vezanima na proteinsku okosnicu za kojeg je poznato da doprinosi razvoju ŠBT1 pojačavanjem autoimunih upalnih procesa. Iz tog je razloga u ovom radu razvijena visokoprotočna metoda za analizu N-glikozilacije pojedinih glikozilacijskih mjesta ljudskog C3 proteina upotrebom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrom masa (LC-MS) temeljena na njegovu obogaćivanju iz plazme pomoću lektinskog afinitetnog medija visokog afiniteta za manozu. Temporalna stabilnost C3 N-glikoma utvrđena je longitudinalnom analizom uzoraka 14 zdravih ispitanika uzorkovanih u tri vremenske točke kroz 10 tjedana. Novorazvijenom metodom zatim je analizirana krvna plazma 61 djece i mladih s novodijagnosticiranih šećernom bolesti tipa 1 i 84 njihove zdrave braće i sestara te su uočene značajne promjene C3 N-glikoma. ŠBT1 povezana je s porastom manje procesuiranih struktura s više manoznih podjedinica na oba N-glikozilacijska mjesta, a regresijski model temeljen na C3 N-glikanima pokazao je snažnu moć u diskriminaciji ispitanika sa ŠBT1 i zdravih kontrola. Nadalje, C3 N-glikozilacija je analizirana u odrasloj populaciji od 189 ispitanika s različitim stupnjem najčešćih komplikacija ŠBT1 – retinopatije i albuminurije. Pokazano je da se C3 N-glikom značajno mijenja u teškoj albuminuriji u ŠBT1, no da je neovisan o samom trajanju bolesti. Retinopatija je pak dovela do promjene samo jedne glikoforme, dok su svi osim jednog C3 glikopeptida značajno povezani s razinama hemoglobina A1c (HbA1c). Predstavljene spoznaje ukazuju na uključenost N-glikozilacije i C3 komponente komplementa u patofiziologiju šećerne bolesti tipa 1 te upućuju na značaj C3 N-glikoma kao potencijalnog dijagnostičkog i prognostičkog biljega ove bolesti i njoj pridruženih komplikacija.

Ključne riječi: N-glikozilacija, N-glikani, glikoproteomika, C3 komponenta komplementa, sustav komplementa, šećerna bolest tipa 1, LC-MS, spektrometrija masa

SUMMARY

Introduction

N-glycosylation is a ubiquitous co- and post-translational modification that enriches the structure and function of proteins, and as such is essential for physiological as well as pathological cellular functions. This process is indirectly encoded by the genome and considerably influenced by environmental factors. Changes in N-glycosylation have been described in different diseases including type 1 diabetes (T1D) and are increasingly considered as biomarkers of ongoing pathological conditions. Previous study demonstrated that the N-glycome of total plasma proteins is changed in children with early-onset T1D compared to their healthy siblings. Furthermore, N-glycosylation was associated with type 1 diabetes complications, as N-glycome of total serum proteins in adult T1D patients with kidney disease was proved to be altered. Among the more pronounced observed associations in both studies were high-mannose N-glycan levels. These structures could predominantly originate from the C3 component of complement, as this protein is exclusively occupied with high-mannose glycans attached to its protein backbone. Besides, it is known that C3 contributes to the development of T1D by enhancing autoimmune inflammatory processes, and the presence of its activated forms in glomeruli and glomerular capillaries of animal models supports its role in diabetic nephropathy. As the most abundant complement protein with plasma concentrations of around 1.2 mg/ml, C3 plays a key role in immune surveillance, so it is no wonder that is also associated with pathophysiological responses. Notwithstanding the fact of involvement of complement and N-glycans in the development of type 1 diabetes, N-glycosylation of C3 complement component is still poorly investigated. One of the reasons for this is the lack of appropriate analytical methods. Although the C3 N-glycan profile is already known, available analytical protocols are only suitable for a limited number of large volume samples. The presence of a high-throughput method for the C3 N-glycome analysis would enable identification of C3 glycoforms associated with the onset of T1D as well as the development of its complications, after which an evaluation of their diagnostic and prognostic potential could be done. All this could lead to discovery of novel risk factors of T1D development and progression, and would result in new knowledge about the mechanism of the disease and the role of glycosylation behind it.

Materials and methods

The first goal of this thesis was to develop a novel cost-effective glycoproteomic 96-well workflow for a high-throughput and site-specific N-glycosylation analysis of human C3 on a glycopeptide level. The glycopeptide level approach guarantees that the changes seen are protein specific and facilitates the value of C3 N-glycoprofiling in type 1 diabetes risk assessment. The analysis is based on the identification and relative quantification of C3 glycopeptides according to their corresponding glycosylation sites. In total, six exclusively high-mannose C3 glycopeptides were found and confirmed in MS/MS analysis that followed, three per each of the two glycosylation sites present. Developed workflow enables the analysis of hundreds of samples in only a couple of days, starting from as low as 10 μ l of blood plasma or serum. In order to reduce initial sample complexity, the workflow starts with C3 enrichment using a lectin matrix. Since C3 contains exclusively high-mannose glycans, Concanavalin A (Con A) was chosen as it preferentially recognizes glycans presenting α -mannose-containing cores. Enriched glycoproteins are then digested using endoproteinase Glu-C, and resulting glycopeptides purified from unwanted hydrophobic peptides by solid phase extraction using hydrophilic chromatography interactions (HILIC-SPE). Purified glycopeptides are subsequently analyzed by reversed-phase liquid chromatography coupled to mass spectrometer by electrospray ionization (RP-LC-ESI-MS) technique. Obtained chromatograms are then aligned and glycoproteomic data processed by spectra summing over determined retention time windows. Only signals that meet defined quality control parameters (mass accuracy below 100 ppm, isotopic pattern quality (IPQ) below 25 %, and signal to noise ratio above 8) are eventually summed and used for relative quantification of the glycoform abundance within each glycosylation site. Developed workflow was then applied to several cohorts.

To evaluate the C3 N-glycome stability within a healthy individual under physiological conditions, samples from 14 healthy and age-matched male individuals were measured at three time points: at the beginning of the study, and after 6 and 10 weeks. Temporal stability was assessed by calculating intraindividual and interindividual coefficient of variation (CV) for all C3 glycoforms. Intraindividual CV was measured from longitudinal samples of each subject, while the interindividual CV was computed from all samples within each time point.

In early-onset type 1 diabetes study, plasma samples of 61 newly diagnosed children and adolescents (median age of 10, age range 1-16), as well as 84 unaffected siblings (median age of 11, age range 4-22) derived from the Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes (DanDiabKids) were analyzed. The Registry contains samples from T1D patients collected

within three months of the disease diagnosis, as well as samples of their healthy siblings. Assessment of T1D association with C3 N-glycome was done using linear mixed modelling, while the evaluation of C3 N-glycome ability to distinguish T1D individuals from their healthy siblings was done using logistic mixed model elastic net regression.

Type 1 diabetes complications study consisted of 189 blood serum samples collected at the Vuk Vrhovac University Clinic for Diabetes, Endocrinology and Metabolic Diseases. Study included type 1 diabetes subjects aged between 18 and 70 years (median age 46 years, age range 18-70), on adequate treatment. Subjects were assessed for common T1D complications (albuminuria and retinopathy) and divided into three categories per complication: without or with initial complication, moderate or severe complication. Assessment of association between C3 N-glycome and various laboratory parameters and T1D complication status was done using general linear modelling, while the ability of C3 N-glycome to differentiate individuals with and without different type 1 diabetes complications was done using logistic elastic net regression.

Results

Developed workflow showed solid inter-day reproducibility with median coefficient of variation being below 12 % for all the glycoforms analysed. C3 N-glycosylation proved to be mostly stable under physiological conditions, with its intraindividual variation being smaller than the variation between individuals, allowing its consideration as a biomarker. Regarding the early-onset T1D study, significant changes of C3 N-glycan profiles were found. Recent-onset type 1 diabetes was associated with an increase in the proportion of unprocessed glycan structures with more mannose units on both C3 N-glycosylation sites: $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ on C3.Asn939 glycosylation site and $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ on C3.Asn85 site ($p = 5.43 \times 10^{-5}$ and $p = 7.82 \times 10^{-8}$ respectively). A regression model including C3 N-glycans showed notable discriminative power between children with early-onset type 1 diabetes and their healthy siblings with AUC of 0.879.

Regarding the T1D complications study, C3 N-glycome in T1D patients changed significantly in severe stage albuminuria accompanying the disease compared to moderate and initial albuminuria cases, with biggest change being the increase of the monoglycosylated glycoform ($p = 0.002$). C3 N-glycan profile of moderate albuminuria was shown to be fairly similar to that of initial complication. The monoglycosylated form proved to be the only glycoform changed in retinopathy ($p = 0.038$), while smoking status and estimated glomerular filtration rate (eGFR)

in T1D showed no effect on C3 N-glycan profiles. Hypertension status in T1D significantly affected relative abundance of all except one C3 glycoform, with increase in the proportion of glycopeptides with more mannose units evident on both glycosylation sites ($p = 2.23 \times 10^{-4}$ and $p = 2.71 \times 10^{-4}$ respectively). The same trend was present with poor glycaemic control: higher HbA1c levels were also associated with glycopeptides with more mannose units on both glycosylation sites. Once again, the monoglucosylated glycoform had the strongest association ($p = 1.97 \times 10^{-17}$). Lastly, type 1 diabetes duration had no influence on the C3 N-glycome.

Conclusions

A novel high-throughput workflow for detailed N-glycosylation analysis of human C3 was successfully developed and validated. It enables weekly analysis of hundreds of blood plasma or serum samples from as low as 10 μ l of starting volume, facilitating the research of C3 N-glycosylation on a large number of samples in future studies of various diseases. As C3 N-glycome proved to be stable in healthy individuals during homeostasis, its potential use as a biomarker is enabled.

Aberrant C3 N-glycan profiles characteristic of the early phase of type 1 diabetes have been identified. Children newly diagnosed with type 1 diabetes were associated with an increase in the proportion of unprocessed glycans, that is structures with more mannose units, on both C3 N-glycosylation sites. A C3 glycan-based discriminative model for recent-onset type 1 diabetes was built and its solid distinguishing power indicates that C3 N-glycome could be valuable in assessment of type 1 diabetes risk in children.

C3 N-glycome was proved to be changed in severe albuminuria accompanying type 1 diabetes, the biggest change being the increase in the proportion of the monoglucosylated glycoform. A significant increase of the same glycoform was also characteristic of non-proliferative retinopathy. C3 N-glycosylation was also shown to be associated with glycaemic control, as measured by HbA1c. Being independent of the disease duration, C3 N-glycome could be a potential novel marker of type 1 diabetes onset, progression and severity.

Keywords

N-glycosylation, N-glycans, glycoproteomics, C3 complement component, complement system, type 1 diabetes, LC-MS, mass spectrometry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Glikozilacija proteina	2
1.1.1. N-glikozilacija.....	3
1.1.2. N-glikani kao biljezi bolesti.....	4
1.2. Šećerna bolest tipa 1.....	6
1.2.1. N-glikozilacija u šećernoj bolesti tipa 1	7
1.2.2. Komponenta komplementa C3 u šećernoj bolesti tipa 1	8
1.3. Komponenta komplementa C3.....	9
1.3.1. N-glikozilacija komponente komplementa C3	11
1.4. Visoko-protočna analiza N-glikana.....	12
1.4.1. Obogaćivanje glikoproteina iz bioloških uzoraka lektinima	13
1.4.2. Glikoprofiliranje spektrometrijom masa	15
1.4.3. Analiza N-glikopeptida	17
1.5. Obrazloženje istraživanja.....	19
2. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI	21
2.1. Ispitanici	22
2.1.1. Ispitanici za utvrđivanje temporalne stabilnosti C3 N-glikoma	22
2.1.2. Ispitanici s novodijagnosticiranom ŠBT1 i njihova zdrava braća i sestre.....	22
2.1.3. Ispitanici sa ŠBT1 s različitim stupnjem komplikacija bolesti.....	23
2.2. Metode	25
2.2.1. Eksperimentalni dizajn	25
2.2.2. Obogaćivanje C3 glikoproteina iz ljudske plazme.....	25
2.2.3. Denaturacija glikoproteina i Glu-C proteoliza.....	26
2.2.4. Obogaćivanje glikopeptida ekstrakcijom na čvrstoj fazi.....	26
2.2.5. Nano-LC-ESI-MS(/MS) analiza obogaćenih glikopeptida	26
2.2.6. Anotacija C3 glikopeptida	27
2.2.7. Proteomska analiza podataka.....	28
2.2.8. Temporalna stabilnost C3 N-glikoma	29
2.2.9. Ekstrakcija i obrada glikoproteomskih podataka	29
2.2.10. Statistička obrada podataka.....	30
2.3. Materijali.....	32
2.3.1. Kemikalije.....	32
2.3.2. Enzimi.....	32
2.3.3. Laboratorijski uređaji i oprema.....	32
2.3.4. Potrošni materijal	32
2.3.5. Računalni programi i alati	33

3.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	34
3.1.	Razvoj visokoprotočne metode za analizu N-glikozilacije ljudske komponente komplementa C3.....	35
3.2.	C3 N-glikoprofiliranje.....	36
3.3.	Validacija metode.....	43
3.4.	Temporalna stabilnost C3 N-glikoma.....	45
3.5.	C3 N-glikom u šećernoj bolesti tipa 1.....	46
3.6.	C3 N-glikom u komplikacijama ŠBT1.....	49
3.7.	C3 N-glikanske promjene izazvane hipertenzijom i pušenjem u ŠBT1.....	53
3.8.	Povezanost C3 N-glikoma s kontrolom glikemije, eGFR i trajanjem ŠBT1.....	56
3.9.	C3 N-glikani kao alat u procjeni statusa komplikacija šećerne bolesti tipa 1.....	58
4.	RASPRAVA.....	61
4.1.	Novorazvijena metoda za analizu C3 N-glikoma.....	62
4.2.	C3 N-glikom u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1.....	63
4.3.	C3 N-glikom u ŠBT1 komplikacijama.....	65
5.	ZAKLJUČCI.....	69
6.	POPIS LITERATURE.....	72

KRATICE

AER – urinarna ekskrecija albumina (engl. *albumin excretion rate*)

APC – antigen prezentirajuće stanice (engl. *antigen presenting cells*)

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

C3 – gen za komponentu komplementa C3

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

CID – kolizijom inducirana disocijacija (engl. *collision-induced dissociation*)

CV – koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*)

SD – standardna devijacija (engl. *standard deviation*)

eGFR – procijenjena brzina glomerulske filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*)

ER – endoplazmatski retikulum

FA – mravlja kiselina (engl. *formic acid*)

FDR – stopa lažno pozitivnih rezultata (engl. *false discovery rate*)

GlcNAc – *N*-acetilglukozamin

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

HbA1c – glikirani hemoglobin

HBP – heksozaminski biosintetski put (engl. *hexosamine biosynthetic pathway*)

HILIC – tekućinska kromatografija temeljena na hidrofiličnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HLA – ljudski leukocitni antigen, (engl. *human leukocyte antigen complex*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

IgG – imunoglobulin G

MAC – kompleks koji napada membranu (engl. *membrane attack complex*)

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

MDSC – supresorske stanice izvedene iz mijeloida (engl. *myeloid-derived suppressor cells*)

MHC – glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MS – spektrometrija masa

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

ROC – krivulja operativne karakteristike prijemnika (engl. *receiver operating characteristic*)

RP-LC-ESI-MS – tekućinska kromatografija obrnutih faza spregnuta sa spektrometrom masa ionizacijom elektroraspršenjem (engl. *reverse phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*)

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

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

UDP-GlcNAc – uridin difosfat-*N*-acetilglukozamin

1. UVOD

1.1. Glikozilacija proteina

Glikozilacija proteina je sveprisutna kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija koja obogaćuje njihovu strukturu i funkciju. To je enzimski proces reguliran gustom mrežom gena kojim se glikani dodaju na polipeptidnu sekvencu proteina, te je pod znatnim utjecajem okolišnih čimbenika (1,2). Tipičan je glikan kompleksna oligosaharidna struktura koja sadrži 10 do 15 monosaharida koji mogu biti povezani na najrazličitije načine (3). Osim slijeda monosaharidnih podjedinica, glikanska je struktura određena i točnom pozicijom glikozidne veze, njenom stereokemijskom konfiguracijom, kao i brojem i mjestom grananja (4). Kod sisavaca, na tisuće glikana tako je izgrađeno od svega desetak monosaharida: fukoze, galaktoze, glukoze, *N*-acetilgalaktozamina, *N*-acetilglukozamina, glukuronske kiseline, iduronske kiseline, manoze, ksiloze i sijalinskih kiselina (5). Uzrok ovakve goleme raznolikosti glikanskih struktura je njihova nelinearnost, odnosno sposobnost grananja različitim oblicima glikozidnih veza. Ne čudi dakle da je glikoproteom nekoliko redova veličine kompleksniji od samog proteoma. Dok je polipeptidna sekvencija često praktički identična u brojnim vrstama, upravo se procesom glikozilacije dodatkom raznovrsnog repertoara glikana stvara funkcionalni glikoprotein karakterističan za određenu vrstu (4).

Za razliku od proteina i molekula RNA, čija je sinteza određena slijedom nukleotida u odgovarajućim genima, glikani ne nastaju prema gotovom predlošku (6). Njihova je sinteza posljedica kompleksnih interakcija stotine enzima, transkripcijskih faktora, ionskih kanala i ostalih proteina. Trenutno je poznato preko 700 gena koji kodiraju glikozilacijsku mašineriju, a procjenjuje se da je čak 5 do 10 % našeg genoma na neki način uključeno u glikozilaciju (7,8). Ta dinamična mreža proteina uključenih u sintezu glikana čini proces glikozilacije izrazito osjetljivim na razne utjecaje unutar i van stanice. Bilo kakva promjena okolišnih uvjeta koja utječe na aktivnost enzima ili dostupnost visokoenergetskih donora monosaharida odrazit će se i na konačnu strukturu glikana. Osim genetske komponente, okoliš stoga također ima presudan utjecaj na glikansku biosintezu (4,9). Poznato je da faktori kao što su spol, dob, rasa, reproduktivni ciklus, prehrana i životne navike poput pušenja, konzumacije alkohola i tjelesne aktivnosti, utječu na glikanske profile, a upravo je to reflektiranje sveukupnosti interakcija genskih i okolišnih čimbenika odgovorno za ogroman dijagnostički potencijal glikana (10).

Gotovo su svi membranski i sekretorni proteini glikozilirani, odnosno oko polovice sveukupnih staničnih proteina (1,8). Glikozilacijom proteina moduliraju se njihova biofizička svojstva, čime se pak posljedično regulira funkcija nativnih proteina kodiranih genomom. Glikani stoga predstavljaju esencijalni dio jedinstvenog glikoproteinskog entiteta određujući njegovu

ispravnu strukturu i funkciju u vidu pravilnog smatanja, topljivosti i stabilnosti. Brojni eksperimenti otkrili su da glikozilacija može promijeniti termodinamičke, kinetičke i strukturne značajke proteina, a variranjem glikanskog dijela omogućeno je i precizno modificiranje strukture proteina i prilagođavanje njihove funkcije specifičnim fiziološkim zahtjevima. Osim toga, glikozilacijom proteina stvaraju se i vezna mjesta za glikan-specifične receptore, tzv. lektine (3,11).

Najčešće glikozidne veze kojima je ugljikohidratni lanac povezan na protein su N- i O-glikozidna veza, pa tako razlikujemo N- i O-glikane. Glikani na peptid mogu biti povezani preko *N*-acetilgalaktozamina, kao što je slučaj kod O-glikana, ili pak preko *N*-acetilglukozamina kao što je slučaj kod eukariotskih N-glikana. Osim u šećernoj strukturi koja sudjeluje u vezi, O- i N-glikani razlikuju se i u mjestu vezanja na peptid: O-glikani se vežu preko hidroksilne skupine bočnog ogranka serina ili treonina, dok su N-glikani povezani preko asparaginskog ogranka peptidnog lanca slijeda Asn-X-Ser/Thr/Cys, pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro). Dakle, N-glikani ne mogu biti vezani na bilo koji bočni ogranak asparagina nego isključivo na onaj unutar točno određenog aminokiselinskog slijeda. Budući da N-glikozilirani proteini čine gotovo 90 % glikoproteoma, jasno je da su upravo oni najistraživanija skupina glikoproteina (2,12).

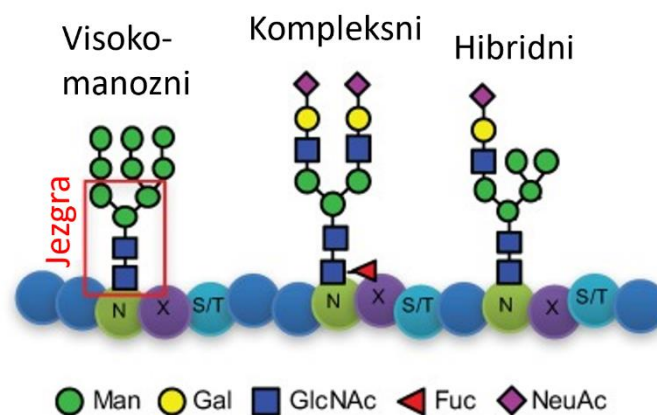
1.1.1. N-glikozilacija

N-glikozilacija je visoko konzervirani proces esencijalan za višestanični život o čijoj važnosti dovoljno govori činjenica da je odsutnost ove modifikacije letalna za embrij (13). Već je spomenuto da se N-glikani mogu vezati na dušikov atom asparaginskog ogranka isključivo unutar Asn-X-Ser/Thr/Cys peptidne sekvence, što ne znači da su sva takva mjesta uistinu glikozilirana. Obično je glikozilirano nekih dvije trećine potencijalnih glikozilacijskih mjesta, a neki proteini uopće nemaju odgovarajuću sekvencu pa stoga nisu ni N-glikozilirani (2). N-glikozilaciju se nikako ne smije zamijeniti s N-glikacijom, ne-enzimskim vezanjem šećera na proteine (14).

Svim eukariotskim N-glikanima zajednička je pentasaharidna sržna sekvenca – tri manoze i dva *N*-acetilglukozamina, a ovisno o šećerima vezanima na tu jezgru mogu se razvrstati u tri glavna tipa: visoko-manozni, kompleksni i hibridni tip (Slika 1). Visoko-manoznom tipu pripadaju glikani na čiju su jezgru vezane isključivo manozne podjedinice, dok kompleksni tip ima raznolike ogranke koji su na jezgru vezani preko *N*-acetilglukozamina. Najčešće dodavani šećeri osim manoze i *N*-acetilglukozamina uključuju galaktozu, fukožu, ili pak sijalinsku

kiselinu. Hibridni je tip kombinacija spomenutih: manozni ogranak se veže na Man α 1-6, dok se na Man α 1-3 jezgre veže jedan ili dva ogranka preko *N*-acetilglukoamina (2,15).

Biosinteza N-glikana odvija se u dvije faze i to u dva odjeljka eukariotskih stanica: endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu. Iako partneri u sekretornom putu, ER i Golgijev aparat imaju fundamentalno drugačiju ulogu u N-glikozilaciji. Prva faza je visoko očuvani biosintetski put koji započinje na membrani ER-a sintezom 14-saharidne jezgre na lipidnom membranskom nosaču dolikol-fosfatu. Taj se oligosaharid zatim prenosi s dolikol-fosfata na asparagin sekretornih i membranskih proteina tijekom njihove translokacije u lumen ER-a. Repertoar je glikanskih struktura u ovoj fazi biosintetskog puta i dalje prilično malen jer je njihovo procesiranje praktički zajedničko svim glikoproteinima. Druga faza započinje modifikacijama N-glikana pomoću glikozidaza i glikoziltransferaza u lumenu ER-a i nastavlja se u Golgijevom aparatu. Upravo ovdje dolazi do nastanka čitavog spektra glikanskih struktura koji se razlikuju među vrstama. Glikoziltransferaze uspostavljaju glikozidne veze i time sintetiziraju glikanski lanac, dok glikozidaze hidrolizom veza uzrokuju njegovo pucanje. Iako glikoziltransferaze predstavljaju anabolički dio glikozilacije, oba ova enzima uzajamno određuju konačan produkt glikanske biosinteze. Ovi enzimi mogu biti prilično različito eksprimirani, te je njihova aktivnost izrazito osjetljiva na fiziološko stanje stanice. Upravo iz tog razloga na finalnu strukturu N-glikana utječu i trenutni okolišni uvjeti (2,16,17).



Slika 1. Tipovi N-glikana. Man – manozna, Gal – galaktoza, GlcNAc – *N*-acetilglukoamin, Fuc – fukoza, NeuAc – sialinska kiselina. Preuzeto i modificirano iz (18).

1.1.2. N-glikani kao biljezi bolesti

Zbog uspješnog odražavanja genetskih, ali i nenasljednih individualnih značajki poput spola, starosti, prehrambenih i životnih navika, N-glikani se sve češće predstavljaju kao uspješni biljezi brojnih bolesti (3,19). Unatoč složenom biosintetskom putu, N-glikanski profili proteina

iznenađujuće su stabilni unutar osobe, a do promjene glikanskih struktura prisutnih na proteinu dolazi tek izraženijom promjenom homeostatskih uvjeta (20,21). Na istom proteinu, pa čak i na istom glikozilacijskom mjestu, može biti prisutan popriličan broj različitih N-glikanskih struktura, formirajući tako različite glikoforme istog glikoproteina. Pojedina glikoforma vjerno reflektira trenutno fiziološko i biokemijsko stanje stanice u trenutku sinteze pojedinog glikoproteina, a promjena glikanske strukture stoga može označavati prisutnost određenog patofiziološkog procesa. Spomenute promjene mogu biti izrazito specifične, omogućujući tako diskriminaciju između bolesnih i zdravih na temelju N-glikanskih profila, što je pak osnova za njihovu primjenu kao uspješnih biljega (22). Osim za bolest karakterističnih promjena N-glikoma, uobičajeni polimorfizmi u mehanizmu glikozilacije i posljedične razlike u sastavu glikoma koje inače postoje u populaciji isto mogu biti važni dijagnostički i prognostički biljezi (8). Također, pojedine glikoforme mogu biti mete virusima i bakterijama te služiti kao pro- ili anti-inflamatorni signali (21).

Iako su prethodna istraživanja glikanskih biljega uključivala analizu glikosfingolipida ili glikozaminoglikana, te se kod karcinoma redovito istražuje O-glikom, fokus većine provedenih i trenutnih studija i dalje je na N-glikomu ukupnih plazmatskih ili serumskih proteina. Ta se činjenica može objasniti velikom zastupljenošću N-glikana u serumu i plazmi, što pojednostavljuje i olakšava njihovu analizu. Serum i plazma tradicionalno su najdostupniji te ujedno minimalno invazivni biološki uzorci, a činjenica da su skoro svi sekretorni proteini N-glikozilirani čini upravo plazma N-glikom atraktivnom metom potencijalnih biljega (19,23). Dosadašnja istraživanja povezala su tako ukupni plazmatski ili serumski N-glikom sa brojnim bolestima i upalnim stanjima, pogotovo onim kroničnima. Tako je aberantan N-glikanski profil ukupne plazme potvrđen u različitim tumorima i oblicima autoimunosti, od upalne bolesti crijeva pa sve do šećerne bolesti tipa 1. Dakle, osim promjena plazmatskih ili serumskih koncentracija proteina, glikanske strukture vezane na njih također se mijenjaju (15,19,21,24).

Kao što je već spomenuto, većina istraživanja fokusirala se na plazmatski ili serumski N-glikom, no u zadnje vrijeme sve je više dokaza da bi analiza glikanskog profila pojedinog proteina drastično povećala specifičnost pronađenih glikanskih biljega (25). Longitudinalna analiza protein-specifičnih glikanskih profila omogućila bi ranu detekciju sistemskih promjena i potencijalno mogla poslužiti za stratifikaciju oboljelih populacija (26). Od svih glikoproteina, daleko najistraženiji N-glikom je onaj imunoglobulina G (IgG-a) kao ključne molekule našeg imunološkog sustava te nazastupljenijeg protutijela u serumu (27,28). Ipak, razvojem

odgovarajućih metoda za visokoprotlačnu analizu, N-glikozilacija ostalih proteina također sve više dobiva na značaju (29).

1.2. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (ŠBT1) je bolest koju karakterizira uništavanje β -stanica Langerhansovih otočića gušterače koje luče inzulin posredovano T stanicama, s nizom autoantigena koji su uključeni kao mete autoimunog procesa. ŠBT1 karakterizira aktivacija imunološkog sustava koja u konačnici dovodi do nedostatka inzulina i povišene razine glukoze (30,31). Ta je aktivacija imunološkog sustava uvjetovana antigen prezentirajućim stanicama (APC, engl. *antigen presenting cell*) koje pak onda prezentacijom antigena aktiviraju T stanice, rezultirajući naposljetku destrukcijom β -stanica (31). Klasični skup ranih simptoma obuhvaća polidipsiju (trajnu žeđ), poliuriju (učestalo mokrenje) i polifagiju (prekomjernu konzumaciju hrane), čije prisustvo uz neizostavnu hiperglikemiju i dalje predstavlja glavno dijagnostičko obilježje. Potreba za cjeloživotnom nadomjesnom terapijom inzulinom također je važna karakteristika ove bolesti (32).

Nove spoznaje vezane za patogenezu autoimunog razaranja β -stanica pokazale su da je ŠBT1 heterogena bolest pod kontrolom kompleksne mreže interakcija između gena, imunološkog sustava i okolišnih čimbenika (33). Što se tiče genetske komponente bolesti, do sada je poznato preko 40 gena koji u različitom obimu doprinose riziku za ŠBT1, pa je tako očito riječ o poligennoj bolesti. Glavnu determinantu genetske predispozicije predstavljaju geni ljudskog leukocitnog antigena (HLA, engl. *human leukocyte antigen complex*), odnosno glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) čovjeka. Ovi geni locirani na kromosomu 6 nose gotovo polovicu genetske predispozicije za ovu bolest, pa ne čudi da se genetski rizik za ŠBT1 dijeli na HLA i ne-HLA gene (32,34,35). Unatoč očitoj uključenosti genoma u patogenezu bolesti, činjenica da se preko 80 % slučajeva ŠBT1 javi u obiteljima bez pozitivne anamneze ukazuje na važnost ostalih utjecaja za razvoj ove bolesti (36). Inicijacija destrukcije β -stanica tako se događa tek nakon određenog okolišnog okidača koji promijeni imunološku funkciju. Među najpoznatijim okidačima su virusi (među ostalima enterovirusi i koksaki virus), toksini (poput nitrozamina) ili pak hrana (izlaganje kravljem mlijeku ili glutenu) (35). Sam proces destrukcije traje tijekom određenog vremenskog razdoblja koje se obično mjeri godinama, a obilježen je prisutnošću antitijela na antigene otočića gušterače (34). Iako određivanje autoantitijela gušterače u visokorizičnih pojedinaca može ukazati na potencijalni razvoj bolesti godinama prije nastupa simptoma (32,34), činjenica da autoantitijela nisu

prisutna kod svih oboljelih otežava njihovo korištenje kao dijagnostičkog i prognostičkog alata (37).

Šećerna bolest tipa 1 je jedna od najčešćih kroničnih bolesti u djetinjstvu, a sve se češće dijagnosticira i u odraslih. Iako predstavlja samo desetak posto svih oblika šećernih bolesti, porast godišnje incidencije ove bolesti od 2-3 % predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Povijesno, ŠBT1 se smatrala bolešću isključivo djece i mladih, no posljednjih desetljeća to se mišljenje promijenilo pa tako dob više ne predstavlja ograničavajući faktor njene dijagnoze. Ipak, bolest se i dalje najčešće dijagnosticira između pete i sedme godine, ili pak početkom puberteta (32,34). Za razliku od većine autoimunih bolesti, ŠBT1 češća je u muškog spola. Također, incidencija bolesti varira s mjesecom rođenja i sezonskim promjenama – djeca rođena u proljetnim mjesecima imaju veću šansu oboljenja, a sama se bolest češće dijagnosticira u zimskom i jesenskom dobu (32,34). Na globalnoj razini, incidencija i stope prevalencije šećerne bolesti tipa 1 značajno variraju, a poznate su i velike varijacije u učestalosti bolesti između susjednih područja u Europi i Sjevernoj Americi. Sve navedeno podupire teoriju da i genetski i okolišni čimbenici zajedno imaju važnu ulogu u predispoziciji ove bolesti (32,34,35).

1.2.1. N-glikozilacija u šećernoj bolesti tipa 1

Prije više od 40 godina pokazano je da su razine specifičnih glikana vezanih na serumske proteine povećane u oboljelih od šećerne bolesti, od čega se samo mali dio može objasniti povećanjem koncentracije glikoproteina koji nose te glikane (38). Danas je pak poznato da je preko N-glikanskih profila ukupnih plazmatskih profila moguće diferencirati različite vrste šećerne bolesti, te čak identificirati pojedince s visokim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 2 (39–41). U usporedbi s konvencionalnim određivanjem autoantitijela, prednost N-glikopofiliranja je potencijalno smanjenje troškova, koji se mogu i dodatno smanjiti nakon određivanja dijagnostički značajnih N-glikanskih struktura (42).

U fiziološkim uvjetima približno 3 % glukoze koristi se u heksozaminskom biosintetskom putu (HBP, engl. *hexosamine biosynthetic pathway*) (43), u kojem se sintetizira donorska molekula za proces N-glikozilacije, uridin difosfat-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc, engl. *uridine diphosphate-N-acetylglucosamine*) (44). Konačna glikanska struktura, a ponajprije njen stupanj razgranatosti, ovisi između ostalog i o dostupnosti UDP-GlcNAc (45). Hiperglikemijsko stanje karakteristično za šećernu bolest dovodi do povećanog protoka glukoze kroz ovaj biosintetski put te rezultira povišenim razinama UDP-GlcNAc, a time potencijalno i visokorazgranatim glikanskim strukturama (45,46). Upravo je to objašnjenje opaženog povećanja razina

visokorazgranatih N-glikanskih struktura u plazmi kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 s nereguliranom glukozom u krvi, bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2, pa čak i kod zdravih ljudi s povećanim rizikom od razvoja dijabetesa u budućnosti (39,42,47,48).

Prethodne studije pokazale su da je N-glikanski profil ukupnih serumskih proteina promijenjen u odraslih ŠBT1 bolesnika s bubrežnom bolesti i da je N-glikozilacija proteina krvnog seruma povezana s komplikacijama ove bolesti (48,49). Također, nedavno je pokazano da su ukupni plazmatski N-glikani promijenjeni u djece novodijagnosticirane sa šećernom bolesti tipa 1 te da diskriminirajući modeli bazirani na plazmatskom N-glikomu pokazuju veliku sposobnost diferenciranja između novooboljele djece i njihove zdrave braće i sestara s površinom ispod krivulje (AUC, engl. *area under the curve*) preko 0.9 (50). Jedna od izraženije uočenih promjena u toj studiji bila je ona u razinama visoko-manoznih glikana, struktura koje su među plazmatskim proteinima prisutne u manjini. Visoko-manozni glikani u nešto su većim udjelima prisutni na alfa-2-makroglobulinu, imunoglobulinu D i aplipoproteinima (21), dok je komponenta komplementa C3 specifičan plazmatski protein po tome što je okupirana isključivo tom vrstom glikanskih struktura (51). Nadalje, nedavno istraživanje genoma i glikoma u ranoj fazi šećerne bolesti tipa 1 povezalo je N-glikozilaciju plazmatskih proteina s C3 lokusom na kromosomu 19 odgovornim za kodiranje glavnog proteina sustava komplementa – komponente komplementa C3. Ta je studija identificirala dva jednonukleotidna polimorfizma (SNP, engl. *single-nucleotide polymorphism*) ovog lokusa povezana s razinama visoke-manozne Man9 glikanske strukture ukupnih plazmatskih proteina. Man9 glikan prisutan je i na samom C3 glikoproteinu, i to unutar domene odgovorne za njegovu interakciju s patogenima, pa bi stoga promjene u razinama ovog glikana potencijalno mogle utjecati na imunološki odgovor u šećernoj bolesti tipa 1 promijenjenom aktivacijom sustava komplementa (52).

S obzirom na neupitnu ulogu sustava komplementa u razvoju šećerne bolesti tipa 1 i činjenicu da je komponenta komplementa C3 protein glikoziliran visoko-manoznim struktura, upravo bi C3 mogao biti izvor spomenutih promjena N-glikana u krvnoj plazmi.

1.2.2. Komponenta komplementa C3 u šećernoj bolesti tipa 1

Tijekom posljednjih desetljeća, sve je više dokaza koji upućuju na ulogu sustava komplementa u šećernoj bolesti tipa 1. To su genske studije koje pokazuju povezanost alelnih varijanti proteina komplementa sa šećernom bolesti, studije o sposobnosti antitijela stanica otočića da fiksiraju komplement na površini β -stanica gušterače pospješujući njihovo uništenje te studije na životinjama i ljudima koje su potvrdile aktivaciju sustava komplementa u ranoj fazi

patogeneze ove bolesti (30,53,54). Također, nekoliko studija je otkrilo da su serumske koncentracije lektina koji veže manozu (MBL, engl. *mannose binding lectin*) značajno povišene u osoba sa šećernom bolesti tipa 1 (53,55). MBL je okidač jednog od puta aktivacije komplementa, a povećane razine MBL-a u kombinaciji s nekontroliranom hiperglikemijom mogu rezultirati povećanom aktivacijom komplementa te doprinijeti i održavati lokalnu kroničnu upalu i oštećenje tkiva (54,56).

Treća komponenta sustava komplementa - glikoprotein C3, ima središnju ulogu u aktivaciji ovog značajnog sustava. Kao najzastupljeniji protein komplementa u plazmi, C3 ima posebno svestranu ulogu u imunološkom nadzoru održavajući kaskadu komplementa pripravnom, djelujući kao točka konvergencije njezinih aktivacijskih puteva i potičući pojačanje odgovora, vršeći izravne efektorske funkcije i pomažući u koordinaciji nizvodnih imunoloških odgovora (51,57). Poznato je da C3 doprinosi razvoju ŠBT1 pojačavanjem autoimunih upalnih procesa, a prisutnost njegovog aktiviranog oblika u glomerulima i glomerularnim kapilarama životinjskih modela podupire njegovu ulogu u dijabetičkoj nefropatiji (30,58,59). Različite studije na životinjama pokazale su da komponenta komplementa C3 ima izravnu ulogu u streptozotocinom izazvanom autoimunom dijabetesu i da supresorske stanice izvedene iz mijeloida (MDSC, engl. *myeloid-derived suppressor cells*) igraju ulogu u otpornosti na dijabetes u nedostatku komplementa C3 (30,54). Štoviše, longitudinalna studija koja je analizirala 15 polimorfizama komplementa pokazala je značajnu povezanost jedne varijante C3 gena s kliničkom ŠBT1 među visokorizičnim HLA-DR4/4 nositeljima (30,60). Također, kao što je već spomenuto, N-glikom ukupnih plazmatskih proteina u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa nedavno je povezan upravo s C3 lokusom na kromosomu 19 koji kodira tu značajnu komponentu sustava komplementa (52).

1.3. Komponenta komplementa C3

Komponenta komplementa C3 je centralna komponenta urođenog imunološkog sustava koja, zajedno s ostalim proteinima komplementa, čini glavni mehanizam domaćina za detekciju i uklanjanje potencijalnih patogena. C3 je središte aktivacije sva tri aktivacijska puta kaskade komplementa, a s plazmatskim koncentracijama od 1.0 – 1.5 mg/ml ujedno je i najzastupljeniji protein tog sustava. Ovaj jedinstveni imunološki medijator je 185 kDa glikoprotein kodiran lokusom C3 na kromosomu 19, a sastoji se od disulfidno povezanog β (75 kDa) i α (110 kDa) lanca. Sintetizira se u obliku jedinstvenog Pro-C3 prekursora, da bi se onda preveo u pojedinačne lance ograničenom proteolizom (51,57,61,62). Iako se velika većina njegove

biosinteze odvija u jetri (preko 90 %), drugi organi također sudjeluju u tom procesu na lokalnom nivou (61,63). Kao sjecište različitih aktivacijskih putova, C3 osnažuje reakciju komplementa te odrađuje izravne efektorske funkcije s ciljem koordinacije nizvodnih imunoloških odgovora. Iako je njegova glavna uloga zaštita od patogena, posljednjih godina prepoznat je njegov značaj i u raznim homeostatskim procesima u rasponu od regeneracije tkiva do kontrole napredovanja tumorskih stanica. U isto vrijeme, njegov središnji položaj u imunološkom nadzoru čini ga potencijalnim okidačem različitih kliničkih stanja (51).

Sva tri puta aktivacije kaskade komplementa - klasični, preko lektina koji vežu manozu i alternativni - rezultiraju jednim zajedničkim putem u trenutku cijepanja neaktivnog C3 proteina u funkcionalne fragmente C3a i C3b. Manji fragment C3a je anafilotoksin i medijator lokalnog procesa upale, dok je C3b opsonin koji se može kovalentno vezati na bilo koju površinu u neposrednoj blizini mjesta nastanka preko svog reaktivnog tioestera. Ukoliko se ta veza ne formira, vrlo kratkotrajni C3b hidrolizira se i inaktivira u nekoliko milisekundi, ostavljajući inaktiviranu molekulu u plazmi. Taloženje tisuće C3b fragmenata na površini patogena pak olakšava fagocitozu opsoniziranjem ciljne površine. Osim toga, C3b se može povezati s C3 aktivirajućim proteazama u odgovarajuće C5 konvertaze koje zatim kataliziraju stvaranje kompleksa koji napada membranu C5b-9 (MAC, engl. *membrane attack complex*). Ovaj se citotoksični kompleks umeće u lipidne dvosloje membrana, stvarajući pore koje dovode do lize patogena. Glikoproteini na površini stanica domaćina, poput CD46, CD55 i CD59, štite domaćina negativnom regulacijom kaskade komplementa (51,61,64).

S obzirom na temeljnu ulogu komponente komplementa C3 u brojnim esencijalnim biološkim procesima, predvidljivo je da će poremećaj funkcije C3-a rezultirati patološkim stanjima. Ne čudi stoga da je potpuni nedostatak C3 komponente povezan s povećanom osjetljivošću na bakterijske infekcije u ranom djetinjstvu. Razne mutacije koje utječu na njegovu strukturu i svojstva vezanja također su povezane s brojnim bolestima, od senilne makularne degeneracije do C3 glomerulopatije. Nadalje, C3 je kao protein akutne faze uključen u nastanak gotovo svakog upalnog stanja. Povećane razine C3-a i njegovih fragmenata opažene su u brojnim upalama, uključujući neurološke i kardiovaskularne bolesti, pretilost, astmu, rak, parodontitis i odbacivanje transplantata. Također, povećane koncentracije C3-a povezane su i sa šećernom bolesti i inzulinskom rezistencijom (51,65).

1.3.1. N-glikozilacija komponente komplementa C3

Glikanski dio ljudskog C3 glikoproteina predstavlja otprilike 2 % njegove ukupne mase (57). Iako C3 sadrži tri potencijalna mjesta za vezanje N-glikana, samo su dva zauzeta jer se pokazalo da asparagin na poziciji 1595 na α -lancu nije glikoziliran (51,66). Komponenta komplementa C3 je prilično specifična u odnosu na ostale proteine po tome što sadrži isključivo visokomanozne N-glikane. Analiza glikana odvojenih α i β lanaca otkrila je da se na α lancu nalaze glikanske strukture s osam ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) ili devet ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) manoznih jedinica, dok β lanac sadrži strukture sa pet ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$), šest ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$) ili pak sedam ($\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) manoznih podjedinica (57,61,67). Također, na α podjedinici prisutan je i monoglukozilirani glikan $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, što je prvi nalaz takvog glikana na ljudskom serumskom glikoproteinu zdravih osoba (61). Dakle, N-glikanski profil komponente komplementa C3 sastoji se od ukupno šest glikoformi, po tri na svakom glikozilacijskom mjestu. Zanimljivo je da svako glikozilacijsko mjesto sadrži svoj repertoar glikanskih struktura i da nema preklapanja među njima (61,66).

U usporedbi s drugim proteinima komplementa, ovakav isključivo visokomanozni glikanski profil je prilično jedinstven. Velika većina proteina komplementa sintetizira se u hepatocitima pa stoga dijele sličan biosintetski put (68), no ograničena raznolikost glikanskih struktura na C3-u potpuno se razlikuje od ostatka skupine. Najvjerojatnije objašnjenje za ovaj specifični profil N-glikozilacije je učinak lokalne trodimenzionalne proteinske strukture. Vrlo ograničen repertoar glikana sugerira da su glikozilacijska mjesta relativno nedostupna, što se može objasniti sterički ograničenom pristupu enzima i šećernih nukleotida glikanu tijekom njegove biosinteze (61,69). Nadalje, prisutnost monoglukoziliranog $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ N-glikana rijetko se uočava u zrelih glikoproteinima. Naime, prisutnost glukoze na N-glikanskoj strukturi vezanoj na protein glavni je signal kalneksinu i kalretikulinu za zadržavanje takvih glikoproteina u endoplazmatskom retikulumu dok se pravilno ne smotaju (70,71).

Iako je osnovna karakterizacija C3 N-glikanskih struktura već napravljena, metode korištene za njegovo obogaćivanje iz ljudske plazme uključivale su nekolicinu prilično složenih konsektivnih koraka. Uglavnom su takve metode započinjale precipitacijom C3-a polietilen glikolom, da bi se zatim njegova izolacija nastavila kroz par koraka afinitetnih kromatografija i na kraju završila pročišćavanjem gel filtracijom. Ovakve preparativne metode ovise o velikim početnim količinama ljudske krvi i jednostavno nisu prikladne za studije manjih volumena uzoraka kakvi su inače dostupni za dijagnostičke svrhe (72–74). Štoviše, ovakve metode nisu kompatibilne za analizu sa spektrometrijom masa (MS), pa su se stoga oslanjale na korištenje

glikanskih standarada što je jedan od razloga visoke cijene takvih analiza. Osim toga, analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) na razini otpuštenih glikana kakva je rađena u takvim studijama dovodi do gubitka informacija specifičnih za glikozilacijsko mjesto, a razne kontaminacije u vidu ostalih glikoproteina otežavaju interpretaciju rezultata (61,72–75).

1.4. Visoko-protočna analiza N-glikana

Ogromna raznolikost glikanskih struktura dugo je predstavljala ozbiljnu prepreku za njihovu analizu. S obzirom na prepoznatu važnost N-glikana za strukturu i funkcije glikoproteina, pojavila se potreba za robusnim metodama analize N-glikozilacije koje se mogu integrirati sa suvremenom proteomikom. Analizu komplicira već spomenuta inherentna kompleksnost i heterogenost N-glikanskih struktura, pa je strukturno određivanje ovih molekula analitički izazov u usporedbi s drugim biomolekulama. Kao što je već spomenuto, za razliku od linearnih peptida ili nukleinskih kiselina, vrlo ograničen broj monosaharida može tvoriti mnoge stereoizomerne ugljikohidratne strukture. Potpuna strukturna karakterizacija stoga ne uključuje samo identifikaciju monosaharidnog slijeda, već treba odrediti i način njihovog međusobnog vezanja, odnosno njihovu stereokemiju i uzorak grananja (76–78). Istraživanje glikoproteoma tako je zapravo dugo bilo otežano upravo zbog nedostatka metoda za karakterizaciju i kvantifikaciju glikana. Iako su nedavna tehnološka i analitička dostignuća omogućila uspješnu strukturnu karakterizaciju N-glikana, glikomika tek treba ostvariti svoj puni potencijal analizom milijuna ljudi kao što je to učinjeno u području genomike i proteomike (79–81).

Prva glikomska studija provedena prije više od 30 godina analizirala je N-glikane imunoglobulina G u reumatoidnom artritisu i postavila temelje visoko-protočne glikomike (79,82). Prvo veliko istraživanje N-glikoma, usmjereno na N-glikozilaciju ukupnih proteina ljudske plazme, provedeno je prije više od 10 godina (83). U međuvremenu su objavljene stotine studija koje su uključivale tisuće uzoraka i otkrile potencijal N-glikana kao biljega brojnih bolesti (79). Sposobnost pouzdane analize glikoma tisuća uzoraka u razumnom vremenskom roku uz prihvatljivu cijenu preduvjet je za rašireniju analizu glikana u različitim istraživanjima, od temeljnih bioloških studija do onih biomedicinskih i populacijskih usmjerenih na otkrivanje biomarkera. S ciljem detekcije glikomske varijabilnosti potrebno je dakle razvijati visoko-protočne metode visoke reproducibilnosti (79,84).

Već je spomenuto da je heterogenost ključna odlika N-glikana, pa su tako makroheterogenost i mikroheterogenost sastavni aspekti glikozilacije proteina. Makroheterogenost se odnosi na

popunjenost glikozilacijskog mjesta, odnosno na prisutnost ili odsutnost glikana na njemu. Ova razina regulacije uobičajena je među svim posttranslacijskim modifikacijama i nije specifična samo za glikozilaciju. Mikroheterogenost je znatno fascinantniji i kompleksniji aspekt glikozilacije, a odnosi se na činjenicu da pojedinačna glikozilacijska mjesta mogu sadržavati čitav niz glikanskih struktura što onda dovodi do brojnih glikoformi tog određenog glikozilacijskog mjesta, a time i čitavog proteina. Osim same razlike u sastavu glikanskih podjedinica, mikroheterogenosti znatno doprinose i strukturni izomeri kao što su oni konformacijski ili pak oni nastali razlikama u povezivanju (npr. α 2,3- u odnosu na α 2,6-sijalinska kiselina). Mikroheterogenost može varirati od jednog glikozilacijskog mjesta do drugog ili pak može biti donekle ujednačena u određenom glikoproteinu, a poznato je da su varijacije u zastupljenosti glikanskih struktura na pojedinom glikozilacijskom mjestu biološki relevantne (85–87). Za potpunu karakterizaciju glikozilacijskog profila određenog glikoproteina potrebno je dakle odrediti udio svake pojedine glikanske strukture kao i opseg glikozilacije na svakom potencijalnom glikozilacijskom mjestu (77).

Tehnološki napredak u analitičkim metodama i informatici glavni su pokretači dubinske analize glikana i glikoproteina. Spektrometrija masa (MS) pokazala se kao najbolji analitički alat za strukturnu analizu i kvantifikaciju glikana zbog svoje osjetljivosti, specifičnosti, brzine te mogućnosti razlučivanja izomera. Mnoštvo tehnika ionizacije, fragmentacije i detekcije omogućuje identifikaciju glikoproteina, glikozilacijskih mjesta ili pak potpune glikanske strukture (88,89). Tipični postupak glikomske analize temeljene na spektrometriji masa sastoji se od koraka: izolacije ili obogaćivanja proteina iz uzorka; oslobađanja i izolacije glikana; derivatizacije glikana i/ili njihovog razdvajanja kromatografijom (ovaj korak nije obavezan te ovisi o korištenoj MS tehnici); analize glikana spektrometrijom masa; te završava anotacijom glikanske strukture te kvantifikacijom (90). Zbog činjenice da su istraživani glikoproteini često prisutni u relativno malim koncentracijama u plazmi, te da je simultano određivanje peptidne sekvence, glikozilacijskog mjesta i glikanske strukture ionako samo po sebi zahtjevno, metode obogaćivanja i pročišćavanja nužno prethode MS analizi (89).

1.4.1. Obogaćivanje glikoproteina iz bioloških uzoraka lektinima

Mala zastupljenost glikoproteina u biološkim uzorcima i njihova slaba učinkovitost ionizacije ionizacijom elektroraspršenjem predstavljaju glavne izazove u MS analizi glikozilacije proteina. Kako bi se prevladale spomenute prepreke, često se koriste tehnike obogaćivanja glikoproteina iz bioloških uzoraka. Unatoč rastućem interesu za glikobiologiju i znatnim tehnološkim napretkom u spektrometriji masa, važno je naglasiti da i dalje ne postoji

univerzalni protokol za glikansku analizu. Odgovarajući pristupi obogaćivanja glikoproteina osmišljavaju se stoga na temelju glikana od interesa, a najčešće uključuju metode koje se baziraju na afinitetnoj kromatografiji ili pak hidrazidnoj kemiji (85,91,92).

Afinitetna kromatografija je širok pojam za iskorištavanje specifičnih biokemijskih interakcija analita s imobiliziranim ligandima kako bi se obogatila vrste od interesa iz pozadinskih matrica. U glikoproteomici, lektini su desetljećima bili najčešće odabrani ligand afinitetne kromatografije zbog svog specifičnog prepoznavanja ugljikohidrata (85,93). Naime, lektini su specijalizirani proteini izolirani iz različitih biljnih i životinjskih izvora koji vežu ugljikohidrate s različitim afinitetima za specifične glikanske strukture. Dugi niz godina korišteni su za proučavanje interakcija s glikokonjugatima, a trenutno se upravo metode temeljene na lektinima najčešće koriste za izolaciju, obogaćivanje i pročišćavanje glikoproteina i glikopeptida prije MS analize. Ove se tehnike temelje na reverzibilnoj biospecifičnoj interakciji glikoproteina s odgovarajućim lektinom imobiliziranom na čvrstu podlogu. Tijekom godina, različiti lektini s visokom specifičnošću prema odgovarajućim glikanskim strukturama imobilizirani su na agarozu te u svrhu obogaćivanja glikoproteina postali komercijalno dostupni (91,94,95).

Lektini se grupiraju prema svojoj specifičnosti, odnosno prema monosaharidima koje vežu maksimalnim afinitetom. Međutim, lektini unutar određene skupine monosaharidne specifičnosti također se mogu razlikovati svojim afinitetima za različite glikane. Uobičajenu metodu grupiranja lektina prema monosaharidnoj specifičnosti stoga treba koristiti s oprezom jer na pravi način ne odražava složenije specifične determinante koje određeni lektin može prepoznati (2).

Najčešće korišten lektin za obogaćivanje N-glikoproteina je Concanavalin A (Con A), tetramerni protein originalno izoliran iz mahunarke vrste *Canavalia ensiformis*. Lektin je to visoke specifičnosti i umjerenog afiniteta, a preferirano prepoznaje α -manozu te u manjoj mjeri α -glukozu. Zanimljivo je da prepoznaje isključivo N-glikane, dok nije poznato da veže i životinjske O-glikane. Također, N-glikane visoko-manoznog tipa veže s puno većim afinitetom nego biantenarne N-glikane kompleksnog tipa, dok višerazgranate strukture kompleksnog tipa uopće ne uspijeva vezati. Con A zbog svoje dostupnosti, niske cijene, specifičnosti i visokog afiniteta predstavlja idealan odabir za obogaćivanje visoko-manoznih glikoproteina (2,96–98).

1.4.2. Glikoprofiliranje spektrometrijom masa

Od svih analitičkih metodologija rutinski korištenih u analizi glikozilacije proteina, masena spektrometrija (MS) uvelike dominira zbog svoje osjetljivosti i selektivnosti (77). Masena spektrometrija je u svojoj najjednostavnijoj definiciji proizvodnja i detekcija iona karakteriziranih njihovim omjerima mase i naboja (m/z). Detekcija takvih iona rezultira masenim spektrom koji je dijagram relativne zastupljenosti iona kao funkcije njihovog omjera m/z . Trenutno su dvije najčešće korištene MS ionizacijske tehnike za analizu ugljikohidrata matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI) te ionizacija elektroraspršenjem (ESI), koja je obično povezana s tekućinskom kromatografijom. U MALDI-ju se laserskim zračenjem molekula matrice kokristaliziranih s uzorkom generiraju ioni analita, dok su kod ESI-ja uzorci podvrgnuti visokom naponu pa raspršeni u kapljice i desolvatirani u ione (78,88). Obje ove tehnike pripadaju tzv. mekim tehnikama ionizacije koje stvaraju malo ili nimalo fragmenata, pa stoga intaktni molekularni ioni dominiraju u spektru (78). Unatoč tome, kod kompleksnih bioloških uzoraka zbog brojnosti iona može doći i do potiskivanja njihovih signala. Zbog svoje se kompatibilnosti ESI stoga često koristi spregnut s tekućinskom kromatografijom (LC-MS), čime se složena smjesa analita efikasno odvaja i trenutno pojednostavljuje omogućujući učinkovitu detekciju (99). Korištenjem iznimno malih protoka na nanolitarskoj razini (nano-ESI), postiže se iznimno visoka osjetljivost i mala potrošnja uzorka zbog smanjene početne veličine kapljica, pa ne čudi da je ova tehnika iznimno popularna u analizi bioloških uzoraka (89).

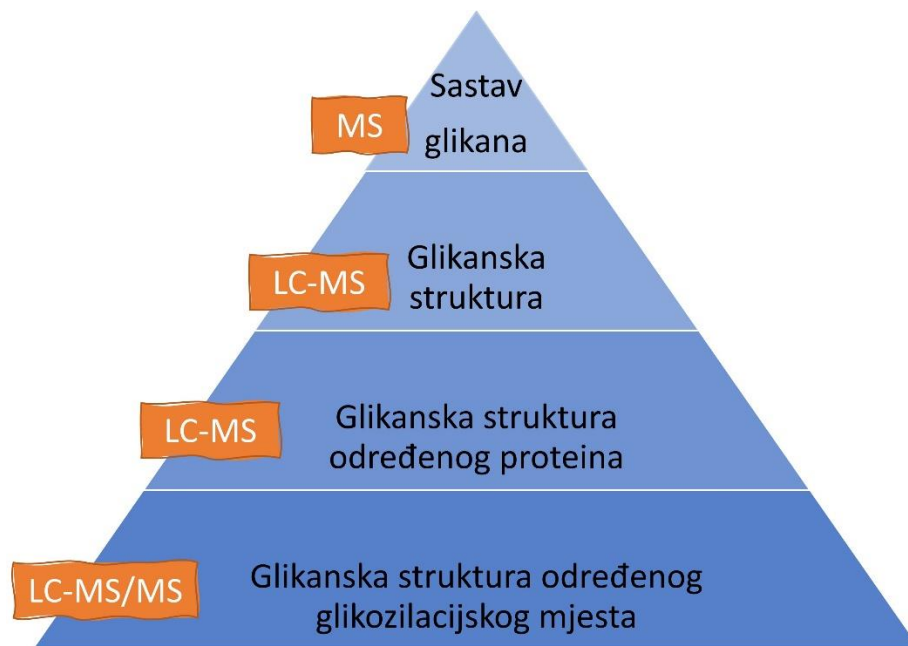
Masena spektrometrija ima nekoliko važnih značajki koje je čine idealnom za glikomske i glikoproteomske analize. Sposobnost pružanja strukturnih informacija o iznimno malim količinama analita dokazuje činjenica da su granice detekcije dosegnule femtomolarne razine što se tiče glikana. Dinamički raspon od tipično 4 ili 5 redova veličine garantira pak opažanje signala s relativnom zastupljenošću od svega 0,01 % (81). Također, korištenjem tandemске masene spektrometrije, različiti glikani mogu se identificirati koristeći masu molekularnog iona zajedno s dijagnostičkim fragmentacijskim ionima, povećavajući tako protočnost glikomske analize i olakšavajući potvrdu strukture (100). Unatoč tome, prisutno je i nekoliko tehničkih izazova povezano s analizom glikoproteina. Kao prvo, hidrofilna priroda glikana smanjuje njihovu učinkovitost ionizacije, što se onda rješava korakom derivatizacije ili obogaćivanja. Osim toga, glikoproteini obično imaju više od jednog glikozilacijskog mjesta uz brojne druge posttranslacijske modifikacije, što uvelike komplicira karakterizaciju potpune glikozilacijske slike glikoproteina. Također, obrade podataka i interpretacija MS/MS spektara zahtijeva

značajnu količinu vremena i iskusne stručnjake, a točni i precizni softverski alati za automatiziranu analizu podataka još su uvijek u povojima (91).

Postoje dvije opće strategije za analizu glikoproteina temeljene na spektrometriji masa. Strategija "odozgo prema dolje" (engl. *top-down*) koristi intaktne glikoproteine koji se izravno podvrgnu MS i tandemskoj MS analizi uz minimalnu pripremu uzorka. Analiza intaktnog glikoproteina omogućuje karakterizaciju različitih proteoformi izoliranog proteina, ali je ograničena po pitanju osjetljivosti i rezolucije različitih glikoformi. Ovakav pristup pruža informacije o vrsti i opsegu glikozilacije, no ograničen je na manje proteine koji nisu pretjerano heterogeni, pa se uspješno koristi u analizi glikoproteina bakterijskih flagela i farmaceutskoj industriji. Druga je strategija "odozdo prema gore" (engl. *bottom-up*), koja se ujedno i najčešće primjenjuje u analizi glikoproteina. Ova strategija uključuje dva uobičajena analitička pristupa: analizu oslobođenih glikana ili pak analizu glikopeptida. N-glikani se iz glikoproteina obično oslobađaju enzimatskim putem korištenjem specifičnih enzima poput peptidne-N-glikozidaze F (PNGaza F), a derivatizacija ugljikohidrata često je neophodna za poboljšanje osjetljivosti MS analize. Ovakav je pristup prilično univerzalan i praktički neovisan o glikoproteinskom izvoru. Za analiza glikopeptida potrebno je pak provesti proteolitičko cijepanje glikoproteina od interesa, nakon čega se digestirani glikopeptidi karakteriziraju spektrometrijom mase. Ovakva analiza čuva specifičnost proteina i glikozilacijskog mjesta čak i kada se analiza provodi u kompleksnim i nedovoljno čistim uzorcima. Međutim, broj i složenost analita u ovakvim analizama zahtijevaju analitičke tehnike visoke osjetljivosti i rezolucije (79,89,101).

Različite razine informacija povezanih s glikozilacijom proteina ilustrirane su na Slici 2 (81). Oslobođeni glikani mogu se detektirati spektrometrijom masa kako bi se dobila informacija o njihovom sastavu, odnosno monosaharidnom slijedu, što je prikazano na vrhu piramide. Većina ranih MS glikanskih analiza bila je usredotočena upravo na monosaharidni sastav profiliranjem glikana prema masi. Ovakvom analizom moguće je utvrditi broj određenih monosaharida u sastavu glikana: broj heksoza (Glc, Gal i Man), *N*-acetilheksozamina (GlcNAc i GalNAc), deoksiheksoze (Fuc) i sijalinskih kiselina (Sia ili NeuAc i NeuGc). Iako su ove informacije ograničene, dovoljne su za promatranje trendova određenog monosaharida u sastavu glikana tijekom otkrivanja potencijalnih biomarkera. Nadalje, glikani se mogu kromatografski razdvojiti kako bi se dobio ukupan glikanski profil, odnosno niz strukturno odvojenih i definiranih glikanskih struktura (Slika 2). Glikanski profili znatno su unaprijedili naše razumijevanje velike lepeze glikanskih struktura iz bioloških uzoraka. Ukoliko prije kromatografskog razdvajanja izoliramo specifičan protein te oslobodimo samo njegove glikane,

LC-MS metodom dobivamo glikanski profil točno određenog proteina. Da bi pak informacija o glikozilacijskom mjestu ostala očuvana, potrebno je provesti analizu glikopeptida (Slika 2) (81).



Slika 2. Razine informacija o glikozilaciji proteina. Prilagođeno prema (81).

1.4.3. Analiza N-glikopeptida

Iako analiza oslobođenih glikana omogućuje određivanje strukture i sastava glikana te razumijevanje njihove heterogenosti unutar određenog glikoproteoma, ona je ograničena gubitkom informacija o glikozilacijskom mjestu vezanog glikana. Eliminacijom ove lokalizacijske informacije nijedan se glikan ne može povezati sa svojim mjestom vezanja bez intenzivne eksperimentalne kontrole. Sveobuhvatna karakterizacija glikoproteina stoga se oslanja na analizu intaktnih glikopeptida, zadržavajući pritom podatke specifične za mjesto. Budući da je N-glikozidna veza očuvana, analiza na razini glikopeptida istovremeno otkriva informacije i o peptidnoj sekvenci glikozilacijskog mjesta i o samom glikanu. Iako tradicionalno ograničena zbog niske zastupljenosti glikopeptida unutar biološkog uzorka i njihove slabe učinkovitosti ionizacije u odnosu na peptide, analiza glikopeptida dobila je strelovit uzlet nedavnim napretkom u tehnikama pripreme uzoraka, strategijama obogaćivanja te tehničkim mogućnostima samih instrumenata. Ovakav sveobuhvatan pogled na makroheterogenost i mikroheterogenost određenog glikoproteina olakšava razjašnjavanje uloge pojedinih glikoformi u fiziološkim, ali i patofiziološkim procesima (102).

Tandemska MS analiza spregnuta sa tekućinskom kromatografijom (LC-MS/MS) trenutno je najčešća i najmoćnija analitička platforma za analizu glikozilacije proteina na razini glikopeptida. Potpuna karakterizacija glikopeptida uključuje identifikaciju peptidne sekvence na kojem se nalazi mjesto glikozilacije kao i karakterizaciju sastava glikana. Sama karakterizacija započinje tako da se sa sigurnošću odredi odgovaraju li signali u masenom spektru glikopeptidima. Nakon te inicijalne provjere potrebno je identificirati peptidni dio, a zatim i glikanski dio glikopeptida, te sve potvrditi fragmentacijskim podacima. Ovim pristupom stoga dobivamo informaciju o utvrđenoj glikanskoj strukturi vezanoj na točno određenom glikozilacijskom mjestu (103,104).

Analiza glikopeptida uglavnom započinje obogaćivanjem glikoproteina od interesa iz kompleksnog biološkog uzorka kako bi se riješio problem njegove male zastupljenosti. Već je spomenuto da je jedan od najčešćih pristupa obogaćivanje afinitetnom kromatografijom korištenjem lektina koji specifično prepoznaju glikane od interesa. Nakon toga slijedi korak denaturacije glikoproteina, čime se omogućuju optimalni uvjeti za proteolizu koja slijedi. Najčešće se provodi specifična enzimatsku proteoliza glikoproteina enzimima koji cijepaju protein na točno određenim aminokiselinama, omogućujući svojom selektivnošću i visokom aktivnošću robusno predviđanje peptidne sekvence. Definitivno najkorišteniji enzim u glikoproteomici je tripsin, no odabir enzima uvelike ovisi o samom glikoproteinu od interesa, odnosno o željenoj veličini peptida. Budući da su u novonastaloj smjesi glikopeptidi u manjini, te da peptidi uzrokuju supresiju njihove ionako slabe učinkovitosti ionizacije, nakon digestije se uglavnom provodi obogaćivanje glikopeptida, za što se može koristiti ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, engl. *solid phase extraction*) ili pak online pristupi (81,103,105,106). Finalno, analiza obogaćenih glikopeptida najčešće se provodi tekućinskom kromatografijom obrnutih faza spregnutoj sa spektrometrijom masa ionizacijom elektroraspršenjem (RP-LC-ESI-MS, engl. *reverse phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*). Separacija glikopeptida odvija se na C18 koloni pa retencija ovisi o peptidnoj okosnici i može se predvidjeti iz aminokiselinske sekvence, dok glikanski dio ima samo mali utjecaj na interakciju između kolone i glikopeptida. Identifikacija glikopeptida u nepoznatim uzorcima uvelike je potpomognuta njihovom fragmentacijom, dok se karakterizacija glikopeptida poznatog glikoproteina više oslanja na retencijsko vrijeme, odgovarajuću masu i izotopni profil (79,81).

1.5. Obrazloženje istraživanja

Poznato je da promjene u N-glikozilaciji proteina mogu modulirati upalne odgovore, kao i to da su N-glikani dokazano promijenjeni u brojnim patofiziološkim stanjima. Na N-glikanske biljege stoga se sve češće gleda kao na odličan dijagnostički i prognostički alat čiji se puni potencijal tek treba razviti. Nedavne glikozilacijske studije bavile su se među ostalima i šećernom bolesti tipa 1 te je N-glikom ukupnih plazmatskih proteina potvrđen kao bitan čimbenik u njoj patofiziologiji. Ove su studije pokazale da je N-glikanski profil plazmatskih proteina promijenjen u mladoj populaciji na samom početku šećerne bolesti tipa 1 te da je u odrasloj populaciji povezan s komplikacijama ove bolesti. Te su studije promatrale N-glikozilaciju ukupnih plazmatskih proteina, čime je dobivena informacija o promjeni zastupljenosti pojedinih N-glikanskih struktura u odnosu na sve ostale N-glikanske strukture prisutne u plazmi. Među ostalima, jedna od uočljivijih promjena zastupljenosti u šećernoj bolesti tipa 1 pogađa visoko-manozne glikanske strukture. Ove glikanske strukture dominantno bi mogle potjecati s komponente komplementa C3, glikoproteina koji se od ostalih proteina plazme razlikuje svojim isključivo visoko-manoznim glikanskim strukturama vezanima na proteinsku okosnicu. Osim toga, prva genetska asocijacijska studija N-glikoma u šećernoj bolesti tipa 1 povezala je upravo C3 gen koji kodira istoimeni protein s visoko-manoznim Man9 glikanom u plazma N-glikomu.

Unatoč spoznajama o uključenosti komplementa i N-glikana u nastanak šećerne bolesti tipa 1, N-glikozilacija C3 komponente komplementa i dalje je slabo istražena. Jedan od razloga tomu je i nedostatak odgovarajućih analitičkih metoda za istraživanja velikog broja uzoraka malog volumena. Iako je N-glikanski profil C3-a poznat, dostupni analitički protokoli prikladni su samo za ograničeni broj uzoraka velikog volumena. S obzirom na sve navedeno, u sklopu ovog doktorskog rada razvijena je metoda za visokoprotlačnu analizu N-glikozilacije C3 glikoproteina te iskorištena za identifikaciju struktura povezanih s nastankom šećerne bolesti tipa 1 kao i razvojem njezinih komplikacija.

Kako je analiza glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina podložna utjecaju koncentracije proteina u plazmi, promjene uočene u prethodnim studijama ne moraju biti nužno povezane sa samom promjenom glikanskih profila pa takve analize ne mogu omogućiti identifikaciju porijekla pojedine glikanske strukture. Tim je pristupom stoga funkcionalno istraživanje uloge pojedinog glikoproteina u patofiziologiji određene bolesti onemogućeno. Visokoprotlačna metoda za analizu C3 N-glikanskih profila nadilazi ova ograničenja te omogućuje uvid u patofiziološku podlogu uključenosti na razini samo jednog proteina. Ova razina informacija

rezultirala bi novim spoznajama o mehanizmu nastanka bolesti kao i o samom procesu glikozilacije, te omogućila potragu za novim terapijskim metama.

Identifikacijom glikopeptida ljudske C3 komponente komplementa povezanih s nastankom šećerne bolesti tipa 1 kao i razvojem komplikacija ove bolesti omogućila bi se buduća evaluacija njihova dijagnostičkog i prognostičkog potencijala. Pronalazak glikanskih struktura prisutnih na C3 glikoproteinu koje ukazuju na povećan rizik razvoja šećerne bolesti tipa 1 i pratećih komplikacija olakšalo bi pravovremenu dijagnostiku ove bolesti, time značajno unaprijedivši i samu kvalitetu života pacijenata. Zaključno, razvoj metode za visokoprotočnu analizu N-glikozilacije ljudskog C3-a omogućio bi istraživanje glikozilacije ovog proteina na velikom broju uzoraka u budućim studijama raznih bolesti.

2. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI

2.1. Ispitanici

U sklopu ovog doktorskog rada korištene su tri različite populacije ispitanika. Prvoj populaciji pripadaju zdravi ispitanici čiji su uzorci krvne plazme korišteni za utvrđivanje temporalne stabilnosti C3 N-glikoma pri fiziološkim uvjetima, što je jedan od preduvjeta za primjenu C3 glikopeptida kao biljega bolesti. Nakon što se C3 N-glikom u zdravoj populaciji pokazao stabilan, njegov diferencijalni potencijal ispitan je u druge dvije populacije ispitanika.

Drugoj populaciji pripadaju ispitanici s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1, dok su kao kontrolna skupina služili njihova zdrava braća i sestre. U toj je studiji uspoređena zastupljenost pojedinih glikopeptida C3 glikoproteina između djece i mladih s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 i njima odgovarajućih kontrola iste genetske pozadine. Trećoj populaciji pripadaju odrasle osoba sa šećernom bolesti tipa 1 s različitim stupnjem najčešćih komplikacija ove bolesti (retinopatija i albuminurija), a N-glikanski profili C3 glikoproteina uspoređeni su između različitih stadija navedenih komplikacija.

Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju u svim su studijama potpisali ispitanici, njihovi roditelji ili skrbnici. Sve studije odobrene su od strane pripadajućih etičkih povjerenstava: Danskog Etičkog povjerenstva, etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te etičkog povjerenstva Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

2.1.1. Ispitanici za utvrđivanje temporalne stabilnosti C3 N-glikoma

U ovom dijelu istraživanju sudjelovalo je četrnaest zdravih muških studenata kineziologije (dob $19 \pm 0,7$ godina). Prije uključivanja u studiju svim je ispitanicima utvđeno odsustvo kardiovaskularnih bolesti, ozljeda mišića ili pak kontinuiranih medicinskih tretmana. Ispitanicima je naloženo da se suzdrže od konzumacije alkohola i cigareta, kao i od suplementacije antioksidansima tijekom studije. Uzorci krvi su uzeti od svakog sudionika u tri vremenske točke: prilikom uključivanja u studiju, te nakon 6 i nakon 10 tjedana. Krv je skupljena u EDTA vakuumske epruvete iz antekubitalne vene. Epruvete s EDTA odmah su centrifugirane na 1370 g tijekom 10 minuta kako bi se odvojili eritrociti od plazme. Nakon toga, plazma je podijeljena u niz alikvota od 1 ml i pohranjena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

2.1.2. Ispitanici s novodijagnosticiranom ŠBT1 i njihova zdrava braća i sestre

Za ovaj dio istraživanja koristili su se uzorci krvne plazme 61 ispitanika (medijan dobi 10 godina, dobni raspon 1-16 godina) prikupljeni putem DanDiabKids registra unutar tri mjeseca

od dijagnoze šećerne bolesti tipa 1. Putem istog registra prikupljeni su i uzorci krvne plazme 84 njihovih zdravih braće i sestara (medijan dobi 11 godina, dobni raspon 4-22 godina). Uključni kriterij za zdrave srodnike bila je dostupnost uzorka krvne plazme biološkog srodnika dijagnosticiranog sa šećernom bolesti tipa 1. Svakom ispitaniku uzeti su uzorci krvne plazme te zabilježeni klinički podaci (dob, spol). Za neke ispitanike, više zdravih braće i sestara je bilo uključeno u studiju (od 1 do 4 po oboljeloj osobi), ali za većinu slučajeva bio je dostupan uzorak samo jednog zdravog srodnika. Godina uzorkovanja kretala se od 1997. do 2000., a posljednje vađenje podataka iz registra i provjera statusa bolesti provedeno je u siječnju 2019. godine. Ukupno je uključeno 145 ispitanika iz 61 obitelji (Tablica 1).

Tablica 1. Deskriptivni podaci ispitanika s novodijagnosticiranom ŠBT1 i kontrolne skupine

	ŠBT1	Kontrolna skupina
Broj ispitanika (N)	61	84
Dob (godine)	10 (1-16)	11 (4-22)
Ženski spol (N, %)	29 (47.5 %)	39 (46.4 %)

2.1.3. Ispitanici sa ŠBT1 s različitim stupnjem komplikacija bolesti

Za ovaj dio istraživanja koristilo se 189 uzoraka krvnog seruma prikupljenih u Sveučilišnoj klinici za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma Vuk Vrhovac Kliničke bolnice Merkur. Studija je uključivala ispitanike sa šećernom bolesti tipa 1 u dobi između 18 i 70 godina (medijan dobi 46 godina), na odgovarajućoj terapiji. Šećerna bolest tipa 1 definirana je početkom simptoma prije 35. godine života, pozitivnim autoantitijelima i trajnom terapijom inzulinom započetom unutar 12 mjeseci nakon dijagnoze. Osim uzimanja krvnog seruma, provedeni su biokemijski testovi (CRP, serumska glukoza natašte, bubrežna funkcija i lipidni profil), a prikupljena su i antropometrijska mjerenja. Krvni tlak mjeren je dva puta u sjedećem položaju živinim tlakomjerom nakon odmora od 10 minuta. Serumna glukoza je mjerena enzimskom kolorimetrijskom metodom. Albumin u urinu i hemoglobin A1c (HbA1c) izmjereni su spektrofotometrijski turbidimetrijskim imunoinhibicijskim testovima. HbA1c rezultati izraženi su u DCCT ekvivalentu (%). Podaci o razinama kreatinina u serumu, dobi, spolu i rasi korišteni su za izračun eGFR-a pomoću CKD-EPI formule. Hipertenzija je definirana kao krvni tlak jednak ili veći od 140/90 mmHg. Svim je ispitanicima evaluiran status najčešćih komplikacija šećerne bolesti tipa 1: albuminurije i retinopatije. Nakon inicijalne procjene, ispitanici su podijeljeni u tri kategorije s obzirom na status komplikacije: bez ili s početnim

komplikacijama (1), umjerene komplikacije (2) i teške komplikacije (3). Kategorije albuminurije izračunate su na temelju brzine izlučivanja albumina u mokraći (AER), sa sljedećim kriterijima: < 30 mg/24 h (1); 30 - 300 mg/24 h (2); > 300 mg/24 h (3). Status retinopatije procijenjen je na temelju nalaza okulističkog pregleda, sa sljedećim kategorijama: nema retinopatije (1); neproliferativna retinopatija (2); proliferativna retinopatija (3).

Tablica 2. Deskriptivni podaci ispitanika. Podaci su prikazani medijanima i interkvartilnim rasponom za kontinuirane varijable te brojem i postocima za kategorijske varijable.

Broj ispitanika (N)	189
Spol (N)	
Muški	82 (43 %)
Ženski	107 (57 %)
Dob (godine)	
	46 (33-56)
Trajanje ŠBT1 (godine)	
	14 (7-23)
HbA1c (%)	
	7.5 (6.6-8.3)
Albuminurija (N)	
1	25 (14 %)
2	154 (82 %)
3	8 (4 %)
Retinopatija (N)	
1	150 (79 %)
2	28 (15 %)
3	11 (6 %)
Pušenje (N)	
Nepušači	131 (70 %)
Pušači	57 (30 %)
Hipertenzija (N)	
Ne	137 (72 %)
Da	52 (28 %)
eGFR(mL/min/1.73 m2)	
	98 (89-111)
Glukoza natašte (mmol/L)	
	7.7 (5.7-9.6)
Glukoza postprandijalno(mmol/L)	
	11.55 (8.40 - 14.78)

2.2. Metode

2.2.1. Eksperimentalni dizajn

Visokoprotlačna metoda za analizu glikozilacije komponente komplementa C3 razvijena je i optimizirana korištenjem standarda ljudske plazme napravljenog od skupnih uzoraka plazme ispitanika korištenih za ispitivanje temporalne stabilnosti C3 N-glikoma. Ponovljivost metode određena je izračunom koeficijenta varijacije (CV) osam tehničkih replikata spomenutog standarda plazme. Ponovljivost između dana procijenjena je korištenjem oktaplikata dobivenih trima uzastopnima pripremanja uzoraka iz tjedna u tjedan. Ponovljivost metode validirana je unutar i između dana za sve analizirane glikoforme. Tijekom testiranja osjetljivosti metode, komponenta komplementa C3 je u triplikatu obogaćen iz sljedećeg niza početnih volumena skupnog standarda plazme: 10, 5, 2.5 i 1 μ l. Sve glikoforme identificirane i ručno potvrđene iz skupnog standarda plazme uključene su u analizu podataka u kasnijim studijama. Ekstrahirani signali su zbrojeni i normalizirani na ukupnu integriranu površinu po glikozilacijskom mjestu kako bi se uklonile varijacije u intenzitetu signala između uzoraka, što je omogućilo njihovu usporedbu. Prije same analize, svi su uzorci nasumično raspoređeni na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica korištenjem programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp) i R programskog jezika (verzija 4.0.5).

2.2.2. Obogaćivanje C3 glikoproteina iz ljudske plazme

C3 glikoprotein je iz uzoraka ljudske plazme obogaćen korištenjem lektina Concanavalin A (Con A). Con A-Sepharose 4B (Global Life Sciences Solutions) medij u volumenu od 10 μ l stavljen je u polipropilensku filter pločicu s 96 jažica te predkondicioniran tri puta s puferom za vezanje (20 mM Tris, pH 7.4, 0,5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂). Uzorci plazme volumena 10 μ l razrijeđeni su s 90 μ l pufera za vezanje, nanoseni na kondicionirani lektinski medij i inkubirani preko noći na 4 °C uz lagano miješanje (107). Nakon ispiranja lektinskog medija tri puta s 200 μ l pufera za vezanje, glikoproteini su eluirani s 200 μ l pufera za eluiranje (200 mM metil α -D-manopiranozid) u 0.1 M octene kiseline, pH 3.0. Ispiranje je provedeno na vakuuskom kolektoru, a eluiranje je odrađeno petominutnim centrifugiranjem pri maloj brzini. Eluati glikoproteina su odmah osušeni u SpeedVac vakuuskom koncentratoru i pohranjeni na -20 °C do digestije.

Tijekom testiranja osjetljivosti metode, C3 glikoprotein je obogaćen iz 10, 5, 2.5 i 1 μ L skupnog standarda ljudske plazme, sve u triplikatu. Svaki uzorak je podešen na isti početni volumen (10 μ L) s puferom za vezanje i svi reagensi za obogaćivanje dodani su u jednakim količinama.

2.2.3. Denaturacija glikoproteina i Glu-C proteoliza

Osušeni uzorci glikoproteina resuspendirani su i denaturirani inkubacijom s 48 μl 15 % (v/v) 2-propanola u 0.1 M amonijevom bikarbonatu na 60 °C tijekom 10 minuta (108). Za proteolizu je u svaki uzorak dodano 2 μl endoproteinaze Glu-C koncentracije 0.5 U/ μl u omjeru proteaza:protein 1:50 (w/w). Pločica s uzorcima zapečaćena je termo folijom te inkubirana 18 h na 37 °C. Za test osjetljivosti svi su reagensi za denaturaciju i digestiju dodani u jednakim količinama.

2.2.4. Obogaćivanje glikopeptida ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Nakon završetka digestije, glikopeptidi su od peptida pročišćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi pomoću tekućinske kromatografije temeljene na hidrofилnim interakcijama (HILIC-SPE, engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography - solid phase extraction*). Postupak je proveden korištenjem Chromabond HILIC zrnaca silicijevog dioksida (109). Suspenzija HILIC zrnaca u koncentraciji od 50 mg/ml najprije je pripravljena u 0,1 % (v/v) TFA na magnetskoj miješalici, te je 100 μl suspenzije dodano u svaku jažicu polipropilenske filter pločice. Na vakuumskom kolektoru sve su jažice isprane dva puta s 250 μl 0,1 % TFA (v/v) te zatim kondicionirane s dva puta po 250 μl 0,1 % TFA u 90 % acetonitrilu (ACN) (v/v). Uzorci su razrijeđeni s 450 μl 0,1 % TFA u ACN-u do konačne koncentracije od 90 % ACN-a i nanoseni na predkondicionirana zrnca. Nevezane nečistoće dvaput su isprane s 250 μl 0,1 % TFA u 90 % ACN. Obogaćeni glikopeptidi eluirani su s 200 μl 0,1 % TFA u čistu mikrotitarsku pločicu centrifugiranjem pri maloj brzini. Eluati su odmah osušeni u vakuumskom koncentratoru SpeedVac i pohranjeni na -20 °C do analize.

2.2.5. Nano-LC-ESI-MS(/MS) analiza obogaćenih glikopeptida

Analiza glikopeptida provedena je na nano-LC sustavu ACQUITY UPLC M klase (Waters) povezanog s Compact Q-TOF spektrometrom masa (Bruker Daltonik GmbH). Razdvajanje se temeljilo na tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza spregnutoj sa spektrometrom masa ionizacijom elektroraspršenjem (RP-LC-ESI-MS, engl. *reverse phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*). Primijenje je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*, UPLC), a nano-LC sustav spojen je na MS pomoću izvora CaptiveSpray podržanog tehnologijom nanoBooster. Osušeni glikopeptidi resuspendirani su u 20 μl ultračiste vode i razrijeđeni tri puta prije nanošenja na trap C18 kolonu Acclaim PepMap (5 \times 0.3 mm, 5 μm , 100 Å). Na trap koloni analiti su pročišćeni 3 minute s 0.1 % mravlje kiseline (FA) (v/v) pri brzini protoka od 40 $\mu\text{l}/\text{min}$

i zatim prebačeni na analitičku kolonu. Prije injektiranja svakog pojedinog uzorka, trap stupac je ispran s 20 μ l izopropanola i acetonitrila u volumnom omjeru 25:75, a zatim istim volumenom 95 % acetonitrila.

Postavke kromatografske i MS analize malo su modificirane između ispitivanih populacija. Kod uzoraka korištenih za ispitivanje temporalne stabilnosti C3 N-glikoma, kao i uzoraka ispitanika novodijagnosticiranih sa ŠBT1 i njihovih zdravih srodnika, odvajanje glikopeptida provedeno je na temelju njihove peptidne okosnice na HALO C18 koloni (150 \times 0,1 mm, 2.7 μ m). Temperatura kolone postavljena je na 30 °C, a brzina protoka na 1 μ l/min. Gradijent je započeo s 0 % otapala B (0.1 % FA u 80 % ACN, v/v) i 100 % otapala A (0.1 % FA, v/v) i povećan je s 0 % na 25 % B tijekom prvih 3.5 minuta i održavan na 25 % još 1.5 min. Tijekom sljedećih 10 minuta, otapalo B je dodatno povećano na 36 %, završavajući sa šestominutnim ispiranjem sa 100 % otapala B i ukupnim trajanjem gradijenta od 21 min. Nakon razdvajanja, kolona je ekvilibrirana sa 100 % otapala A tijekom 6 minuta.

Što se tiče uzoraka ispitanika sa ŠBT1 s različitim stupnjem komplikacija bolesti, odvajanje glikopeptida provedeno je na koloni SunShell C18 (150 \times 0.1 mm, 2.6 μ m). Temperatura kolone postavljena je na 30° C, dok je brzina protoka bila 1 μ L/min. Gradijent je povećan s 0 % na 16 % otapala B (0.1 % FA u 80 % ACN, v/v) tijekom prvih 3.5 minuta i držan na 16 % još 1.5 min. Tijekom sljedećih 10 minuta otapalo B je dodatno povećano na 27 %, završavajući šestominutnim ispiranjem sa 100 % otapala B i ukupnim gradijentom od 21 min.

Analiza spektrometrijom masa za sve je uzorke provedena u pozitivnom načinu rada instrumenta s prosjekom brzine snimanja spektara od 2 \times 0.5 Hz. Napon kapilare je postavljen na 1.5 kV, a temperatura plina za sušenje bila je 150 °C pri protoku od 4 l/min. Plin za raspršivanje pojačan s acetonitriлом doveden je pod tlakom od 0.2 bara. i u. Kod uzoraka korištenih za ispitivanje temporalne stabilnosti C3 N-glikoma, kao i uzoraka ispitanika novodijagnosticiranih sa ŠBT1 i njihovih zdravih srodnika, snimanje spektara provedeno je u m/z rasponu od 200 do 2000, dok je kod uzoraka ispitanika sa ŠBT1 s različitim stupnjem komplikacija bolesti snimanje spektara provedeno u m/z rasponu od 600 do 2000.

Nano-LC-MS sustav u svim je analizama kontroliran računalnim programima otofControl, MassLynx i Compass HyStar (svi v.4.1).

2.2.6. Anotacija C3 glikopeptida

Za anotaciju C3 glikopeptida i njihovu MS/MS strukturnu karakterizaciju korištene su gore navedene MS postavke korištene za analizu temporalne stabilnosti N-glikoma, uz neke

modifikacije. Fragmentacijski spektri glikopeptida snimljeni su postupno kolizijskim energijama u rasponu od 17 do 40 eV, linearno ovisno o stanju naboja i m/z vrijednosti odabranog prekursora. Ove su vrijednosti primijenjene za 20 % MS/MS događaja i udvostručene za preostalo vrijeme kako bi se odjednom dobili i glikanski i peptidni specifični fragmenti (110). Tri najveća prekursor iona u svakom spektru automatski su odabrana, a izolacijski prozori postavljeni su na zadane vrijednosti ovisno o m/z vrijednosti prekursora. Dodatna fragmentacija glikopeptida s ciljem potpune karakterizacije njihove strukture provedena je na spektrometru masa Orbitrap Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific), sa sljedećim parametrima snimanja: rezolucija 60 000, m/z raspon od 600 do 2000, rezolucija snimanja ovisnog o podacima 45 000, s HCD (engl. *higher collisional dissociation*) kolizijskom energijom postavljenom na 15 %.

Glikopeptidi komponente komplementa C3 manualno su anotirani korištenjem MS i MS/MS spektara generiranih u načinu snimanja ovisnom o podacima (engl. *data-dependant acquisition*). Popis očekivanih C3 glikoformi na pojedinom glikozilacijskom mjestu priređen je na temelju dostupnih podataka iz literature (57,61,67). Očekivane glikoforme asignirane su na temelju njihove m/z vrijednosti izračunate za višestruko nabijene protonirane ione i zatim potvrđene uporabom fragmentacijskih MS/MS spektara. Za ručno tumačenje fragmentacijskih spektara korišteni su Compass DataAnalysis (v.4.1) i GlycoWorkbench 2.0 (111), pri čemu se potonji koristi pod licencom besplatnog softvera. Tijekom postupka anotacije uzeti su u obzir svi literaturni podaci o N-glikanskim strukturama na C3 glikoproteinu, kao i sve potencijalne opasnosti anotacije temeljene na MS-u. Sumirani maseni spektri klastera pojedinog glikozilacijskog mjesta ručno su pretraženi za potencijalne dodatne glikoforme, dok su s istim ciljem pretraženi svi MS/MS spektri za glikopeptidne dijagnostičke ione kao što je GlcNAc₁Man₁.

2.2.7. Proteomska analiza podataka

Za procjenu učinkovitosti razvijenog protokola za obogaćivanje komponente komplementa C3 i identifikaciju ostalih obogaćenih glikoproteina u Con A eluatu, provedena je proteomska analiza pomoću MaxQuant računalnog programa (verzija 1.6.10.43). Za analizu je korišten humani referentni proteom (verzija izdanja: 2019_07, ProteomeID: UP000005640) koji sadrži 75 069 unosa sekvenci proteina preuzet s Uniprota. U postavkama analize, vrsta instrumenta postavljena je na Bruker Q-TOF. Svi su parametri analize ostavljeni na zadanim postavkama, osim tolerancije pretraživanja prvog peptida koja je postavljena na 0.1 Da. Tolerancija

pretraživanja glavnog peptida ostavljena je na 0.006 Da, a tolerancija pretraživanja mase fragmenata postavljena je na zadanu vrijednost od 50 ppm. Za enzim je odabran GluC, uz maksimalno dva promašena cijepanja. Stopa otkrivanja lažno pozitivnih rezultata postavljena je na 1 %. Kao varijabilne modifikacije postavljeni su oksidacija, acetilacija i karbamidometilacija. Korištenjem podataka razine MS¹, identificirani proteini su kvantificirani zbrajanjem ekstrahiranih ionskih kromatograma svih izotopskih klastera povezanih s pojedinom peptidnom sekvencom. Relativna zastupljenost svakog identificiranog proteina izražena je kao postotak ukupnog intenziteta.

2.2.8. Temporalna stabilnost C3 N-glikoma

Kako bi se procijenila temporalna stabilnost C3 N-glikoma kod zdravih osoba u fiziološkim uvjetima, 14 zdravih mladih muških osoba uzorkovani su u tri vremenske točke: na početku studije, te nakon 6 i 10 tjedana. Nakon uzorkovanja, sakupljeni uzorci analizirani su novorazvijenom metodom za analizu glikozilacije komponente komplementa C3. Vremenska stabilnost procijenjena je određivanjem intraindividualnog i interindividualnog CV-a svake pojedine C3 glikoforme. Intraindividualni CV određen je iz longitudinalnih uzoraka svakog ispitanika, dok je interindividualni CV izračunat iz uzoraka svih ispitanika unutar pojedine vremenske točke. Prethodno procijenjena unutarlaboratorijska ponovljivost metode unutar jednog dana poslužila je kao CV same metode.

2.2.9. Ekstrakcija i obrada glikoproteomskih podataka

Ekstrakcija i obrada podataka provedena je pomoću LaCy Tools računalnog programa (v.1.0.1, b.9) koji radi pod licencom besplatnog softvera (112). Prije kvantifikacije glikoproteomskih podataka, izvorne datoteke prvo su pretvorene u mzXML format pomoću alata ProteoWizard MSConvert (verzija 3.0.19208) (113). Kromatogrami su međusobno poravnati na temelju retencijskog vremena pet najzastupljenijih glikopeptidnih signala, te je ciljana integracija provedena na trostruko, četverostruko i peterostruko nabijenim ionima analita. Integracija je provedena na temelju prethodno potvrđenih C3 glikoformi, s tim da su spektri integrirani tako da uključuju najmanje 90 % teorijske izotopne razdiobe. Parametri kontrole kvalitete ekstrahiranih podataka uključivali su preciznost mase, odstupanje od teorijske izotopne razdiobe i omjer signala i šuma, te su automatski izračunati za svaki analit svakog uzorka. Kvaliteta podataka za pojedini glikopeptid procijenjena je na temelju prosječnih vrijednosti parametara kontrole kvalitete izračunatih iz svih analiziranih uzoraka, i to za svaku glikoformu i stanje naboja posebno. Kriteriji uključivanja postavljeni su kako slijedi: odstupanje točnosti

mase ispod 100 ppm, odstupanje od teorijske izotopne razdiobe ispod 25 %, te omjer signala i šuma iznad 8. Što se tiče uzoraka ispitanika sa ŠBT1 s različitim stupnjem komplikacija bolesti, odstupanje točnosti mase provedeno je s limitom od 40 ppma, dok su svi ostali parametri ostali isti. Za svaku pojedinu C3 glikoformu samo su stanja naboja u skladu s navedenom kvalitetom podataka zbrojena i kvantificirana. Sumirani signali su zatim normalizirani u odnosu na ukupnu integriranu površinu pojedinog glikozilacijskog mjesta kako bi se uklonile varijacije u intenzitetu signala između uzoraka te omogućila njihova međusobna usporedba.

S ciljem dobivanja što točnijih i pouzdanijih mjerenja, varijacije u laboratorijskim uvjetima tijekom pripreme uzoraka i same analize svedene su na minimum provođenjem korekcije na razlike u serijama (engl. *batch correction*). Normalizirani signali su s ciljem dobivanja normalne distribucije prvo logit-transformirani, nakon čega su mjerenja skupno korigirana metodom ComBat (R paket „sva“) (114). Laboratorijski izvor varijacije odražava se na mikrotitarskoj pločici, pa je redni broj pločice modeliran kao kovarijat serije. Procijenjeni učinci serije zatim su oduzeti od logit-transformiranih mjerenja smanjujući uvedeni eksperimentalni šum, te nakon korekcije vraćeni iz logit-transformiranog oblika.

2.2.10. Statistička obrada podataka

Procjena povezanosti novodijagnosticirane šećerne bolesti tipa 1 i C3 N-glikoma provedena je pomoću linearnog mješovitog modeliranja s logit-transformiranom normaliziranom površinom glikoforme kao zavisnom varijablom i prisutnošću ŠBT1 kao nezavisnom varijablom. Kako bi se uklonio učinak dobnih i spolnih razlika između ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 i kontrolne skupine, te su varijable uključene kao dodatni kovarijati. Štoviše, s obzirom na genetsku sličnost ispitanika sa ŠBT1 i njihovih zdravih srodnika, braća i sestre iz iste obitelji grupirani su te je njihov obiteljski ID uključen kao konstantni odsječak. Rezultati su prikazani kao omjeri izgleda (OR, engl. *odds ratio*) ŠBT1 naspram kontrole za svaku pojedinu glikoformu. S obzirom na više provedenih testova, stopa lažno pozitivnih rezultata (FDR, engl. *false discovery rate*) kontrolirana je Benjamini–Hochbergovom metodom s p-vrijednošću koja se smatra značajnom manjom od 0.05 (115).

Nakon toga, ispitan je potencijal N-glikanskog profila C3 glikoproteina za diferenciranje pojedinaca sa šećernom bolesti tipa 1 od njihove zdrave braće i sestara. Diferencirajući potencijal C3 N-glikoma procijenjen je na svim ispitanicima korištenjem prediktivnih modela dobivenih modeliranjem logističke mješovite regresije elastične mreže (engl. *logistic mixed model elastic net regression*). Prije treninga na podacima i validacije modela, parametar

regularizacije alfa postavljen je na 1, dok je lambda optimirana unakrsnom validacijom (engl. *cross-validation*) s ciljem najmanje stope pogreške predviđanja ($\alpha = 1$, $\lambda = 0.02$). Procjena diferencirajućeg potencijala provedena je usporedbom vrijednosti površina ispod krivulje (AUC, engl. *area under the curve*) dviju krivulja operativnih karakteristika prijemnika (ROC) (R paketi *glmnet* (116) i *pROC*(117)) dobivenih iz prediktivnih modela. Nulti model koristio je samo spol i dob kao prediktore statusa bolesti, dok je puni model koristio spomenute varijable kao i sve C3 glikoforme kao dodatne prediktore. Zbog rizika od pretjerane prilagodbe modela podacima (engl. *overfitting*) korištena je peterostruka unakrsna validacija. Procijenjene AUC vrijednosti ROC krivulja uspoređene su korištenjem *bootstrap* metode ponovnog uzorkovanja s 2000 ponavljanja.

Što se tiče komplikacija šećerne bolesti tipa 1, procjena povezanosti između C3 N-glikoma i različitih laboratorijskih parametara i kliničkog statusa napravljena je korištenjem općeg linearnog modeliranja s logi-transformiranom normaliziranom površinom glikoforme kao zavisnom varijablom i različitim biokemijskim i kliničkim značajkama kao nezavisnim varijablama. Kako bi se uklonio učinak dobi, spola i trajanja bolesti, te su varijable uključene kao dodatni kovarijati. Model linearne regresije korišten za testiranje odnosa C3 N-glikana i duljine trajanja bolesti imao je samo dob i spol kao dodatne kovarijati. Rezultati su prikazani kao omjeri izgleda (za kategoričke varijable), ili kao koeficijent koji predstavlja promjenu normalizirane površine glikoforme na logaritamskoj skali (za kontinuirane podatke), i to za sve C3 glikoformu posebno. S obzirom na više provedenih testova, stopa lažno pozitivnih otkrića (FDR, engl. *false discovery rate*) kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom s p-vrijednošću koja se smatra značajnom manjom od 0.05 (115).

Glikopeptidi komponente komplementa C3 zatim su evaluirani s ciljem utvrđivanja njihove sposobnosti identificiranja pojedinaca s različitim komplikacijama dijabetesa tipa 1. Za retinopatiju i albuminuriju, umjerene i teške komplikacije (kategorije 2 i 3) grupirane su zajedno kako bi se dobio binarni odgovor: s/bez komplikacija. Povezanost statusa komplikacija ŠBT1 i C3 N-glikoma procijenjena je modelima dobivenim logističkom regresijom elastičnom mrežom (engl. *logistic elastic net regression*) s parametrima $\alpha=1$ i $\lambda=0.02$. Nekoliko prediktivnih modela uspoređeno je na temelju AUC vrijednosti ROC krivulja. Nulti model je imao samo spol i dob kao prediktore, dok su ostali modeli kao dodatne prediktore imali: HbA1c, duljinu trajanja ŠBT1 ili pak C3 glikopeptide (puni model koristio je sve navedene prediktore). Kao i ranije, korištena je peterostruka unakrsna validacija, a procijenjene AUC vrijednosti ROC krivulja uspoređene su *bootstrap* metodom ponovnog uzorkovanja uz 2000 ponavljanja.

Svi podaci analizirani su i vizualizirani pomoću programskog jezika R (verzija 3.5.2) i računalnog programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp).

2.3. Materijali

2.3.1. Kemikalije

U sklopu ovog doktorskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

2-propanol (Merck, SAD), acetonitril LC-MS čistoće (VWR international, SAD), amonijev bikarbonat (NH_4HCO_3) (Acros Organics, Belgija), HILIC zrnca Chromabond (Macherey-Nagel, Njemačka), kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, SAD), ledena octena kiselina (CH_3COOH) (Sigma-Aldrich, SAD), manganov klorid tetrahidrat ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$), metil α -D-manopiranozid (Sigma-Aldrich, SAD), mravlja kiselina (Sigma-Aldrich, SAD), natrijev hidroksid (NaOH) (Sigma-Aldrich, SAD), natrijev klorid (NaCl) (CARLO ERBA Reagents, Njemačka) trifluoroctena kiselina ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) (Sigma-Aldrich, SAD), tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) (Sigma-Aldrich, SAD).

2.3.2. Enzimi

U sklopu ovog doktorskog rada korišten je sljedeći enzim: endoproteinaza Glu-C iz *Staphylococcus aureus* V8 u obliku liofiliziranog praška.

2.3.3. Laboratorijski uređaji i oprema

U sklopu ovog doktorskog rada korišteni su sljedeći laboratorijski uređaji i oprema: ACQUITY UPLC M class nano-LC sustav (Waters, SAD), analitička vaga AB54-S (Mettler Toledo, SAD), centrifuga (Eppendorf, Njemačka), inkubator (MRC, Izrael), magnetski mješalica Magnetic Stirrer MSH 300 (Biosan, Latvija), mikropipete (Rainin, SAD), nano-LC kolona Halo C18 ($150 \text{ mm} \times 75 \mu\text{m i.d.}, 2.7 \mu\text{m}$) (Advanced Materials Technology, SAD), tehnička vaga Highland (Adam Equipment, UK), pH metar Seven Compact (Mettler Toledo, SAD), predkolona Acclaim PepMap C8 ($5 \text{ mm} \times 300 \mu\text{m i.d.}$) (Thermo Fisher Scientific, SAD), spektrometar masa Compact (Bruker Daltonics, SAD), treskalica (GFL, Njemačka), vakuumska centrifuga SpeedVac (Thermo Scientific, SAD), vakuumsko postolje (Millipore Corporation, SAD), vakumska pumpa (Pall, SAD).

2.3.4. Potrošni materijal

U sklopu ovog doktorskog rada korišteni su sljedeći potrošni materijali:

ABgene PCR pločice s 96 jažica (Thermo Scientific, SAD), mikrotitarske pločice s 96 jažica za sakupljanje uzoraka (Waters, SAD), nastavci za pipete (Rainin, SAD), polipropilenske filter pločice s 96 jažica (OrochemA, SAD).

2.3.5. Računalni programi i alati

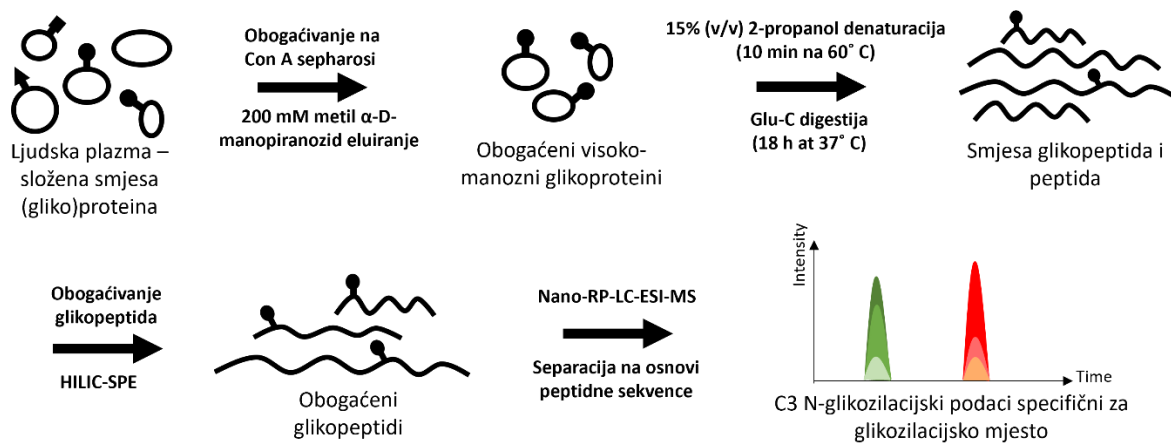
U sklopu ovog doktorskog rada korišteni su sljedeći računalni programi i alati:

Compass DataAnalysis (Bruker Daltonics, SAD), GlycoMod (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska), GlycoWorkbench 2 (GNU licenca), HyStar version 4.2 (Bruker Daltonics, SAD), LaCyTools verzija v.1.0.1, b.9 (Apache licenca), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp, SAD), MSConvert tool (verzija 3.0.19208) (ProteoWizard, SAD), Otof control (Bruker Daltonics, SAD), R programski jezik (verzija 3.5.2).

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Razvoj visokoprotodne metode za analizu N-glikozilacije ljudske komponente komplementa C3

Smanjenje kompleksnosti uzorka obogaćivanjem glikoproteina od interesa čest je prvi korak glikoproteomskih analiza, a jedan od najčešće korištenih pristupa obogaćivanja jest lektinska afinitetna kromatografija (95). Budući da komponenta komplementa C3 sadrži isključivo visoko-manozne glikane, kao optimalan lektin odabran je Concanavalin A (Con A). Con A je frekventno korišten lektin koji preferirano prepoznaje α -manozu i u manjoj mjeri glukozu, pa se stoga prvenstveno koristi upravo za obogaćivanje visoko-manoznih glikana (97,118). Na ovaj se način C3 glikoprotein obogaćuje na osnovi glikanskog, a ne proteinskog dijela. Važno je naglasiti da se ovim pristupom obogaćuje ne samo intaktni C3, već i njegovi manji fragmenti koji su također glikozilirani, kao što je C3b. Spomenuti lektin se u obliku Con A sefarnog afinitetnog matriksa lako prenosi u polipropilenske filter pločice s 96 jažica te omogućuje brzo, visokoprotodno i jeftino obogaćivanje C3 glikoproteina iz ljudske plazme. Nakon obogaćivanja, glikoproteini se digestiraju endoproteinazom Glu-C, a ne uobičajeno korištenim tripsinom, s ciljem stvaranja optimalne duljine peptidne sekvence za C3 glikoprotein. Neželjeni peptidi se zatim od glikopeptida odvajaju pomoću HILIC-SPE postupka. Prema analizi proteomskih podataka, C3 predstavlja u prosjeku 11 % svih proteina u Con A eluatu nakon pročišćavanja (Tablica 3), što je dovoljno za analizu njegove N-glikozilacije specifične za glikozilacijsko mjesto. Shematski tijek visokoprotodne analize ljudskih C3 N-glikopeptida prikazan je na Slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz metode za visokoprotodnu analizu ljudske C3 N-glikozilacije. Preuzeto i prilagođeno iz (119).

Tablica 3. Proteomska analiza Con A eluata nakon HILIC-pročišćavanja.

Protein ID	Protein	Intenzitet	Relativni udio
P02671	Fibrinogen alfa lanac	65696000	41%
P01024	Komponenta komplementa C3	17953000	11%
P00450	Ceruloplazmin	14885000	9%
P0C0L5;P0C0L4	Komponenta komplementa C4-A/B	10704000	7%
	Nepoznata kontaminacija	8125900	5%
P01871	Konstantna regija teškog lanca imunoglobulina	7908500	5%
P02751	Fibronektin	6033500	4%
P01834	Konstantna regija lakog lanca imunoglobulina	6020300	4%
P01009	Alfa-1-antitripsin	5589900	3%
P02679	Fibrinogen gamma laanc	4770300	3%
P10909	Klusterin	4468900	3%
P05546	Heparin kofaktor 2	3179100	2%
B4E1Z4;P00751	Komplement faktor B	1696900	1%
P01008	Antitrombin-III	1618000	1%
P08603	Komplement faktor H	1504000	1%
P00734	Protrombin	1096800	1%

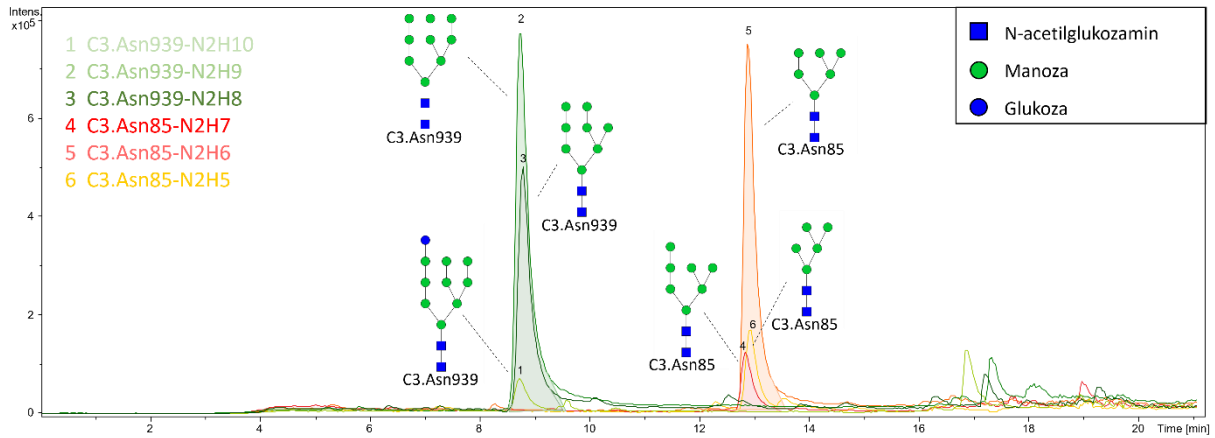
3.2. C3 N-glikoprofiliranje

N-glikoprofiliranje ljudske komponente komplementa C3 prvo je napravljeno na skupnom standardu plazme dobivenom alikvotiranjem uzoraka plazme ispitanika korištene za ispitivanje stabilnosti C3 N-glikoma pri fiziološkim uvjetima. Popis očekivanih C3 glikoformi za svako glikozilacijsko mjesto pripremljen je na temelju prethodno reportiranih glikanskih struktura na C3 glikoproteinu (57,61,67). Ljudski C3 ima tri potencijalna N-glikozilacijska mjesta, ali samo su dva okupirana i sadrže različite visoko-manozne glikane (108,120). Glikoforme su

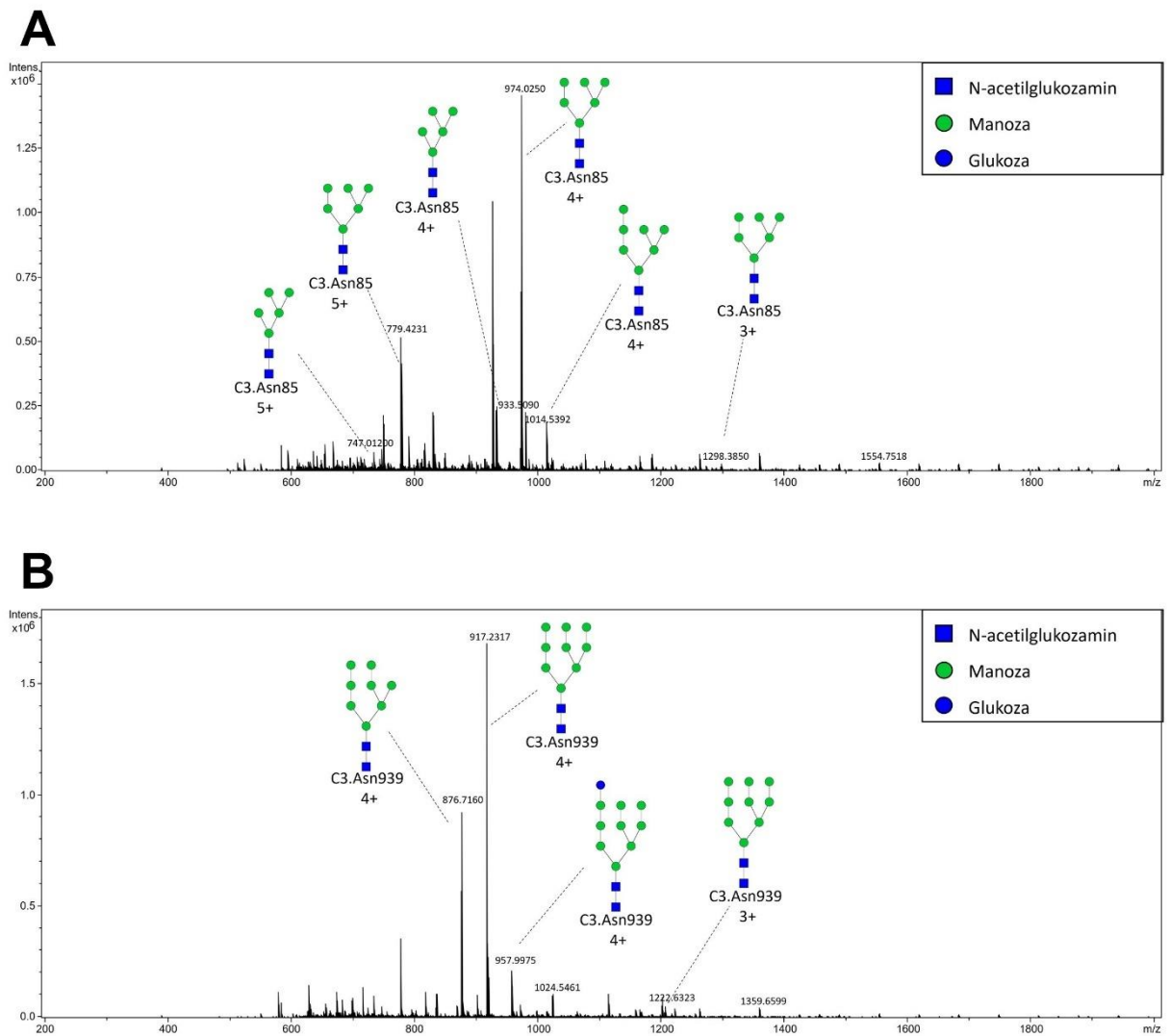
identificirane m/z vrijednostima izračunatim iz mase svakog Glu-C digestiranog peptida koji nosi N-glikozilacijsko mjesto te mase odgovarajućih glikanskih struktura na tom mjestu, a zatim potvrđene korištenjem fragmentacijskih spektara. Sve genetske varijante ljudskog C3 glikoproteina uzete su u obzir, a nijedna nije utjecala na sekvencu C3 glikopeptida dobivenih digestijom endoproteazom Glu-C. Ukupno je identificirano šest glikoformi isključivo visokomanoznog tipa, odnosno tri glikana po glikozilacijskom mjestu. Ovo je potvrdilo prethodna istraživanja, budući da nismo pronašli nijednu drugu prisutnu glikoformu koja bi se dala uspješno kvantificirati. N-glikanski sastav svakog glikozilacijskog mjesta i kratice korištene za imenovanje C3 glikoformi prikazane su u Tablici 4. Na temelju položaja mjesta glikozilacije, prvo mjesto je nazvano C3.Asn85, a drugo C3.Asn939. Kratica glikoformi sastoji se od naziva glikozilacijskog mjesta i broja heksoza (H) i *N*-acetilglukozamina (N) koje sadrži. Reprezentativni kromatogram ljudskih C3 glikopeptida s prikazanim ekstrahiranim ionima koji tvore dva klastera prikazan je na Slici 4, a tipični sumirani maseni spektar za jedan od klastera prikazan je na Slici 5.

Tablica 4. Peptidna sekvenca C3 N-glikozilacijskih mjesta dobivena digestijom Glu-C endoproteazom, njihov glikanski sastav i kratica glikoforme. N-vezani asparagin je označen sa *. N (GlcNAc) – *N*-acetilglukozamin, Man – manozna, H – heksoza.

N-glikozilacijsko mjesto	Peptidna sekvenca	Glikanski sastav	Kratica glikoforme
Asn 85	KTVLTPATNHMGN*VTFTIPANRE	Man ₅ GlcNAc ₂	C3.Asn85-N2H5
		Man ₆ GlcNAc ₂	C3.Asn85-N2H6
		Man ₇ GlcNAc ₂	C3.Asn85-N2H7
Asn 939	GIRMN*KTVAVRTLDPPE	Man ₈ GlcNAc ₂	C3.Asn939-N2H8
		Man ₉ GlcNAc ₂	C3.Asn939-N2H9
		Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂	C3.Asn939-N2H10



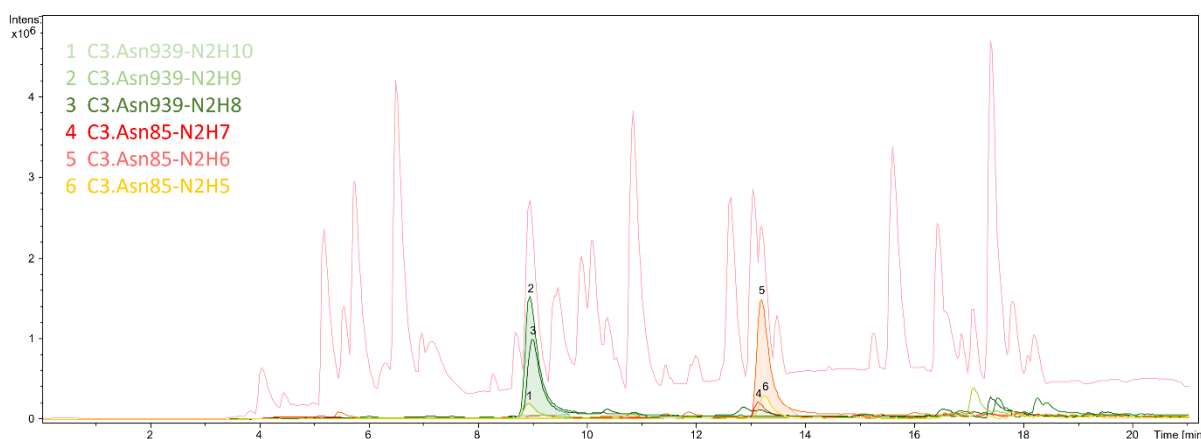
Slika 4. Reprezentativni ionski kromatogram ljudskih C3 glikopeptida s prikazom ekstrahiranih ionskih tragova. Preuzeto i prilagođeno iz (119).



Slika 5. Tipični sumirani maseni spektar. **A**, C3.Asn85 klaster s označenim trostruko $[M+3H]^+^{3+}$, četverostruko $[M+4H]^+^{4+}$ i peterostruko $[M+5H]^+^{5+}$ nabijenim glikopeptidnim ionima. **B**, C3.Asn939

klaster s označenim trostruko $[M+3H^+]^{3+}$ i četverostruko $[M+4H^+]^{4+}$ nabijenim glikopeptidnim ionima. Preuzeto i prilagođeno iz (119).

Na uspješno kromatografsko odvajanje upućuje i Slika 6 koja prikazuje tzv. *base peak* kromatogram zajedno s prikazima ekstrahiranih ionskih tragova C3 koji dominiraju unutar glavnih pikova. Iako je Con A eluat i dalje prilično složena smjesa različitih glikoproteina, ova brza 21-minutna nano-LC analiza obrnutih faza učinkovito odvaja Glu-C peptide, uz minimalno koeluiranje od strane ostalih peptida što bi kompliciralo interpretaciju masenih spektara. Endoproteinaza Glu-C nije odabrana slučajno, već na temelju optimalnih duljina dobivenih peptidnih fragmenata od interesa. Naime, u pokušajima digestije glikoproteina tripsinom jedna je od peptidnih triptičkih sekvenci koja sadrži N-glikozilacijsko mjesto imala samo tri aminokiseline (Tablica 5), onemogućavajući koherentnu interakciju s C18 kolonom i uzrokujući probleme u analizi.

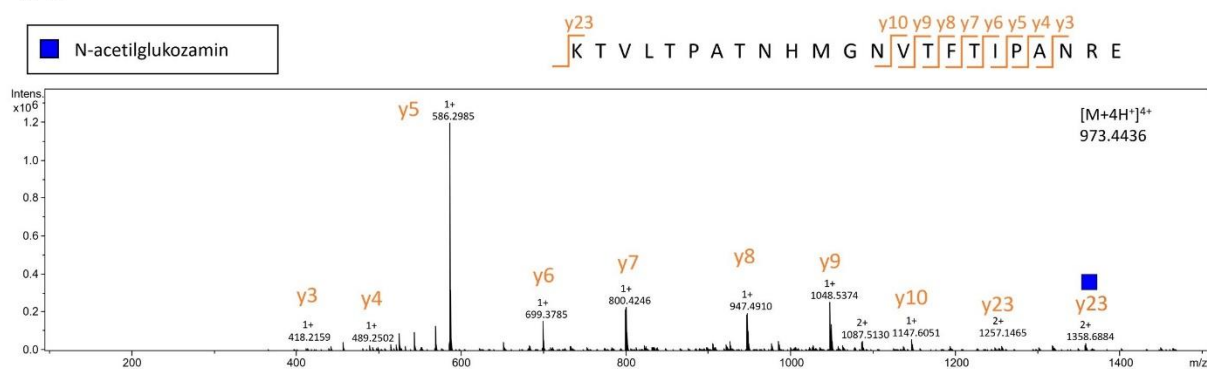
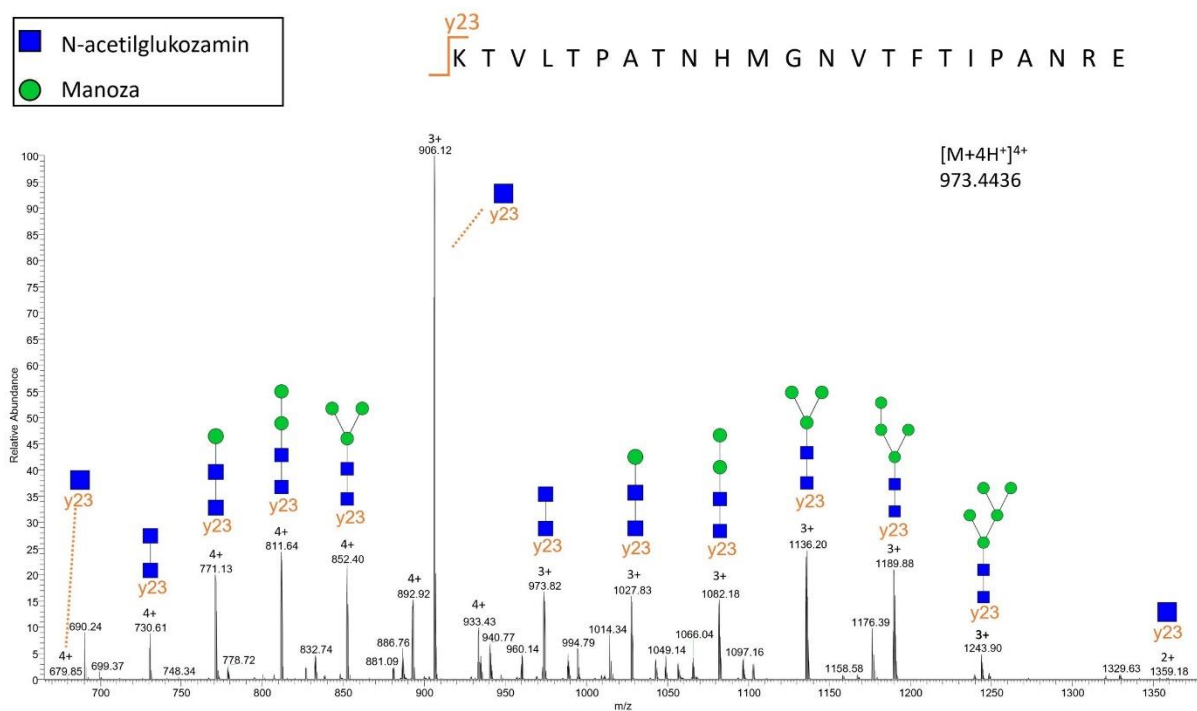


Slika 6. *Base peak* kromatogram zajedno s ekstrahiranim ionima svih šest C3 glikoformi. Preuzeto i prilagođeno iz (119).

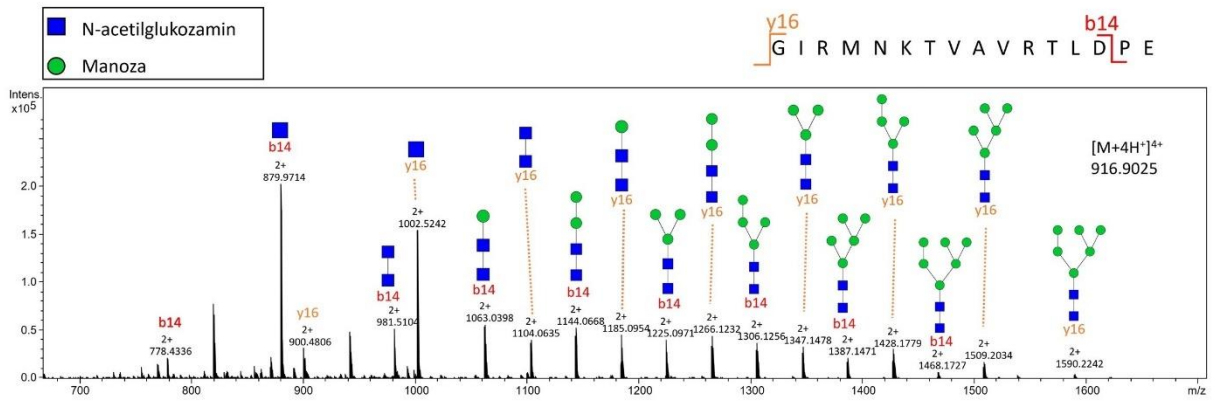
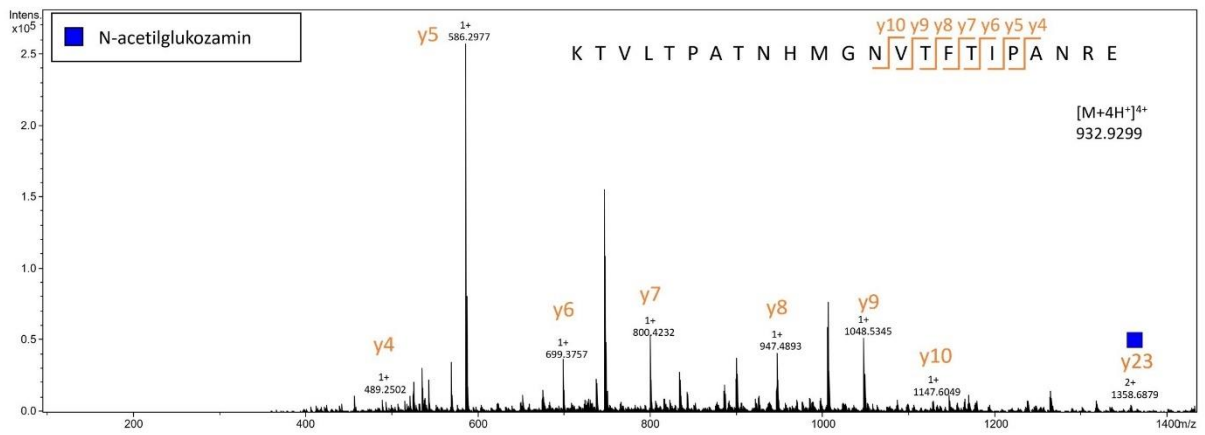
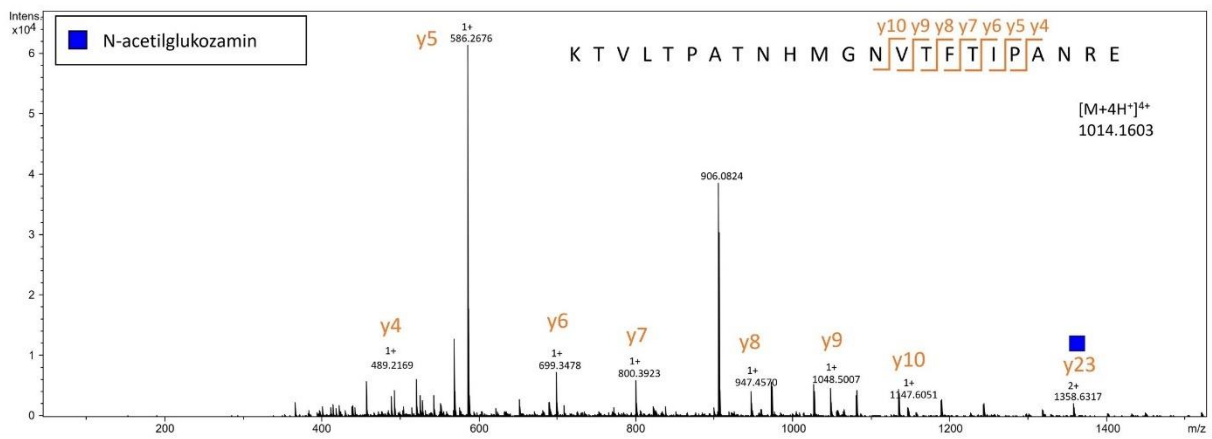
Tablica 5. Peptidna sekvenca C3 N-glikozilacijskih mjesta nakon digestije s endoproteinazom Glu-C i tripsinom.

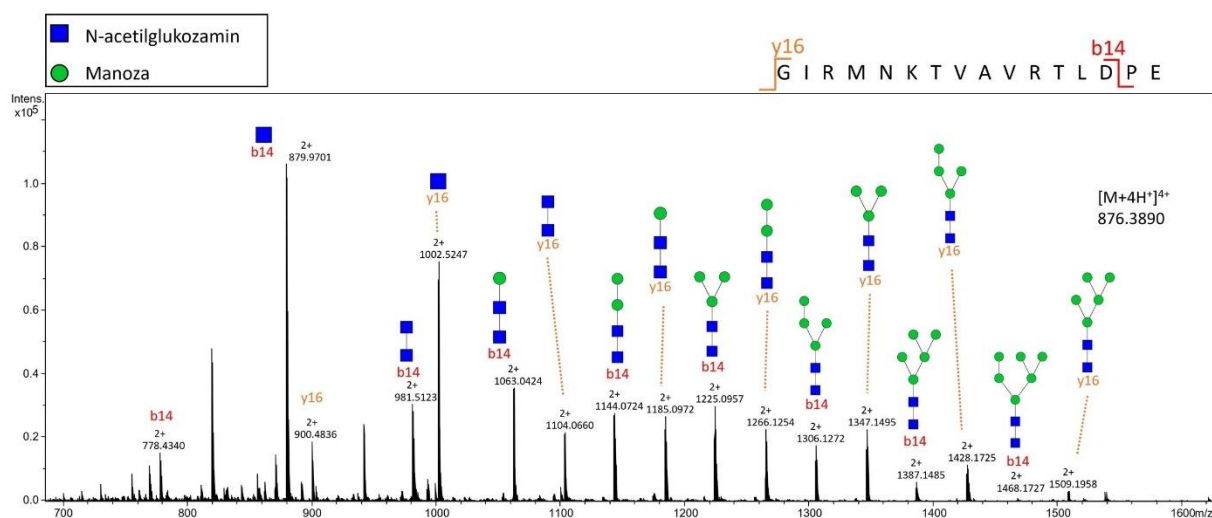
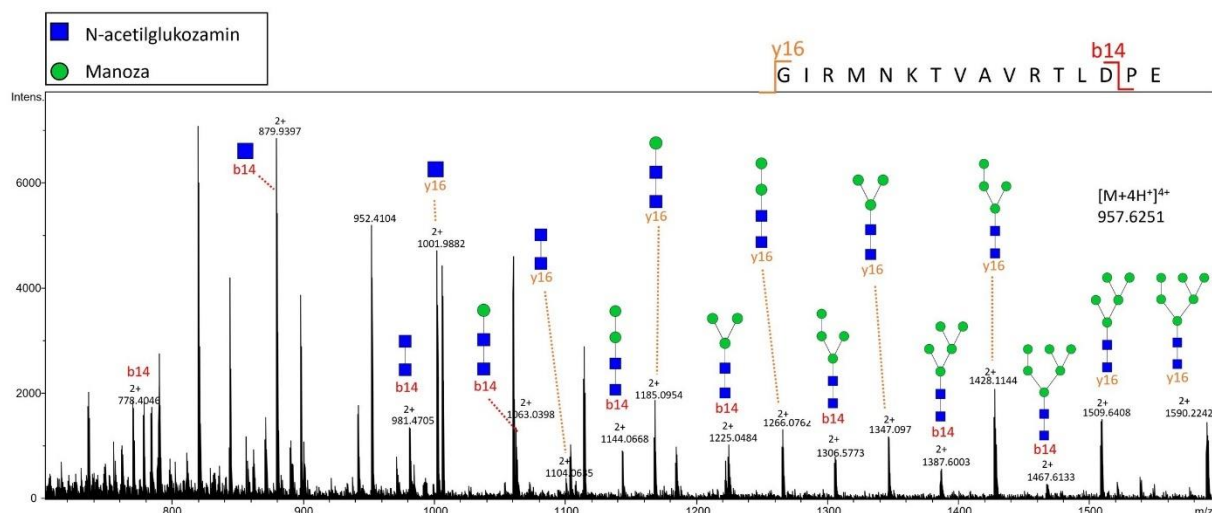
N-glikozilacijsko mjesto	Enzim	Peptidna sekvenca
C3.Asn85	Glu-C	KTVLTPATNHMGN*VTFTIPANRE
	Tripsin	TVLTPATNHMGN*VTFTIPANR
C3.Asn939	Glu-C	GIRMN*KTVAVRTLDPPE
	Tripsin	MN*K

Svih šest identificiranih glikoformi potvrđeno je u MS/MS analizi koja je uslijedila (Slika 7. i Slika 8.). Fragmentacijski spektri glikopeptida dobiveni su kolizijom induciranom disocijacijom (CID, engl. *collision-induced dissociation*), s tim da su se kolizijske energije udvostručavale u kasnijih 80 % MS/MS događaja omogućivši time fragmentaciju glikanskih i peptidnih dijelova unutar jednog tandemskog MS spektra. Zanimljivo je da glikoforme C3.Asn85 pretežno disociraju na razini peptida, dok su glikopeptidi s glikozilacijskog mjesta C3.Asn939 karakterizirani uglavnom fragmentacijom glikanskog dijela. Fragmentacija C3.Asn85 glikopeptida primarno daje ione y-tipa, dok kod C3.Asn939 glikoformi nastaje kombinacija iona y-tipa i b-tipa. S ciljem bolje karakterizacije glikanske fragmentacije dodatno smo proveli disocijaciju sudara više energije (HCD, engl. *higher-energy collisional dissociation*). Tipičan primjer fragmentacijskog spektra za glikoformu C3.Asn85-N2H6 na razini peptida i glikana prikazan je na Slici 7. Ostatak glikoformi pokazao je slične obrasce fragmentacije, a njihovi MS/MS spektri prikazani su na Slici 8.

A**B**

Slika 7. MS/MS fragmentacijski spektar C3.Asn85-N2H6. **A**, fragmentacija peptidnog dijela C3.Asn85-N2H6. **B**, fragmentacija glikanskog dijela C3.Asn85-N2H6. Preuzeto i prilagođeno iz (119).

A**B****C**

D**E**

Slika 8. Reprezentativni MS/MS fragmentacijski spektar. **A**, glikoforma C3.Asn939-N2H9. **B**, glikoforma C3.Asn85-N2H5. **C**, glikoforma C3.Asn85-N2H7. **D**, glikoforma C3.Asn939-N2H8. **E**, glikoforma C3.Asn939-N2H10. Preuzeto i prilagođeno iz (119).

3.3. Validacija metode

Određivanje varijacije razvijene glikoproteomske metode provedeno je izračunom vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) tehničkih replikata standarda plazme. Ponovljivost je izračunata korištenjem oktaplikata na pločici s 96 jažica, a unutarlaboratorijska višednevna ponovljivost procijenjena je korištenjem oktaplikata iz tri serije odvojeno pripremljenih uzoraka iz tjedna u tjedan. Medijan CV vrijednosti iznosi manje od 12 % za sve analizirane glikoforme (Tablica

6). Povećana varijacija primijećena je za monoglukoziliranu glikoformu, dok je medijan CV vrijednosti za sve ostale glikoforme manji od 5 %.

Tablica 6. Ponovljivost razvijene metode. Izračunate srednje vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) za oktaplikate iz tri odvojeno provedene pripreme uzoraka. Relativni udio svake glikoforme dobiven je normalizacijom na pojedino glikozilacijsko mjesto.

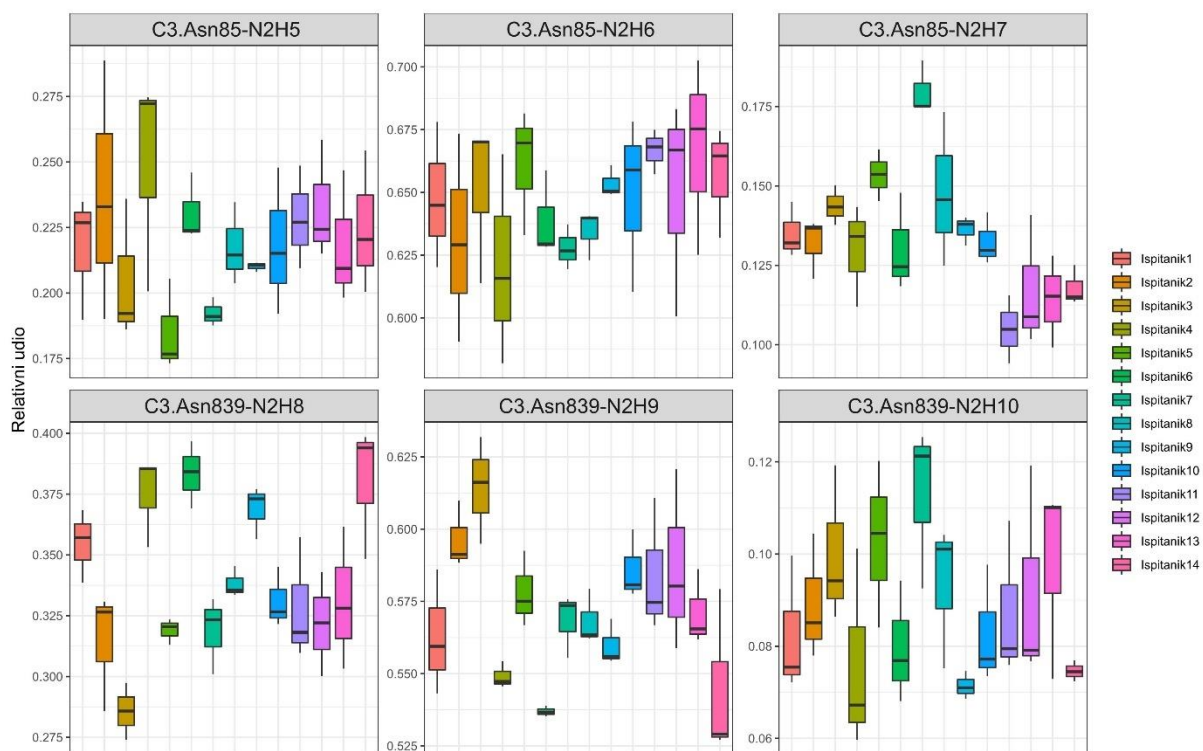
C3 glikoforma		C3.Asn85- N2H5	C3.Asn85- N2H6	C3.Asn85- N2H7	C3.Asn939- N2H8	C3.Asn939- N2H9	C3.Asn939- N2H10
Tjedan 1	Relativni udio	0.136	0.749	0.116	0.341	0.573	0.086
	SD	0.013	0.018	0.009	0.017	0.020	0.022
	CV (%)	9.833	2.396	7.393	5.104	3.455	25.199
Tjedan 2	Relativni udio	0.130	0.754	0.116	0.328	0.599	0.073
	SD	0.005	0.006	0.004	0.006	0.005	0.002
	CV (%)	3.742	0.775	3.279	1.781	0.821	2.811
Tjedan 3	Relativni udio	0.138	0.735	0.128	0.323	0.602	0.075
	SD	0.003	0.002	0.002	0.006	0.007	0.008
	CV (%)	1.964	0.301	1.656	1.708	1.231	11.277
medijan CV (%)		3.742	0.775	3.279	1.781	1.231	11.277

S ciljem testiranja osjetljivosti metode, odnosno procjene minimalnog volumena krvne plazme ili seruma iz kojeg se uspješno može odrediti C3 N-glikanski profil, C3 N-glikom je u triplikatima analiziran iz nekoliko različitih početnih volemna plazme: 10, 5, 2.5 i 1 μ l. Svi dobiveni glikanski profili bili su usporedivi, uz medijan vrijednosti koeficijenta varijacije kako slijedi (od 10 do 1 μ l): 2.6 %, 1.0 %, 7.9 % te 2.1 %. Iz ovog slijedi da je C3 N-glikom moguće analizirati već iz samo 1 μ l krvne plazme ili seruma, no zbog jednostavnijeg pipetiranja i većih apsolutnih signala svih C3 glikopeptida pri korištenju uzorka početnog volumena 10 μ l ipak je taj volumen odabran kao optimalan za novorazvijenu metodu.

3.4. Temporalna stabilnost C3 N-glikoma

Iako je sastav C3 N-glikoma otprije poznat, njegova intraindividualna stabilnost tijekom vremena, kao ni interindividualne razlike, nikad nisu proučavane. S ciljem ispitivanja stabilnosti C3 N-glikanskih profila pri fiziološkim uvjetima, uzorci 14 zdravih muških mladih odraslih osoba analizirani su u tri vremenske točke: na početku studije, te nakon 6 i 10 tjedana. Uzimajući u obzir činjenicu da je vrijeme poluraspada C3 glikoproteina u plazmi relativno kratko (otprilike 72 h), te da su njegove fragmenti čak i kraćeg vijeka (121,122), ovi vremenski razmaci trebali bi osigurati analizu novosintetiziranog proteina u svakoj vremenskoj točki uzorkovanja.

Vremenska stabilnost C3 N-glikoma procijenjena je izračunavanjem intraindividualnog i interindividualnog koeficijenta varijacije (CV) za sve C3 glikoforme. Intraindividualni CV izračunat je iz longitudinalnih uzoraka svakog ispitanika, dok je interindividualni CV izračunat iz svih uzoraka unutar pojedine vremenske točke. Prethodno procijenjena unutarlaboratorijska višednevna ponovljivost poslužila je kao CV same metode. Podaci prikazani na Slici 9 i Tablici 7 prikazuju da je varijacija između ispitanika veća od intraindividualne varijacije i varijacije metode, odnosno da je medijan CV vrijednosti veći između nego unutar pojedinaca. Navedeno dokazuje da su interindividualne razlike kod zdravih osoba izraženije od promjena unutar pojedinca za sve glikoforme, ukazujući na postojanost C3 N-glikoma pri fiziološkim uvjetima. Iako su glikoforme C3.Asn85-N2H5 i C3.Asn85-N2H6 imale donekle usporedive intraindividualne i interindividualne varijacije, ostale glikoforme jasno su pokazivale veću varijaciju među pojedincima.



Slika 9. Relativna zastupljenost pojedine C3 glikoforme kod 14 zdravih ispitanika uzorkovanih u tri vremenske točke kroz 10 tjedana.

Tablica 7. Vremenska stabilnost C3 N-glikozilacije u zdravih osoba tijekom 10 tjedana. Intraindividualni koeficijent varijacije (CV) izračunat je iz longitudinalnih uzoraka svakog sudionika, dok je interindividualni CV izračunat iz uzoraka svih sudionika unutar pojedine vremenske točke. Prikazane su centralne vrijednosti.

Glikoforma	Intraindividualni CV (%)	Interindividualni CV (%)	Ponovljivost metode (%)
C3.Asn85-N2H5	10.43	11.14	3.74
C3.Asn85-N2H6	4.15	4.21	0.78
C3.Asn85-N2H7	6.89	16.20	3.28
C3.Asn939-N2H8	4.61	9.34	1.78
C3.Asn939-N2H9	2.16	4.52	1.23
C3.Asn939-N2H10	17.08	20.38	11.27

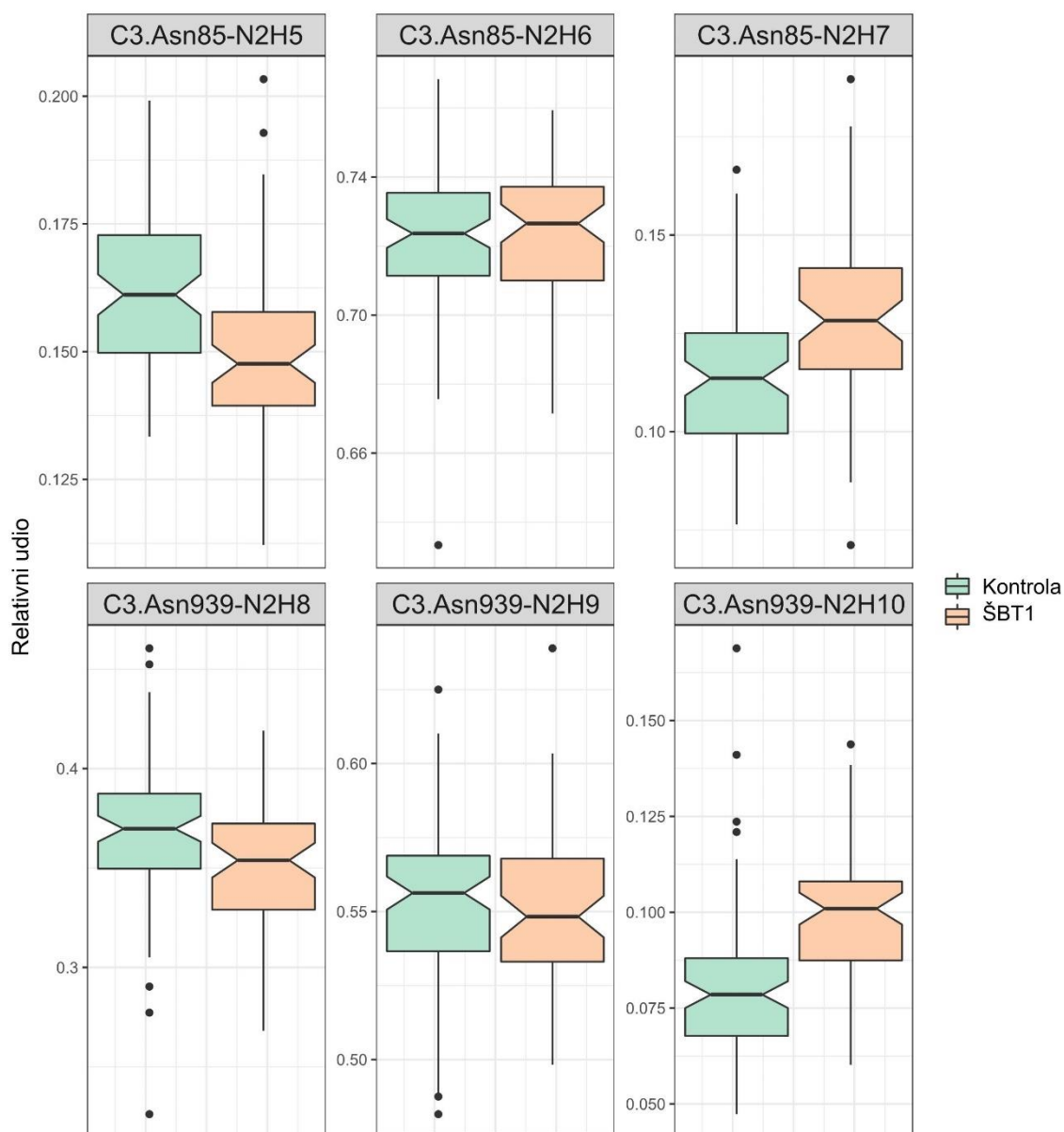
3.5. C3 N-glikom u šećernoj bolesti tipa 1

Budući da se C3 N-glikozilacija pokazala stabilnom unutar zdravih osoba, omogućena je potencijalna upotreba C3 N-glikoma kao biomarkera. S ciljem istraživanja C3 N-glikanskih

profila kao dijagnostičkog alata u šećernoj bolesti tipa 1, novorazvijena metoda primijenjena je na uzorcima djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa ŠBT1, kao i uzorcima njihove zdrave braće i sestara. Ukupno je analizirano 145 ispitanika iz 61 obitelji, te je svim ispitanicima određeno šest C3 glikoformi koje su normalizirane po pripadajućem glikozilacijskom mjestu. Linearna regresija otkrila je da su relativni udjeli četiri glikoforme značajno promijenjeni kod ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 8). Zanimljivo je da su oba glikozilacijska mjesta pokazala pomak prema više neprerađenim glikanskim strukturama, tj. strukturama s više manoznih podjedinica (Slika 10). Na glikozilacijskom mjestu C3.Asn85 relativni udio glikana $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ kod ispitanika sa ŠBT1 je značajno veći ($\text{OR} = 1.15$, $p = 5.43 \times 10^{-5}$) uz smanjenje glikana $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ($\text{OR} = 0.89$, $p = 7.82 \times 10^{-8}$), dok je udio glikana $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ostao nepromijenjen. Na glikozilacijskom mjestu C3.Asn939 udio glikana $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ kod ispitanika sa ŠBT1 je povećan ($\text{OR} = 1.28$, $p = 1.78 \times 10^{-8}$) uz smanjenje udjela glikana $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ($\text{OR} = 0.91$, $p = 1.44 \times 10^{-3}$), dok je razina glikana $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ostala nepromijenjena. Povećanje udjela glikana $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ također je primijećeno u prethodnom istraživanju ukupnog plazmatskog N-glikoma.

Tablica 8. Izračunati učinci šećerne bolesti tipa 1 na C3 glikoforme s odgovarajućim nekorigiranim i korigiranim p-vrijednostima. Stopa lažnih otkrića (FDR) kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom (BH) metodom s p-vrijednošću manjom od 0.05 koja se smatra značajnom. Statistički značajne glikoforme označene su masnim slovima. CI – interval pouzdanosti.

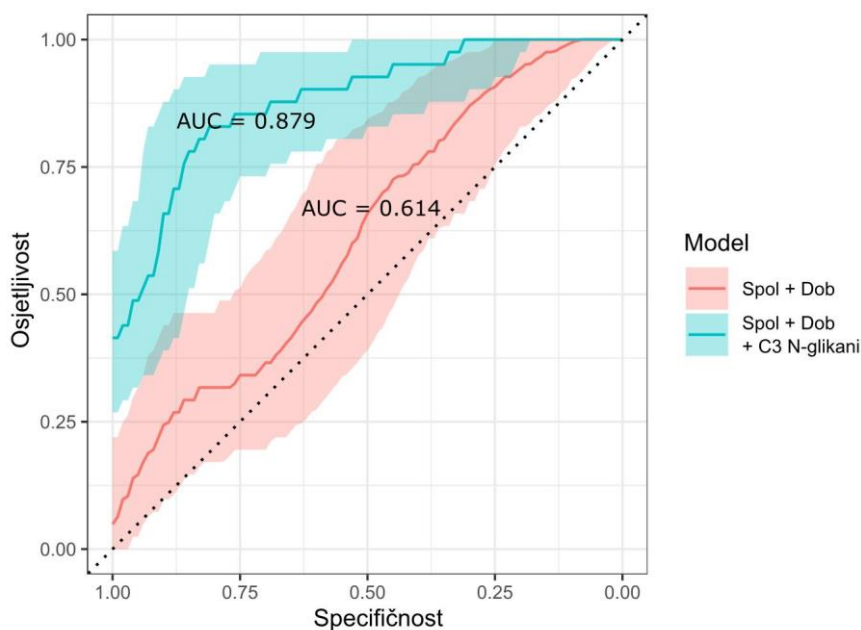
Glikoforma	Omjer izgleda (95% CI)	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	0.89 (0.85 - 0.92)	2.61×10^{-8}	7.82×10^{-8}
C3.Asn85-N2H6	1.00 (0.97 - 1.04)	7.94×10^{-1}	7.94×10^{-1}
C3.Asn85-N2H7	1.15 (1.08 - 1.22)	2.71×10^{-5}	5.43×10^{-5}
C3.Asn939-N2H8	0.91 (0.87 - 0.96)	9.62×10^{-4}	1.44×10^{-3}
C3.Asn939-N2H9	1.01 (0.97 - 1.05)	6.17×10^{-1}	7.41×10^{-1}
C3.Asn939-N2H10	1.28 (1.19 - 1.38)	2.97×10^{-9}	1.78×10^{-8}



Slika 10. Kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) koji pokazuju značajno povećanje udjela neobrađenih glikanskih struktura na oba C3 N-glikozilacijska mjesta u šećernoj bolesti tipa 1 u usporedbi s kontrolnom skupinom. Horizontalna linija unutar kutija predstavlja medijan, rezovi predstavljaju 95 %-tni interval pouzdanosti medijana, a gornji i donji rub kutije omeđuju interkvartilni raspon. Točke predstavljaju odstupajuća mjerenja. Preuzeto i prilagođeno iz (119).

S ciljem evaluacije potencijala C3 N-glikoma za diferenciranje pojedinaca sa šećernom bolesti tipa 1 od njihove zdrave braće i sestara, napravljen je diskriminativni model temeljen na C3 N-glikanima korištenjem logističke mješovite regresije elastične mreže. U glikanskom diskriminativnom modelu, sve C3 glikoforme korištene su kao prediktori, te je takav model uspoređen s nultim modelom koji je koristio samo spol i dob kao prediktore statusa bolesti.

Modeli su procijenjeni pomoću ROC krivulji njihovih pripadajućih AUC vrijednosti (Slika 11). Model temeljen samo na dobi i spolu nije imao značajnu diskriminirajuću moć (AUC 0.614, 95% CI 0.497–0.719). Dodavanje C3 glikoformi u model znatno je povećalo diskriminativnu moć (AUC 0.879, 95% CI 0.801–0.936), što ukazuje na njihovu značajnu sposobnost diferenciranja šećerne bolesti tipa 1, te potencijalnu prediktivnu moć C3 N-glikoma za procjenu rizika od navedene bolesti.



Slika 11. Analiza krivulja operativne karakteristike prijemnika (ROC) dvaju modela za diskriminaciju šećerne bolesti tipa 1. Nulti model (AUC 0.614) koristi samo spol i dob kao prediktore, dok glikanski model (AUC 0.879) uključuje i C3 glikoforme. Osjenčano područje oko linija predstavlja 95 %-tni interval pouzdanosti. Preuzeto i prilagođeno iz (119).

3.6. C3 N-glikom u komplikacijama ŠBT1

Učinak komplikacija šećerne bolesti tipa 1 na C3 N-glikozilaciju analizirana je na 189 ispitanika različitih stadija komplikacija (albuminurija i retinopatija podijeljene u tri kategorije). Što se tiče albuminurije u ŠBT1, tri C3 glikoforme značajno se razlikuju između skupina: C3.Asn85-N2H5, C3.Asn939-N2H8 i C3.Asn939-N2H10 (Tablica 9). Razlike u udjelu C3 glikoformi u albuminuriji prikazane su kao kutijasti dijagrami na Slici 12A. Vidljivo je da su promjene glikozilacije prisutne samo kod teške albuminurije (kategorija 3), dok se N-glikanski profil umjerene komplikacije (kategorija 2) ne razlikuje od profila osoba bez, odnosno samo s početnom albuminurijom (kategorija 1). Najveća promjena je povećanje udjela monoglukoziliranog glikana s glikozilacijskog mjesta C3.Asn939 (OR = 1.344, p = 0.002) u kategoriji 3 u usporedbi s kategorijom 2. Za retinopatiju, glikanske promjene pokazale su se

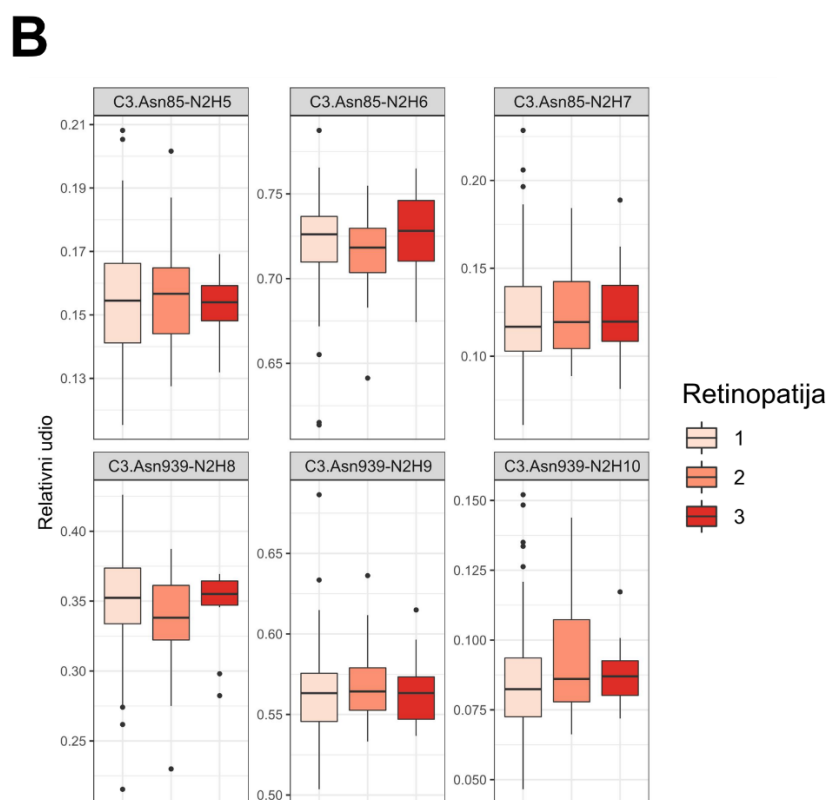
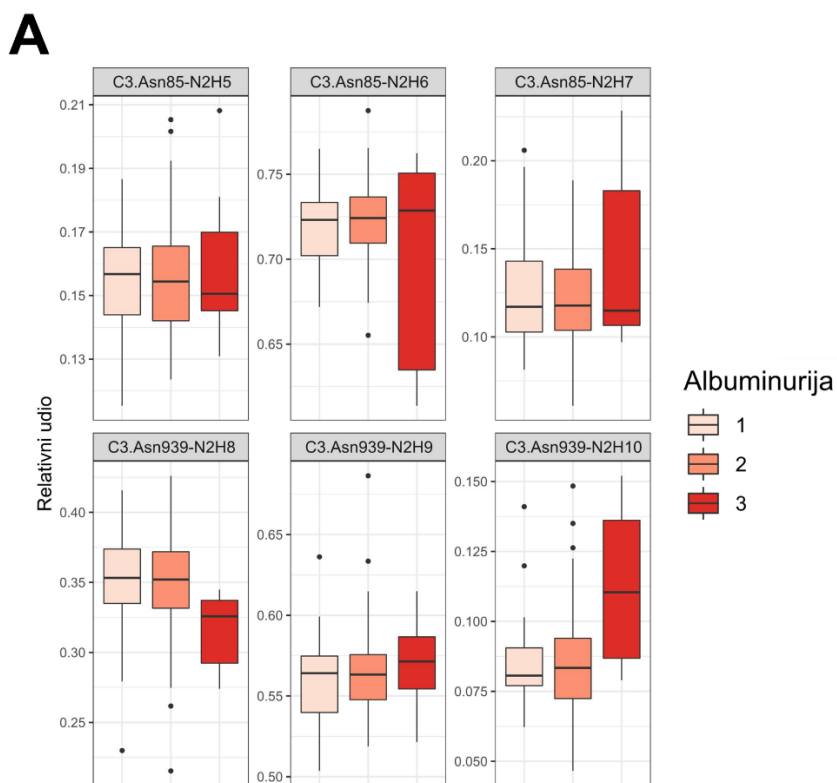
manje značajnima i bez dosljednog trenda (Tablica 10, Slika 12B). Samo je jedna glikoforma, monoglukozilirani glikanska struktura C3.Asn939-N2H10, statistički značajno promijenjena. Zanimljivo je da je ova struktura pokazala isti trend kao i kod albuminurije: povećanje udjela u kategoriji 2 u usporedbi s kategorijom 1 (OR = 1.150, p = 0.038).

Tablica 9. Učinci različitih kategorija albuminurije u ŠBT1 na C3 N-glikom s odgovarajućim nekorigiranim i korigiranim p-vrijednostima. Stopa lažnih otkrića (FDR) kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom (BH) metodom s p-vrijednošću manjom od 0.05 koja se smatra značajnom. Statistički značajne glikoforme označene su masnim slovima.

Glikoforma	Usporedba	Omjer izgleda	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	2 / 1	1.015	0.545	0.892
C3.Asn85-N2H5	3 / 1	1.047	0.329	0.659
C3.Asn85-N2H5	3 / 2	1.032	0.450	0.810
C3.Asn85-N2H6	2 / 1	0.999	0.907	0.993
C3.Asn85-N2H6	3 / 1	0.952	0.001	0.004
C3.Asn85-N2H6	3 / 2	0.953	2.5x10⁻⁴	0.002
C3.Asn85-N2H7	2 / 1	0.998	0.968	0.993
C3.Asn85-N2H7	3 / 1	1.197	0.056	0.126
C3.Asn85-N2H7	3 / 2	1.199	0.029	0.073
C3.Asn939-N2H8	2 / 1	0.995	0.819	0.993
C3.Asn939-N2H8	3 / 1	0.899	0.016	0.048
C3.Asn939-N2H8	3 / 2	0.903	0.009	0.033
C3.Asn939-N2H9	2 / 1	1.004	0.705	0.993
C3.Asn939-N2H9	3 / 1	1.003	0.852	0.993
C3.Asn939-N2H9	3 / 2	1.000	0.993	0.993
C3.Asn939-N2H10	2 / 1	0.994	0.889	0.993
C3.Asn939-N2H10	3 / 1	1.336	0.001	0.004
C3.Asn939-N2H10	3 / 2	1.344	9.7x10⁻⁵	0.002

Tablica 10. Učinci različitih kategorija retinopatije u ŠBT1 na C3 N-glikom s odgovarajućim nekorigiranim i korigiranim p-vrijednostima. Stopa lažnih otkrića (FDR) kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom (BH) metodom s p-vrijednošću manjom od 0.05 koja se smatra značajnom. Statistički značajne glikoforme označene su masnim slovima.

Glikoforma	Usporedba	Omjer izgleda	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	2 / 1	0.999	0.962	0.962
C3.Asn85-N2H5	3 / 1	0.967	0.374	0.672
C3.Asn85-N2H5	3 / 2	0.968	0.411	0.672
C3.Asn85-N2H6	2 / 1	0.984	0.041	0.190
C3.Asn85-N2H6	3 / 1	0.989	0.346	0.672
C3.Asn85-N2H6	3 / 2	1.005	0.706	0.922
C3.Asn85-N2H7	2 / 1	1.106	0.042	0.190
C3.Asn85-N2H7	3 / 1	1.138	0.090	0.269
C3.Asn85-N2H7	3 / 2	1.029	0.717	0.922
C3.Asn939-N2H8	2 / 1	0.946	0.017	0.151
C3.Asn939-N2H8	3 / 1	0.955	0.197	0.506
C3.Asn939-N2H8	3 / 2	1.010	0.796	0.955
C3.Asn939-N2H9	2 / 1	1.009	0.342	0.672
C3.Asn939-N2H9	3 / 1	1.007	0.652	0.922
C3.Asn939-N2H9	3 / 2	0.998	0.873	0.962
C3.Asn939-N2H10	2 / 1	1.150	0.002	0.038
C3.Asn939-N2H10	3 / 1	1.143	0.054	0.193
C3.Asn939-N2H10	3 / 2	0.995	0.939	0.962



Slika 12. Kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) relativne zastupljenosti C3 glikoformi u različitim kategorijama **A**, albuminurije u ŠBT1 i **B**, retinopatije u ŠBT1. Horizontalna linija unutar kutija predstavlja medijan, a gornji i donji rub kutije omeđuju interkvartilni raspon. Točke predstavljaju odstupajuća mjerenja.

3.7. C3 N-glikanske promjene izazvane hipertenzijom i pušenjem u ŠBT1

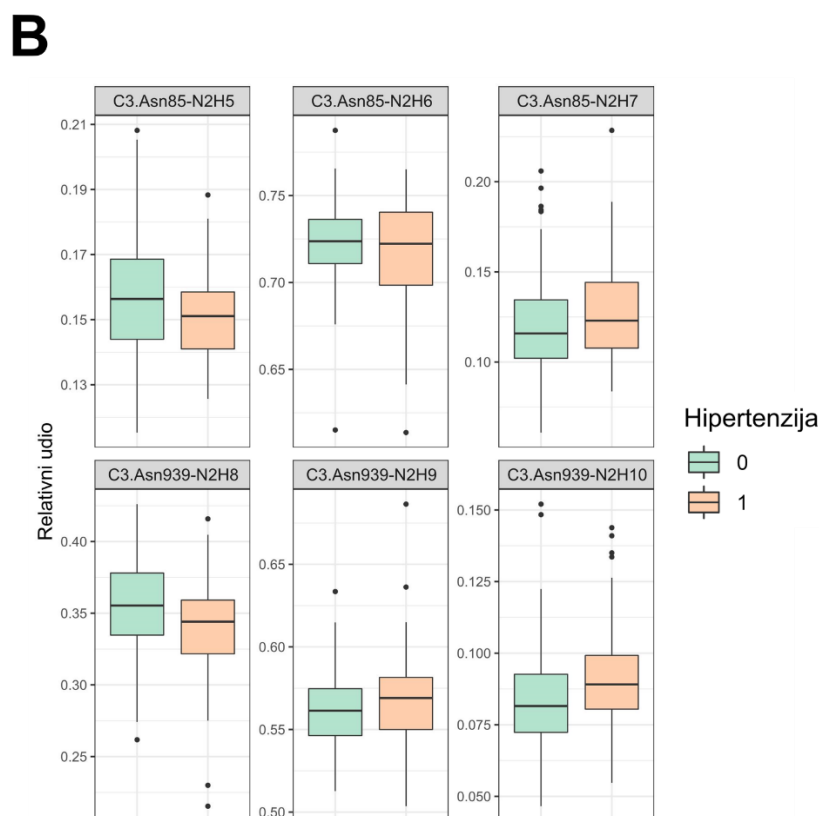
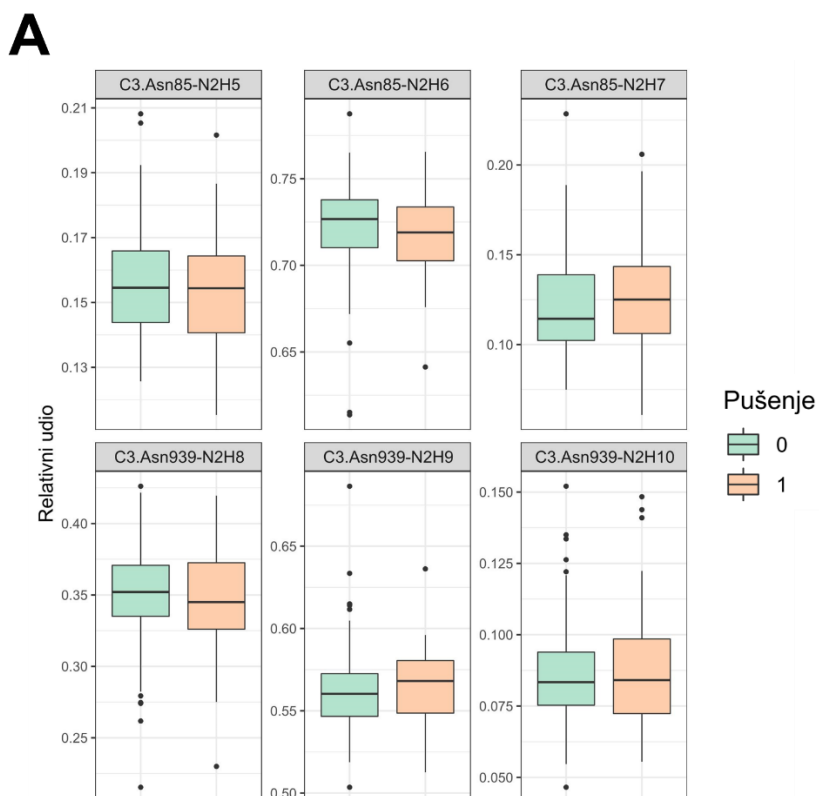
Smatrajući se jednim od glavnih čimbenika rizika za razvoj komplikacija šećerne bolesti tipa 1, ispitani su i učinci hipertenzije i pušenja na C3 N-glikom. Ispitanike smo podijelili u binarne skupine ovisno o statusu pušenja (pušači-kategorija 1, nepušači-kategorija 0) i hipertenzije (da-1, ne-0). Pokazalo se da pušački status u ŠBT1 nema utjecaja na C3 N-glikom, budući da nije pronađena nijedna statistički značajna razlika između profila C3 N-glikana između pušača i nepušača (Tablica 11, Slika 13A). S druge strane, status hipertenzije u ŠBT1 značajno je utjecao na relativni udio skoro svih C3 glikoformi (Tablica 12, Slika 13B). Povećanje udjela glikopeptida s više manoznih podjedinica vidljivo je na oba glikozilacijska mjesta. Na glikozilacijskom mjestu C3.Asn85 značajno se povećao udio glikana $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (OR = 1.186, $p = 2.23 \times 10^{-4}$), dok se udio glikana $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ i $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ smanjio. Na mjestu C3.Asn939 uočeno je značajno povećanje udjela $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (OR = 1.162, $p = 2.71 \times 10^{-4}$) uz smanjenje razina $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, dok je udio $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ostao nepromijenjen.

Tablica 11. Učinci pušačkog statusa u šećernoj bolesti tipa 1 na C3 N-glikom s odgovarajućim nekorigiranim i korigiranim p-vrijednostima. Stopa lažnih otkrića (FDR) kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom (BH) metodom s p-vrijednošću manjom od 0.05 koja se smatra značajnom.

Glikoforma	Usporedba	Omjer izgleda	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	1 / 0	0.981	0.298	0.823
C3.Asn85-N2H6	1 / 0	0.999	0.838	0.899
C3.Asn85-N2H7	1 / 0	1.023	0.548	0.823
C3.Asn939-N2H8	1 / 0	0.986	0.421	0.823
C3.Asn939-N2H9	1 / 0	1.008	0.297	0.823
C3.Asn939-N2H10	1 / 0	1.004	0.899	0.899

Tablica 12. Učinci statusa hipertenzije u šećernoj bolesti tipa 1 na C3 N-glikom s odgovarajućim nekorigiranim i korigiranim p-vrijednostima. Stopa lažnih otkrića (FDR) kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom (BH) metodom s p-vrijednošću manjom od 0.05 koja se smatra značajnom. Statistički značajne glikoforme označene su masnim slovima.

Glikoforma	Usporedba	Omjer izgleda	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	1 / 0	0.954	0.023	0.028
C3.Asn85-N2H6	1 / 0	0.980	0.003	0.004
C3.Asn85-N2H7	1 / 0	1.186	3.71x10⁻⁵	2.23x10⁻⁴
C3.Asn939-N2H8	1 / 0	0.942	0.002	0.004
C3.Asn939-N2H9	1 / 0	1.008	0.326	0.326
C3.Asn939-N2H10	1 / 0	1.162	9.04x10⁻⁵	2.71x10⁻⁴



Slika 13. Kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) C3 N-glikanskih profila ispitanika sa ŠBT1 u ovisnosti o **A**, pušačkom statusu i **B**, hipertenziji. Horizontalna linija unutar kutija predstavlja medijan, a gornji i donji rub kutije omeđuju interkvartilni raspon. Točke predstavljaju odstupajuća mjerenja.

3.8. Povezanost C3 N-glikoma s kontrolom glikemije, eGFR i trajanjem ŠBT1

U prethodno navedenih odraslih ŠBT1 ispitanika ispitana je i povezanost C3 N-glikoma s razinama glukoze natašte i glukoze postprandijalno, kao i s HbA1c vrijednostima, vrijednosti procijenjene brzine glomerularne filtracije (eGFR, engl. *estimated glomerular filtration rate*) i trajanjem ŠBT1. Razine glukoze nakon obroka nisu povezane s C3 N-glikanima (Tablica 13), dok su razine glukoze natašte povezane samo s glikoformom C3.Asn939-N2H10 ($p = 0.032$, Tablica 14). eGFR vrijednosti također nisu pokazale statističku povezanost s C3 N-glikomom (Tablica 15). S druge strane, razine glikiranog hemoglobina statistički su značajno povezane s relativnim udjelom svih šest C3 glikoformi. Viši HbA1c povezan je s povećanjem udjela glikopeptida s više manoznih podjedinica na oba glikozilacijska mjesta (Slika 14, Tablica 16). Najveća korelacija uočena je za glikoforme C3.Asn85-N2H7 ($p = 2.67 \times 10^{-7}$) i C3.Asn939-N2H10 ($p = 1.97 \times 10^{-17}$), odnosno upravo za glikoforme s najvećim brojem manoznih podjedinica na glikozilacijskom mjestu. Također, duljina trajanja šećerne bolesti tipa 1 nije pokazala nikakav utjecaj na C3 N-glikom (Tablica 17).

Tablica 13. Povezanost razina glukoze natašte u ŠBT1 ispitanika i C3 N-glikoma predstavljena kao koeficijenti s pripadajućim p-vrijednostima.

Glikoforma	Koeficijent (B)	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	-0.002	0.377	0.663
C3.Asn85-N2H6	9.45×10^{-5}	0.878	0.878
C3.Asn85-N2H7	0.002	0.552	0.663
C3.Asn939-N2H8	-0.001	0.429	0.663
C3.Asn939-N2H9	4.98×10^{-4}	0.480	0.663
C3.Asn939-N2H10	0.003	0.445	0.663

Tablica 14. Povezanost razina postprandijalne glukoze u ŠBT1 ispitanika i C3 N-glikoma predstavljena kao koeficijenti s pripadajućim p-vrijednostima. Statistički značajne glikoforme označene su masnim slovima.

Glikoforma	Koeficijent (B)	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	-0.003	0.200	0.291
C3.Asn85-N2H6	-0.001	0.242	0.291
C3.Asn85-N2H7	0.012	0.030	0.089
C3.Asn939-N2H8	-0.004	0.138	0.276
C3.Asn939-N2H9	0.001	0.554	0.554
C3.Asn939-N2H10	0.014	0.005	0.032

Tablica 15. Povezanost eGFR vrijednosti u ŠBT1 ispitanika i C3 N-glikoma predstavljena kao koeficijenti s pripadajućim p-vrijednostima.

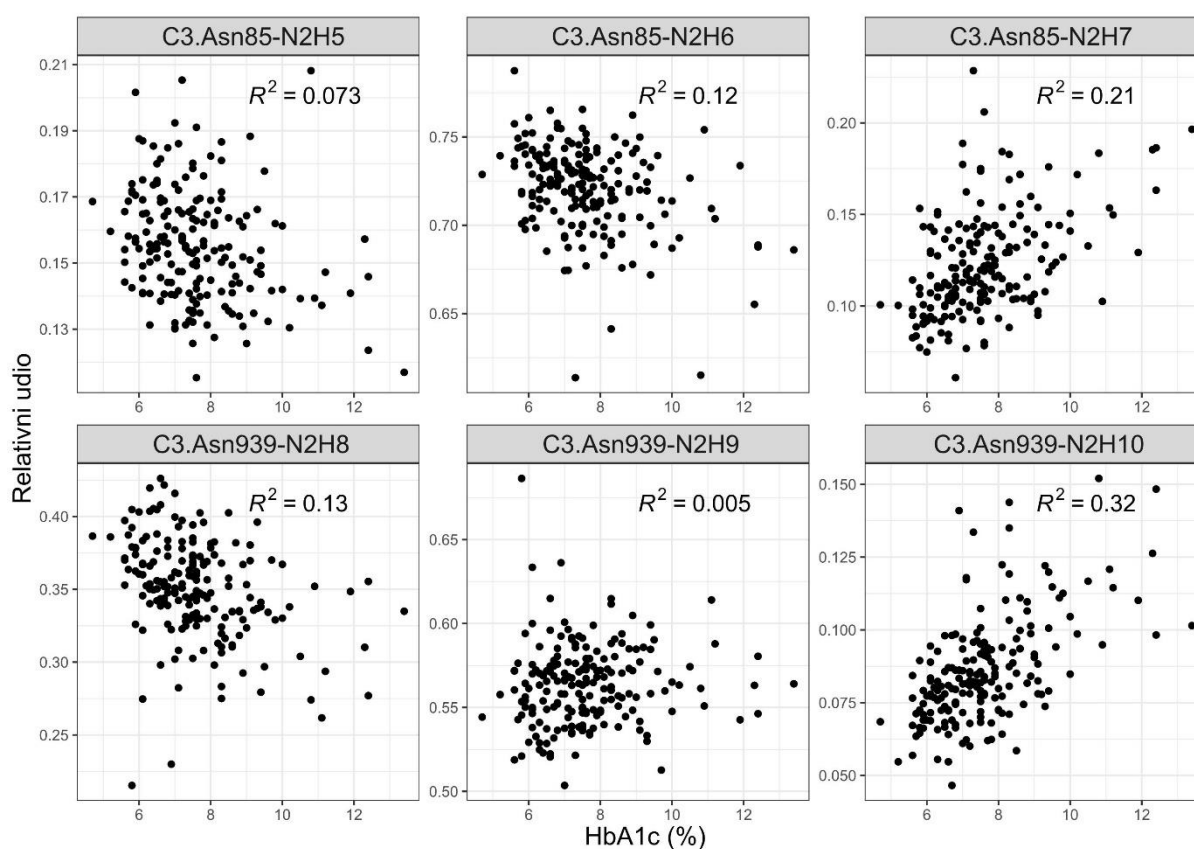
Glikoforma	Koeficijent (B)	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	-0.001	0.123	0.379
C3.Asn85-N2H6	1.07×10^{-4}	0.586	0.703
C3.Asn85-N2H7	2.83×10^{-4}	0.820	0.820
C3.Asn939-N2H8	-0.001	0.191	0.382
C3.Asn939-N2H9	3.65×10^{-4}	0.126	0.379
C3.Asn939-N2H10	0.001	0.483	0.703

Tablica 16. Povezanost razina HbA1c vrijednosti u ŠBT1 ispitanika i C3 N-glikoma predstavljena kao koeficijenti s pripadajućim p-vrijednostima. Statistički značajne glikoforme označene su masnim slovima.

Glikoforma	Koeficijent (B)	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	-0.022	9.24×10^{-5}	1.11×10^{-4}
C3.Asn85-N2H6	-0.008	6.19×10^{-6}	9.28×10^{-6}
C3.Asn85-N2H7	0.070	6.30×10^{-10}	1.89×10^{-9}
C3.Asn939-N2H8	-0.028	1.34×10^{-7}	2.67×10^{-7}
C3.Asn939-N2H9	0.004	1.21×10^{-1}	1.21×10^{-1}
C3.Asn939-N2H10	0.086	3.28×10^{-18}	1.97×10^{-17}

Tablica 17. Učinci duljine trajanja šećerne bolesti tipa 1 na C3 glikoforme predstavljeni kao koeficijenti s pripadajućim p-vrijednostima.

Glikoforma	Koeficijent (B)	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
C3.Asn85-N2H5	0.001	0.403	0.483
C3.Asn85-N2H6	4.912×10^{-4}	0.051	0.154
C3.Asn85-N2H7	-0.004	0.027	0.154
C3.Asn939-N2H8	0.001	0.124	0.186
C3.Asn939-N2H9	1.52×10^{-4}	0.620	0.620
C3.Asn939-N2H10	-0.002	0.098	0.186



Slika 14. Povezanost kontrole glikemije (mjereno razinom glikiranog hemoglobina, HbA1c) i relativnih udjela C3 glikoformi.

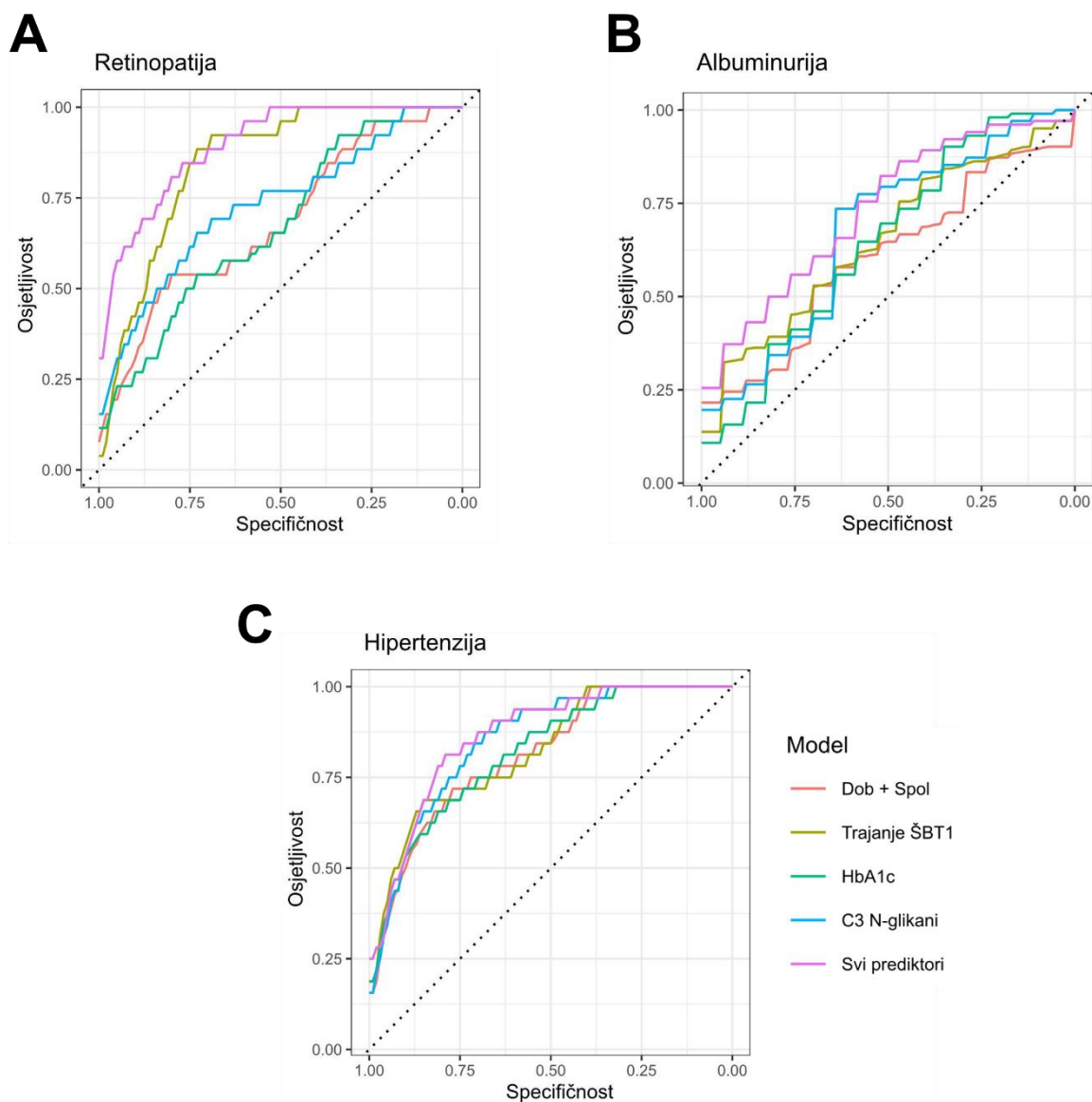
3.9. C3 N-glikani kao alat u procjeni statusa komplikacija šećerne bolesti tipa 1

S ciljem testiranja mogućnosti C3 N-glikana za razlikovanje ŠBT1 ispitanika s i bez komplikacija, kao i onih s hipertenzijom, napravljeni su diskriminativni modeli temeljeni na C3 N-glikomu za retinopatiju, albuminuriju i hipertenziju. Štoviše, bilo je potrebno evaluirati pružaju li C3 N-glikani kao prediktori neke dodatne informacije koje već nisu obuhvaćene

HbA1c razinama i duljinom trajanja bolesti. Iz tog je razloga napravljeno nekoliko diskriminativnih modela koji su zatim procijenjeni krivuljama operativne karakteristike prijemnika (ROC) i njihovih pripadajućih AUC vrijednosti. Nulti model je imao samo spol i dob kao prediktore, dok su ostali modeli uz dob i spol imali i dodatne prediktore (puni model ih je imao sve).

Za retinopatiju i albuminuriju, kategorije 2 i 3 grupirane su kako bi se dobio binarni odgovor: s/bez komplikacije. Diskriminativni modeli za retinopatiju su prikazani na Slici 15A. Iako trajanje bolesti sadrži većinu informacija potrebnih za razlikovanje ŠBT1 ispitanika po pitanju njihovog statusa retinopatije (AUC 0.847, 95 % CI 0.764 – 0.913), uključivanje glikana dodatno pojačava diskriminativnu moć (AUC 0.895, 95 % CI 0.823– 0.951). Zanimljivo je da su sami glikani (AUC 0.730, 95 % CI 0.603 – 0.842) bili bolji od tradicionalnih markera kao što su razine glikiranog hemoglobina HbA1c (AUC 0.673, 95 % CI 0.558 – 0.782). Kod albuminurije, C3 N-glikani nisu pokazali diskriminirajuću snagu za razlikovanje ŠBT1 ispitanika s albuminurijom od ispitanika bez ove komplikacije (Slika 15B.).

Diskriminativni modeli hipertenzije prikazani su na Slici 15C. HbA1c (AUC 0.817, 95 % CI 0.723 – 0.892) i trajanje ŠBT1 (AUC 0.820, 95 % CI 0.729 – 0.899) nisu mnogo informativniji prediktori od nultog modela (AUC 0.812, 95 % CI 0.719 – 0.889), dok glikani pokazuju nešto veću diskriminativnu moć (AUC 0.852, 95 % CI 0.769 – 0.920), blisku punom modelu (AUC 0.864, 95 % CI 0.784 – 0.925).



Slika 15. ROC krivulje diskriminativnih modela za komplikacije šećerne bolesti tipa 1: (A) retinopatija, (B) albuminurija i (C) hipertenzija. Nulti model (crveni) koristi samo spol i dob kao prediktore, dok puni (ljubičasti) model uključuje sve ispitivane prediktore

4. RASPRAVA

4.1. Novorazvijena metoda za analizu C3 N-glikoma

Jedan od ciljeva ovog doktorskog rada bilo je odrediti profil N-glikozilacije komponente komplementa C3 u djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1. Zbog nedostatka prikladnih metoda, u tu je svrhu prvo bilo potrebno razviti novu visokoprotočnu metodu za obogaćivanje C3 glikoproteina iz plazme ili seruma i posljedičnu MS analizu njegove N-glikozilacije. S obzirom da je komponenta komplementa C3 prilično specifična po tome što sadrži isključivo visoko-manozne glikane te se time razlikuje od većine ostalih proteina plazme (57,61,67), upravo je glikanski dio ovog glikoproteina odabran kao temelj za njegovo obogaćivanje, te je kao lektinski medijator odabran Concanavalin A (Con A). Iako je Con A eluat i dalje razmjerno kompleksna smjesa različitih glikoproteina, takav je uzorak ipak znatno manje kompleksan u odnosu na početni uzorak plazme, te omogućuje uspješnu daljnju analizu. Korištenje endoproteinaze Glu-C prilikom digestije pokazalo se znatno prikladnije za analizu C3 glikopeptida od inače mnogo češće korištenog tripsina, prvenstveno zbog toga što se triptički (gliko)peptid koji sadrži C3 N-glikozilacijsko mjesto sastojao od svega tri aminokiseline. Razdvajanje takvog tripeptida na C18 koloni se zbog velike količine glikana na njemu pokazalo prilično neuspješno i neponovljivo, a ti su problemi uspješno riješeni odabirom Glu-C enzima za digestiju. Nakon digestije, daljnje pročišćavanje uzorka i obogaćivanje glikopeptida od interesa provodi se ekstrakcijom na čvrstoj fazi pomoću tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (HILIC-SPE, engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography - solid phase extraction*). Pročišćeni glikopeptidi nakon tog su koraka napokon spremni za razdvajanje temeljeno na tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza spregnutoj sa spektrometrom masa ionizacijom elektroraspršenjem (RP-LC-ESI-MS, engl. *reverse phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*). Razdvajanje glikopeptida temelji se na njihovom peptidnom dijelu te se odvija na C18 koloni, a cjelokupna nano-LC-MS analiza traje svega 21 minutu. Rezultati istraživanja ovog doktorskog rada pokazali su da je novorazvijenom metodom iz svega 10 mikrolitara krvne plazme ili seruma moguće uspješno odrediti C3 N-glikanski profil na robustan i ponovljiv način.

Koliko znamo, ovo je prva strukturna MS identifikacija C3 glikoformi i verifikacija njegovih glikozilacijskih mjesta. Rezultati istraživanja u sklopu ovog doktorskog rada potvrdili su pronalazke prethodnih studija o postojanju dva zauzeta glikozilacijska mjesta (od potencijalna tri) na C3 glikoproteinu, kao i činjenicu da su prisutni isključivo visoko-manozni glikani. Ovo je ujedno i prvo istraživanje intraindividualne stabilnosti C3 N-glikozilacije u zdravih osoba,

što je uvjet za eventualno korištenje C3 N-glikoma u diferencijalne, dijagnostičke ili prognostičke svrhe.

Iako su mnogi proteinski biomarkeri koji su trenutno u kliničkoj uporabi glikoproteini, njihova N-glikozilacija često je prilično rudimentarno istražena. Budući da na N-glikom znatno utječe okoliš, odražavajući tako individualne stilove života koji nadilaze naslijeđenu genetsku pozadinu, promjene u N-glikozilaciji mogle bi nam pružiti vrijedne informacije o patološkim stanjima (123). N-glikozilacija komponente komplemента C3 pokazala se uglavnom stabilnom u fiziološkim uvjetima, s time da je njezina intraindividualna varijacija manja od varijacije između pojedinaca. Kako bismo uklonili učinak ženskog hormonskog ciklusa i dobi, ispitanici su bili mladi muškarci, tako da naši rezultati predstavljaju minimalnu interindividualnu varijaciju. U populaciji je za očekivati da će razlike među pojedincima stoga biti još i veće, što sve ide u prilog razmatranju C3 N-glikoma kao potencijalnog biomarkera.

4.2. C3 N-glikom u novodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1

Visoko-manozne glikanske strukture često se definiraju kao nezreli N-glikani, budući da preskaču kasnije korake obrade u Golgijevu aparatu kroz koje prolazi većina N-glikana (2). Promjene razina visoko-manoznih N-glikana u ljudi povezane su s progresijom tumora, osobito kod raka dojke i prostate (124,125). Osim toga, a vezano za šećernu bolest tipa 1, prethodne studije N-glikozilacije ukupnih proteina krvne plazme otkrile su značajnu povezanost ovog tipa N-glikana i smanjenja bubrežne funkcije kod ŠBT1 ispitanika (48,49), a zabilježen je i porast lektina koji veže manozu (MBL, engl. *mannose binding lectin*) (55). Uzimajući u obzir da C3 N-glikom sadrži isključivo visoko-manozne N-glikane i da postoji sve više dokaza da sustav komplemента ima važnu ulogu u ŠBT1 (4), aberacije N-glikozilacije C3 glikoproteina potencijalno bi mogle pružiti vrijedan biomarker patofiziologije šećerne bolesti tipa 1.

Uzimajući u obzir sve navedeno, nakon što je novorazvijena metoda za analizu C3 N-glikoma uspješno validirana, metoda je primijenjena na uzorcima djece i adolescenata novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 1, kao i njihovoj zdravoj braći i sestrama. Ovo je istraživanje utvrdilo statistički značajnu promjenu četiri C3 N-glikoforme u novodijagnosticiranoj ŠBT1 u odnosu na kontrolnu skupinu. Na oba glikozilacijska mjesta primijećeno je povećanje udjela manje prerađenih glikana (odnosno, glikana s više manoznih podjedinica) kod djece sa ŠBT1 u odnosu na njihovu zdravu braću i sestre: povećanje razina Man₇GlcNAc₂ i smanjenje razina Man₅GlcNAc₂ pronađeno je na glikozilacijskom mjestu C3.Asn85, dok je mjesto C3.Asn939 karakterizirano značajnim povećanjem razina

Glc₁Man₉GlcNAc₂ i smanjenjem razina Man₈GlcNAc₂. Zanimljivo je da su relativni udjeli glikoformi Man₆GlcNAc₂ i Man₉GlcNAc₂, glikoformi s centralnim brojem manoznih podjedinica na oba glikozilacijska mjesta, ostali nepromijenjeni. Najveća uočena promjena bila je u monoglukoziliranoj glikoformi Glc₁Man₉GlcNAc₂ (OR = 1.28, p = 1.78 × 10⁻⁸). Ove značajne promjene u C3 N-glikomu omogućile su razvoj diskriminativnog modela za ŠBT1 temeljenog na C3 N-glikanskim profilima koji je pokazao solidnu diskriminativnu moć (AUC 0.879). Ovaj je model prilično usporediv s prethodno objavljenim glikanskim modelom temeljenom na ukupnom N-glikomu glikoproteina krvne plazme, ali ne pati od nekih njegovih nedostataka. Naime, kod analize ukupnog plazmatskog N-glikoma može doći do maskiranja glikanskih promjena na račun promijenjenih koncentracija proteina koji su nositelji upravo tih glikana. Također, upravo te proteinske promjene mogu biti i uzrokom promijenjenog ukupnog glikoma krvne plazme, bez prave promjene glikanskih profila na svakom pojedinom proteinu. Analiza glikoma pojedinog proteina takve mogućnosti otklanja, te garantira postojanje i specifičnost promjena. Dokazani diskriminativni potencijal C3 N-glikoma pokazuje da bi ciljana analiza glikanskih profila ovog glikoproteina mogla pomoći u identificiranju osoba s povećim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 1.

Rezultati ovog straživanja potvrdili su prethodna opažanja promjene razina visoko-manoznih glikana ukupnih plazmatskih proteina u populaciji ispitanika novodijagnosticiranih sa ŠBT1. Štoviše, budući da na ukupni plazmatski N-glikom utječe koncentracija svakog pojedinog proteina, ovo je istraživanje osnažilo zaključak da uočene promjene nisu samo posljedica varijacije proteinskih koncentracija, već se one očituju i u glikomu pojedinog proteina. Novorazvijena LC-MS analiza C3 N-glikozilacije jamči da su glikozilacijske promjene specifične za navedeni protein neovisno o ostalim glikoproteinima u uzorku. Rezultati ovog istraživanja su stoga doista posljedica varijacije u glikozilaciji komponente komplementa C3, a ne samo rezultat varijacije koncentracije ovog glikoproteina. Obzirom da su ispitanici mlade osobe na početku bolesti, uočene glikozilacijske promjene mogu se povezati sa samom etiologijom bolesti. Osim toga, mlada populacija manje je pod utjecajem drugih komorbiditeta koji se viđaju u odrasloj populaciji, što omogućuje preciznije istraživanje specifičnih promjena vezanih za sam nastanak bolesti. Iako bi se moglo tvrditi da ispitivanje na srodnoj populaciji poput ove (ispitanici i kontrolna skupina su braća i sestre) smanjuje razlike između ispitanika i kontrolne skupine zbog genetske sličnosti ali i zajedničkih okolišnih uvjeta, činjenica jest da se upravo zbog toga uočene razlike vjerojatnije mogu pripisati etiološkim procesima bolesti.

Važno je napomenuti da nas ovakav dizajn studije ograničava u zaključcima o tome jesu li uočene promjene N-glikozilacije C3 glikoproteina uzročnik bolesti ili su pak samo sekundarne u odnosu na bolest. Promjene udjela C3 glikoformi možda su doista čimbenik rizika za ŠBT1 *per se*, no potencijalno samo reflektiraju stanje bolesti. Jedno od potencijalnih objašnjenja povećanja udjela manje prerađenih C3 N-glikana u ŠBT1 jest činjenica da osim glavne proizvodnje u jetri, bubrezi (126) i otočići gušterače (127) također snažno eksprimiraju komponentu komplementa C3, pridonoseći njegovoj ukupnoj proizvodnji s oko 4 %. Konkretno, aberantni glikanski profil lokalnog C3 glikoproteina mogao bi se objasniti stresom endoplazmatskog retikuluma (ER) tipičnim za stanice bubrega i gušterače u ŠBT1. Naime, beta stanice gušterače vrlo su osjetljive na ER stres zbog velikog lučenja inzulina. U šećernoj bolesti tipa 1, funkcionalne beta stanice doživljavaju pojačan ER stres tijekom pokušaja kompenzacije susjednih stanica koje su postale disfunkcionalne, dodatno ugrožavajući vlastiti opstanak (128,129). S druge strane, visoki ER stres izazvan glukozom u epitelnim stanicama bubrežnih tubula smatra se jednim od ključnih pokretača progresije dijabetičke nefropatije (130). N-glikani su već predloženi kao potencijalni deskriptori stresa endoplazmatskog retikuluma, a pomak prema manje prerađenim N-glikanima s više manoznih podjedinica pokazao se značajnim *in vitro* (131). Opažene promjene C3 glikozilacije stoga su vjerojatno povezane s prisutnošću ER stresa i mogle bi biti marker njegove progresije i progresije same ŠBT1. Štoviše, s obzirom na činjenicu da autoimuno uništavanje beta stanica koje proizvode inzulin može započeti godinama prije kliničke dijagnoze (34), promjene u C3 N-glikomu potencijalno su prisutne čak i prije pojave samih simptoma bolesti. Dokazane promjene C3 N-glikoma u ŠBT1 ispitanicima u odnosu na zdrave kontrole, kao i njegova pokazana snažna diskriminativna moć, čine analizu profila C3 N-glikana potencijalnim alatom za procjenu rizika od šećerne bolesti tipa 1.

4.3. C3 N-glikom u ŠBT1 komplikacijama

Nakon utvrđivanja C3 N-glikozilacijskih promjena u ranodijagnosticiranoj šećernoj bolesti tipa 1, u nastavku istraživanja željelo se ispitati utjecaj komplikacija koje prate ovu bolest na C3 N-glikom. Unatoč snažnoj osnovi za očekivanje C3 N-glikozilacijskih promjena (48,49,58,59,132), N-glikom komponente komplementa C3 u komplikacijama šećerne bolesti tipa 1 do sada nije istražen. Rezultati ovog istraživanja pokazala su nekoliko glikozilacijskih promjena C3 glikoproteina u komplikacijama ŠBT1, kao i u hipertenziji u ovoj bolesti. Uočeno je da ispitanici sa ŠBT1 s teškom albuminurijom pokazuju povećanje udjela manje obrađenih glikanskih struktura s više manoznih podjedinica na glikozilacijskom mjestu C3.Asn939. Isti

trend uočen je i kod hipertenzije, ali ovaj put na oba glikozilacijska mjesta. Osim toga, razina najmanje prerađene C3 glikoforme $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ značajno se povećala u neproliferativnoj retinopatiji koja prati ŠBT1, kao i u teškoj albuminuriji koja se javlja uz ŠBT1. Ipak, ponovno je važno naglasiti da u ovako dizajniranoj studiji ne možemo spekulirati o uzročnosti promatranih glikanskih promjena, niti možemo pratiti njihove dugoročne ishode. Također, jedno od ograničenja ovog istraživanja je nedostatak kontrolne skupine koja bi omogućila otkrivanje promjena C3 N-glikoma ne samo u progresiji komplikacija u ŠBT1, već i utvrđivanje razlika u odnosu na zdrave pojedince.

Prethodne studije već su pokazale međuovisnost serumskih visoko-manoznih N-glikana i eGFR vrijednosti kod osoba sa šećernom bolesti tipa 1 (48,49). Ova su istraživanja uočila trend prema složenijim ukupnim serumskim N-glikanima s progresivnim padom bubrežne funkcije (mjereno strmijim padom eGFR-a). Iako su među uočenim glikozilacijskim promjenama bili i udjeli visoko-manoznih glikana, činjenica da je ovo istraživanje pokazalo da C3 N-glikom nije povezan s eGFR vrijednostima upućuje na zaključak da C3 glikoprotein nije uzrok prethodno uočenih promjena u ukupnom serumskom N-glikomu. Unatoč tome, važno je naglasiti da je ovo istraživanje uključivalo ispitanike s vrijednostima eGFR >60 ml/min/1.73 m². S druge strane, zabilježene su jasne promjene ukupnog plazmatskog N-glikoma kod osoba sa šećernom bolesti tipa 2 s prevalentnom retinopatijom, pri čemu je najjača povezanost bila omjer visoko-manoznih i hibridnih glikana (133). Budući da je ovo istraživanje pokazalo da je C3 N-glikom promijenjen u neproliferativnoj dijabetičkoj retinopatiji u ŠBT1, prethodno uočena promjena visoko-manoznih glikana u ukupnom plazmatskom N-glikomu mogla bi biti posljedica promijenjene glikozilacije C3 glikoproteina. Što se tiče hipertenzije, poznato je da su i sistolički i dijastolički krvni tlak povezani s ukupnim N-glikanima plazme (134), te da glikom specifičnog proteina poput imunoglobulina G značajno pridonosi patogenezi hipertenzije (135,136). Ova studija je pokazala statistički značajne promjene profila C3 N-glikana u hipertenziji u ŠBT1, što ukazuje na ulogu ovog proteina u njenom razvoju. Nadalje, pokazalo se da loša kontrola glikemije i kod šećerne bolesti tipa 1 i tipa 2 mijenja N-glikom, s povišenim razinama HbA1c povezanim s povećanom kompleksnošću glikanskih struktura u plazmi (40,48). Unatoč tome, ove studije nisu mogle odrediti točne glikoproteine koji su uzrok ovih promjena. Ovo je istraživanje pokazalo da lošija kontrola glikemije kod šećerne bolesti tipa 1 mijenja glikozilaciju čak i na razini jednog proteina – komponente komplemента C3.

Dugotrajna hiperglikemija tipična za šećernu bolest tipa 1 uzrokuje oštećenje tkiva izazvano glukozom, za koje se pretpostavlja da je posredovano nizom biosintetskih puteva, uključujući

povećan protok glukoze kroz heksozaminski biosintetski put (HBP, engl. *hexosamine biosynthetic pathway*). U uvjetima hiperglikemije postotak ukupne glukoze u navedenom biosintetskom putu potencijalno bi se mogao povećati što bi posljedično dovelo do povećane proizvodnje krajnjeg produkta uridin difosfat *N*-acetil-glukozamina (UDP-GlcNAc), jednog od supstrata za glikozilaciju proteina (42,137). Ovaj je mehanizam predložen kao pozadina opaženih promjena *N*-glikozilacije u krvnoj plazmi kod šećerne bolesti poput povećanja udjela visoko razgranatih *N*-glikana (40,48). Međutim, ovo je objašnjenje manje vjerojatno za komponentu komplementa C3 koja sadrži isključivo visoko-manozne glikane koji primarno ne ovise o količini dostupnog UDP-GlcNAc. Povećanje udjela manje prerađenih glikana s više manoznih podjedinica sugerira ranije prekidanje glikozilacijske dorade, što bi potencijalno mogla biti posljedica ER stresa tipičnog za stanice bubrega i gušterače u ovoj bolesti (128,130). Uz činjenicu da i gušterača i bubrezi također ekspimiraju C3 (126,127), uočene promjene C3 *N*-glikoma mogle bi potjecati upravo od tih aberantnih glikanskih profila lokalnog C3 glikoproteina.

Otprije je poznato da ukupni plazmatski *N*-glikani poboljšavaju predviđanje šećerne bolesti tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti čak i bolje od tradicionalnih biomarkera (41). Budući da su ovim istraživanjem C3 *N*-glikanski profili povezani s uobičajeno korištenim markerima kao što su razine HbA1c i glukoze natašte, C3 *N*-glikani mogli biti novi alat za procjenu kvalitete kontrole glikemije u ŠBT1. Dodatno je to potkrijepljeno činjenicom da neki aspekti loše kontrole glikemije relevantni za razvoj komplikacija u ŠBT1 nisu obuhvaćeni spomenutim tradicionalnim biomarkerima. Naime, diskriminativni modeli komplikacija u ŠBT1 s HbA1c kao dodatnim prediktorom pokazuju sličnu diskriminativnu moć kao modeli koji koriste samo dob i spol kao prediktore, dok C3 glikani uglavnom imaju veću diskriminativnu moć. Sve navedeno upućuje na to da bi C3 *N*-glikani mogli obuhvatiti povezanost kontrole glikemije s komplikacijama u ŠBT1 koja nije obuhvaćena HbA1c razinama.

Budući da su se uočene promjene C3 *N*-glikoma pokazale neovisnima o trajanju bolesti i potvrdile promjene uočene kod novodijagnosticirane šećerne bolesti tipa 1 u usporedbi s kontrolnom skupinom, potencijalno bi se mogle koristiti kao biomarker komplikacija u ŠBT1. Naime, promijenjeni C3 glikanski profili mogli bi biti prisutni u trenutku postavljanja dijagnoze ŠBT1 (ili čak i prije), te time upućivati na osobe s povećim rizikom od razvoja komplikacija koje prate ovu bolest. Uzimajući u obzir značajno povećanje udjela određene glikoforme (C3.Asn939-N2H10) u bolesnika s početnom albuminurijom i neproliferativnom retinopatijom u usporedbi s podskupinom bez komplikacija, čini se da bi se upravo ta C3 glikoforma

potencijalna mogla iskoristiti kao temelj pojednostavljene analitičke metode za rano otkrivanje komplikacija i praćenje progresije same šećerne bolesti tipa 1.

5. ZAKLJUČCI

Novorazvijenom je metodom moguće uspješno i ponovljivo analizirati N-glikozilaciju komponente komplementa C3 iz 10 µl krvne plazme ili seruma stotina uzoraka u kratkom vremenskom razdoblju od svega nekoliko dana. Metoda C3 glikoprofiliranja temelji se na obogaćivanju ovog glikoproteina iz krvne plazme ili seruma pomoću lektina Concanavalin A (Con A) te analizi njegovih glikopeptida korištenjem tekućinske kromatografije obrnutih faza spregnute sa spektrometrom masa ionizacijom elektroraspršenjem.

Ovim istraživanjem spektrometrijom masa je određen i potvrđen otprije poznat isključivo visoko-manozni repertoar glikanskih struktura na C3 glikoproteinu, kao i pozicije njegovih N-glikozilacijskih mjesta.

Varijacije C3 N-glikoma između zdravih pojedinaca veće su od intraindividualnih varijacija kroz vrijeme pri fiziološkim uvjetima, ukazujući time na temporalnu stabilnost C3 N-glikanskih profila kod zdravih pojedinaca te omogućujući njegovo potencijalno razmatranje kao biomarkera.

Djeca i adolescenti s novodijagnosticiranom šećernom bolesti tipa 1 imaju promijenjen C3 N-glikom u odnosu na njihovu zdravu braću i sestre. Kod ŠBT1 ispitanika prisutan je pomak prema većim relativnim udjelima manje obrađenih C3 N-glikana s većim brojem manoznih podjedinica, i to na oba glikozilacijska mjesta. Na temelju uočenih razlika moguće je napraviti uspješan diskriminativni model za šećernu bolest tipa 1 temeljen na C3 glikopeptidima.

Promjene C3 N-glikoma prisutne su kod ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s različitim statusom komplikacija koje prate ovu bolest. Ovim je istraživanjem pokazano da su udjeli C3 glikopeptida promijenjeni u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s teškom albuminurijom, kao i kod ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s neproliferativnom retinopatijom ili pak hipertenzijom. Pušački status ispitanika sa ŠBT1 nema utjecaj na C3 N-glikanske profile.

C3 N-glikom povezan je s HbA1c razinama u odraslih ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1. Veće vrijednosti glikiranog hemoglobina povezane su s pomakom prema većem udjelu manje

obrađenih C3 glikopeptida s više manoznih podjedinica na oba glikozilacijska mjesta. Duljina trajanja šećerne bolesti tipa 1, kao i eGFR vrijednosti nisu pokazale povezanost s C3 N-glikomom.

Budući da je skoro za sve testirane asocijacije monoglukozilirana glikoforma $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ uglavnom pokazivala statistički najveće efekte, daljnji razvoj metode za kliničku primjenu potencijalno bi se temeljio upravo na određivanju samo ove C3 glikoforme, a ne čitavog C3 N-glikoma, čime bi se razvila ciljana metoda bazirana na jednostavnijem i bržem analitičkom pristupu.

6. POPIS LITERATURE

1. Krištić J, Lauc G. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. *Methods Mol Biol.* 2017;1503:1–12.
2. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cited 2022 Sep 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579918/>
3. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Aug;1860(8):1574–82.
4. Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation--an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst.* 2010 Dec;6(12):2373–9.
5. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Jun 22;13(7):448–62.
6. Springer SA, Gagneux P. Glycomics: Revealing the Dynamic Ecology and Evolution of Sugar Molecules. *J Proteomics.* 2016 Mar 1;135:90–100.
7. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Dec;21(12):729–49.
8. 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.
9. Hu M, Lan Y, Lu A, Ma X, Zhang L. Glycan-based biomarkers for diagnosis of cancers and other diseases: Past, present, and future. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2022 Sep 11]. p. 1–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117318301509>
10. Knezevic A, Gornik O, Polasek O, Pucic M, Redzic I, Novokmet M, et al. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology.* 2010 Aug;20(8):959–69.
11. Lee HS, Qi Y, Im W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Sci Rep.* 2015 Mar 9;5:8926.
12. 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.
13. Marek KW, Vijay IK, Marth JD. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology.* 1999 Nov;9(11):1263–71.
14. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014 Feb;18(1):1–14.

15. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019 Jun;15(6):346–66.
16. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*. 2001 Mar 23;291(5512):2364–9.
17. Trombetta ES. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology*. 2003 Apr 17;13(9):77R – 91.
18. Holst S, Wilding JL, Koprowska K, Rombouts Y, Wuhrer M. N-Glycomic and Transcriptomic Changes Associated with CDX1 mRNA Expression in Colorectal Cancer Cell Lines. *Cells*. 2019 Mar 22;8(3):273.
19. Etxebarria J, Reichardt NC. Methods for the absolute quantification of N-glycan biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2016 Aug;1860(8):1676–87.
20. Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*. 2009 Dec 1;19(12):1547–53.
21. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconjugate Journal*. 2016;33:309.
22. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis Markers*. 2008;25(4–5):267–78.
23. Blaschke CRK, Black AP, Mehta AS, Angel PM, Drake RR. Rapid N-Glycan Profiling of Serum and Plasma by a Novel Slide-Based Imaging Mass Spectrometry Workflow. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2020 Dec 2;31(12):2511–20.
24. Arnold JN, Saldova R, Hamid UMA, Rudd PM. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics*. 2008 Aug;8(16):3284–93.
25. Wessels HJ, Kulkarni P, van Dael M, Suppers A, Willems E, Zijlstra F, et al. Plasma glycoproteomics delivers high-specificity disease biomarkers by detecting site-specific glycosylation abnormalities [Internet]. *Molecular Biology*; 2022 May [cited 2022 Sep 16]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.05.31.494121>
26. Reiding KR, Bondt A, Hennig R, Gardner RA, O’Flaherty R, Trbojević-Akmačić I, et al. High-throughput Serum N-Glycomics: Method Comparison and Application to Study Rheumatoid Arthritis and Pregnancy-associated Changes. *Mol Cell Proteomics*. 2019 Jan;18(1):3–15.
27. Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, et al. Glycans In The Immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A Critical Review. *J Autoimmun*. 2015 Feb;0:1–13.
28. Martinić Kavur M, Lauc G, Pezer M. 1.19 - Systems Glycobiology: Immunoglobulin G Glycans as Biomarkers and Functional Effectors in Aging and Diseases. In: Barchi JJ, editor. *Comprehensive Glycoscience (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2021

[cited 2022 Sep 17]. p. 439–78. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128194751000869>

29. 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. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2021 Jan 1;20:100044.
30. Ajjan RA, Schroeder V. Role of complement in diabetes. *Molecular Immunology*. 2019 Oct;114:270–7.
31. Boldison J, Wong FS. Immune and Pancreatic β Cell Interactions in Type 1 Diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Dec;27(12):856–67.
32. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014 Jan 4;383(9911):69–82.
33. Zajec A, Trebušak Podkrajšek K, Tesovnik T, Šket R, Čugalj Kern B, Jenko Bizjan B, et al. Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. *Genes*. 2022 Apr;13(4):706.
34. Simmons KM, Michels AW. Type 1 diabetes: A predictable disease. *World J Diabetes*. 2015 Apr 15;6(3):380–90.
35. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006 Mar 11;367(9513):847–58.
36. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of Type 1 Diabetes Mellitus. *Mol Aspects Med*. 2015 Apr;42:42–60.
37. Wang J, Miao D, Babu S, Yu J, Barker J, Klingensmith G, et al. Prevalence of autoantibody-negative diabetes is not rare at all ages and increases with older age and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jan;92(1):88–92.
38. McMillan DE. Elevation of Glycoprotein Fucose in Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 1972 Aug 1;21(8):863–71.
39. Juszczak A, Pavić T, Vučković F, Bennett AJ, Shah N, Pape Medvidović E, et al. Plasma Fucosylated Glycans and C-Reactive Protein as Biomarkers of HNF1A-MODY in Young Adult-Onset Nonautoimmune Diabetes. *Diabetes Care*. 2019 Jan;42(1):17–26.
40. 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 (Berlin)*. 2017;60(12):2352–60.
41. 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.
42. Rudman N, Gornik O, Lauc G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Letters*. 2019;593(13):1598–615.

43. 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.
44. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov;1833(11):2430–7.
45. 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 6;129(1):123–34.
46. Taparra K, Tran PT, Zachara NE. Hijacking the Hexosamine Biosynthetic Pathway to Promote EMT-Mediated Neoplastic Phenotypes. *Front Oncol*. 2016;6:85.
47. 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.
48. Bermingham ML, Colombo M, McGurnaghan SJ, Blackburn LAK, Vučković F, Pučić Baković M, et al. N-Glycan Profile and Kidney Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2018 Jan;41(1):79–87.
49. Colombo M, Asadi Shehni A, Thoma I, McGurnaghan SJ, Blackburn 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.
50. 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;65(8):1315–27.
51. Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, Lambris JD. Complement component C3 - The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev*. 2016 Nov;274(1):33–58.
52. Rudman N, Kaur S, Simunović V, Kifer D, Šoić D, Keser T, et al. Integrated glycomics and genetics analyses reveal a potential role for N-glycosylation of plasma proteins and IgGs, as well as the complement system, in the development of type 1 diabetes. *Diabetologia*.
53. Axelgaard E, Østergaard JA, Thiel S, Hansen TK. Diabetes Is Associated with Increased Autoreactivity of Mannan-Binding Lectin. *J Diabetes Res*. 2017;2017:6368780.
54. Gao X, Liu H, He B, Fu Z. Resistance to Streptozotocin-Induced Autoimmune Diabetes in Absence of Complement C3: Myeloid-Derived Suppressor Cells Play a Role. *PLoS One*. 2013 Jun 18;8(6):e66334.
55. 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;88(10):4857–61.

56. Ghosh P, Sahoo R, Vaidya A, Chorev M, Halperin JA. Role of Complement and Complement Regulatory Proteins in the Complications of Diabetes. *Endocr Rev.* 2015 Jun;36(3):272–88.
57. Hase S, Kikuchi N, Ikenaka T, Inoue K. Structures of Sugar Chains of the Third Component of Human Complement. *The Journal of Biochemistry.* 1985 Oct;98(4):863–74.
58. Hertle E, van Greevenbroek MMJ, Stehouwer CDA. Complement C3: an emerging risk factor in cardiometabolic disease. *Diabetologia.* 2012;55(4):881–4.
59. Kelly KJ, Liu Y, Zhang J, Dominguez JH. Renal C3 Complement Component: Feed Forward to Diabetic Kidney Disease. *Am J Nephrol.* 2015;41(1):48–56.
60. 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 Jun 16;6(1):27887.
61. Max Crispin MD, Ritchie GE, Critchley AJ, Paul Morgan B, Wilson IA, Dwek RA, et al. Monoglucosylated glycans in the secreted human complement component C3: implications for protein biosynthesis and structure. *FEBS Letters.* 2004 May 21;566(1–3):270–4.
62. Tack BF, Morris SC, Prahl JW. Third Component of Human Complement: Structural Analysis of the Polypeptide Chains of C3 and C3bt. :7.
63. Pasch MC, van den Bosch NHA, Bos JD, Asghar SS, Daha MR. Synthesis of Complement Components C3 and Factor B in Human Keratinocytes is Differentially Regulated by Cytokines. *Journal of Investigative Dermatology.* 2000 Jan 1;114(1):78–82.
64. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2015 [cited 2022 Sep 20];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00262>
65. Engstrom G, Hedblad B, Eriksson KF, Janzon L, Lindgarde F. Complement C3 Is a Risk Factor for the Development of Diabetes: A Population-Based Cohort Study. *Diabetes.* 2005 Feb 1;54(2):570–5.
66. Ritchie GE, Moffatt BE, Sim RB, Morgan BP, Dwek RA, Rudd PM. Glycosylation and the Complement System. *Chem Rev.* 2002 Feb 1;102(2):305–20.
67. Hirani S, Lambris JD, Müller-Eberhard HJ. Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides of human complement component C3. *Biochemical Journal.* 1986 Jan 15;233(2):613–6.
68. Thorgersen EB, Barratt-Due A, Haugaa H, Harboe M, Pischke SE, Nilsson PH, et al. The Role of Complement in Liver Injury, Regeneration, and Transplantation. *Hepatology.* 2019 Aug;70(2):725–36.
69. Rudd PM, Dwek RA. Glycosylation: Heterogeneity and the 3D Structure of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 1997 Jan;32(1):1–100.

70. Parodi AJ. The quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, a trip from trypanosomes to mammals. *Braz J Med Biol Res.* 1998 May;31:601–14.
71. Ryu KS, Lee JO, Kwon TH, Choi HH, Park HS, Hwang SK, et al. The presence of monoglucosylated N196-glycan is important for the structural stability of storage protein, arylphorin. *Biochemical Journal.* 2009 Jul 1;421(1):87–96.
72. Tack BF, Prah J. Third component of human complement: purification from plasma and physicochemical characterization. *Biochemistry.* 1976 Oct 5;15(20):4513–21.
73. O'Rear LD, Ross GD. Isolation and Purification of C3 from Human Plasma. *Current Protocols in Immunology* [Internet]. 1994 Jun [cited 2021 Aug 31];10(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im1303s14>
74. Hammer CH, Wirtz GH, Renfer L, Gresham HD, Tack BF. Large scale isolation of functionally active components of the human complement system. *Journal of Biological Chemistry.* 1981 Apr;256(8):3995–4006.
75. Basta M, Hammer CH. A rapid FPLC method for purification of the third component of human and guinea pig complement. *Journal of Immunological Methods.* 1991 Aug;142(1):39–44.
76. Cao L, Diedrich JK, Ma Y, Wang N, Pauthner M, Park SKR, et al. Global site-specific analysis of glycoprotein N-glycan processing. *Nat Protoc.* 2018 Jun;13(6):1196–212.
77. Go EP, Liao HX, Alam SM, Hua D, Haynes BF, Desaire H. Characterization of Host-Cell Line Specific Glycosylation Profiles of Early Transmitted/Founder HIV-1 gp120 Envelope Proteins. *J Proteome Res.* 2013 Mar 1;12(3):1223–34.
78. Han L, Costello CE. Mass Spectrometry of Glycans. *Biochemistry (Mosc).* 2013 Jul;78(7):710–20.
79. de Haan N, Pučić-Baković M, Novokmet M, Falck D, Lageveen-Kammeijer G, Razdorov G, et al. Developments and perspectives in high-throughput protein glycomics: enabling the analysis of thousands of samples. *Glycobiology.* 2022 Aug 1;32(8):651–63.
80. Sherman RM, Salzberg SL. Pan-genomics in the human genome era. *Nat Rev Genet.* 2020 Apr;21(4):243–54.
81. Ruhaak LR, Xu G, Li Q, Goonatilleke E, Lebrilla CB. Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. *Chem Rev.* 2018 Sep 12;118(17):7886–930.
82. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature.* 1985 Aug 1;316(6027):452–7.
83. 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.

84. Akmačić IT, Ugrina I, Štambuk J, Gudelj I, Vučković F, Lauc G, et al. High-throughput glycomics: optimization of sample preparation. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Jul;80(7):934–42.
85. Riley NM, Bertozzi CR, Pitteri SJ. A Pragmatic Guide to Enrichment Strategies for Mass Spectrometry–Based Glycoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2020 Dec 20;20:100029.
86. Wu D, Struwe WB, Harvey DJ, Ferguson MAJ, Robinson CV. N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Aug 28;115(35):8763–8.
87. Struwe WB, Robinson CV. Relating glycoprotein structural heterogeneity to function – insights from native mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol*. 2019 Oct 1;58:241–8.
88. Tabang DN, Ford M, Li L. Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Glycomic and Glycoproteomic Studies of Pancreatic Diseases. *Frontiers in Chemistry* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 25];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2021.707387>
89. Liu H, Zhang N, Wan D, Cui M, Liu Z, Liu S. Mass spectrometry-based analysis of glycoproteins and its clinical applications in cancer biomarker discovery. *Clinical Proteomics*. 2014 Apr 10;11(1):14.
90. Chen S, Qin R, Mahal LK. Sweet systems: technologies for glycomic analysis and their integration into systems biology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2021 May 4;56(3):301–20.
91. Zhu R, Zacharias L, Wooding KM, Peng W, Mechref Y. CHAPTER 7: Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages. *Methods Enzymol*. 2017;585:397–429.
92. Xiao H, Chen W, Smeekens JM, Wu R. An enrichment method based on synergistic and reversible covalent interactions for large-scale analysis of glycoproteins. *Nat Commun*. 2018 Apr 27;9(1):1692.
93. Krishnamoorthy L, Mahal LK. Glycomic analysis: an array of technologies. *ACS Chem Biol*. 2009 Sep 18;4(9):715–32.
94. Abbott KL, Pierce JM. Lectin-Based Glycoproteomic Techniques for the Enrichment and Identification of Potential Biomarkers. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2022 Oct 2]. p. 461–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687910800205>
95. Ruiz-May E, Catalá C, Rose JKC. N-Glycoprotein Enrichment by Lectin Affinity Chromatography. In: Jorin-Novo JV, Komatsu S, Weckwerth W, Wienkoop S, editors. *Plant Proteomics* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2014 [cited 2021 Sep 6]. p. 633–43. (Methods in Molecular Biology; vol. 1072). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-631-3_43
96. Rebois RV, Schuck P, Northup JK. Elucidating Kinetic and Thermodynamic Constants for Interaction of G Protein Subunits and Receptors by Surface Plasmon

- Resonance Spectroscopy. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2002 [cited 2022 Oct 2]. p. 15–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687902447039>
97. Dahabiyeh LA, Tooth D, Barrett DA. Profiling of 54 plasma glycoproteins by label-free targeted LC-MS/MS. *Anal Biochem.* 2019 Feb 15;567:72–81.
 98. Nonis SG, Haywood J, Schmidberger JW, Mackie ERR, Soares da Costa TP, Bond CS, et al. Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase. *The Plant Cell.* 2021 Aug 1;33(8):2794–811.
 99. Bouziani A, Yahya M, Bouziani A, Yahya M. Mass Spectrometry Coupled with Chromatography toward Separation and Identification of Organic Mixtures [Internet]. *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants.* IntechOpen; 2021 [cited 2022 Oct 2]. Available from: <https://www.intechopen.com/state.item.id>
 100. Rudd PM, Karlsson NG, Khoo KH, Thaysen-Andersen M, Wells L, Packer NH. Glycomics and Glycoproteomics. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [cited 2022 Oct 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579904/>
 101. Tissot B, North SJ, Ceroni A, Pang PC, Panico M, Rosati F, et al. Glycoproteomics: Past, present and future. *FEBS Letters.* 2009 Jun 5;583(11):1728–35.
 102. Delafield DG, Li L. Recent Advances in Analytical Approaches for Glycan and Glycopeptide Quantitation. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2021 Jan 1;20:100054.
 103. Dalpathado DS, Desaire H. Glycopeptide analysis by mass spectrometry. *Analyst.* 2008;133(6):731.
 104. Zhang L, Luo S, Zhang B. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. *MAbs.* 2015 Nov 24;8(2):205–15.
 105. An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB. Determination of Glycosylation Sites and Site-specific Heterogeneity in Glycoproteins. *Curr Opin Chem Biol.* 2009 Oct;13(4):421–6.
 106. Shajahan A, Heiss C, Ishihara M, Azadi P. Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial. *Anal Bioanal Chem.* 2017 Jul 1;409(19):4483–505.
 107. Madera M, Mann B, Mechref Y, Novotny MV. Efficacy of glycoprotein enrichment by microscale lectin affinity chromatography. *J Sep Sci.* 2008 Aug;31(14):2722–32.
 108. Welinder KG, Svendsen A. Amino acid sequence analysis of the glycopeptides from human complement component C3. *FEBS Lett.* 1986 Jun 23;202(1):59–62.
 109. Xue Y, Xie J, Fang P, Yao J, Yan G, Shen H, et al. Study on behaviors and performances of universal N-glycopeptide enrichment methods. *Analyst.* 2018 Apr 16;143(8):1870–80.
 110. Hinneburg H, Stavenhagen K, Schweiger-Hufnagel U, Pengelley S, Jabs W, Seeberger PH, et al. The Art of Destruction: Optimizing Collision Energies in Quadrupole-Time of

- Flight (Q-TOF) Instruments for Glycopeptide-Based Glycoproteomics. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27:507–19.
111. 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.
112. Zaytseva OO, Jansen BC, Hanić M, Mrčela M, Razdorov G, Stojković R, et al. MIgGGly (mouse IgG glycosylation analysis) - a high-throughput method for studying Fc-linked IgG N-glycosylation in mice with nanoUPLC-ESI-MS. *Sci Rep.* 2018 Sep 12;8(1):13688.
113. Chambers MC, Maclean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, et al. A Cross-platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. *Nat Biotechnol.* 2012 Oct;30(10):918–20.
114. 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.
115. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J Royal Statist Soc, Series B.* 1995 Nov 30;57:289–300.
116. Engebretsen S, Bohlin J. Statistical predictions with glmnet. *Clin Epigenetics.* 2019 Aug 23;11:123.
117. 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.
118. Lam MPY, Lau E, Liu X, Li J, Chu IK. Sample Preparation for Glycoproteins. In: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2021 Aug 31]. p. 307–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123813732000855>*
119. Šoić D, Keser T, Štambuk J, Kifer D, Pociot F, Lauc G, et al. High-Throughput Human Complement C3 N-Glycoprofiling Identifies Markers of Early Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *Mol Cell Proteomics.* 2022 Oct;21(10):100407.
120. Solís D, Feizi T, Yuen CT, Lawson AM, Harrison RA, Loveless RW. Differential recognition by conglutinin and mannan-binding protein of N-glycans presented on neoglycolipids and glycoproteins with special reference to complement glycoprotein C3 and ribonuclease B. *Journal of Biological Chemistry.* 1994 Apr;269(15):11555–62.
121. Ekdahl KN, Mohlin C, Adler A, Åman A, Manivel VA, Sandholm K, et al. Is generation of C3(H₂O) necessary for activation of the alternative pathway in real life? *Molecular Immunology.* 2019 Oct 1;114:353–61.
122. Charlesworth JA, Williams DG, Sherington E, Peters DK. Metabolism of the third component of complement (C3) in normal human subjects. *Clin Sci Mol Med.* 1974 Feb;46(2):223–9.

123. Almeida A, Kolarich D. The promise of protein glycosylation for personalised medicine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2016 Aug;1860(8):1583–95.
124. de Leoz MLA, Young LJT, An HJ, Kronewitter SR, Kim J, Miyamoto S, et al. High-Mannose Glycans are Elevated during Breast Cancer Progression. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011 Jan;10(1):M110.002717.
125. Scott E, Munkley J. Glycans as Biomarkers in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 19;20(6):1389.
126. Tang S, Zhou W, Sheerin NS, Vaughan RW, Sacks SH. Contribution of renal secreted complement C3 to the circulating pool in humans. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):4336–41.
127. King BC, Kulak K, Krus U, Rosberg R, Golec E, Wozniak K, et al. Complement Component C3 Is Highly Expressed in Human Pancreatic Islets and Prevents β Cell Death via ATG16L1 Interaction and Autophagy Regulation. *Cell Metabolism*. 2019 Jan 8;29(1):202-210.e6.
128. Zhong J. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. In: Escher A, editor. *Type 1 Diabetes [Internet]*. InTech; 2013 [cited 2021 Sep 21]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes/endoplasmic-reticulum-er-stress-in-the-pathogenesis-of-type-1-diabetes>
129. Papa FR. Endoplasmic Reticulum Stress, Pancreatic β -Cell Degeneration, and Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Sep;2(9):a007666.
130. Fan Y, Lee K, Wang N, He JC. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetic Nephropathy. *Curr Diab Rep*. 2017 Mar;17(3):17.
131. Fujitani N, Ariki S, Hasegawa Y, Uehara Y, Saito A, Takahashi M. Integrated Structural Analysis of N-Glycans and Free Oligosaccharides Allows for a Quantitative Evaluation of ER Stress. *Biochemistry*. 2021 Jun 1;60(21):1708–21.
132. Saraheimo M, Forsblom C, Hansen TK, Teppo AM, Fagerudd J, Pettersson-Fernholm K, et al. Increased levels of mannan-binding lectin in type 1 diabetic patients with incipient and overt nephropathy. *Diabetologia*. 2005 Jan;48(1):198–202.
133. Memarian E, 't Hart LM, Slieker RC, Lemmers RFL, van der Heijden AA, Rutters F, et al. Plasma protein N-glycosylation is associated with cardiovascular disease, nephropathy, and retinopathy in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2021 Oct;9(1):e002345.
134. Lu JP, Knežević A, Wang YX, Rudan I, Campbell H, Zou ZK, et al. Screening novel biomarkers for metabolic syndrome by profiling human plasma N-glycans in Chinese Han and Croatian populations. *J Proteome Res*. 2011 Nov 4;10(11):4959–69.
135. Kifer D, Louca P, Cvetko A, Deriš H, Cindrić A, Grallert H, et al. N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. *Journal of Hypertension*. 2021 Dec;39(12):2527–33.

136. Wang Y, Klarić L, Yu X, Thaqi K, Dong J, Novokmet M, et al. The Association Between Glycosylation of Immunoglobulin G and Hypertension. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Apr 29;95(17):e3379.
137. Fantus IG, Goldberg HJ, Whiteside CI, Topic D. The Hexosamine Biosynthesis Pathway. In: Cortes P, Mogensen CE, editors. *The Diabetic Kidney [Internet]*. Totowa, NJ: Humana Press; 2006 [cited 2022 Feb 8]. p. 117–33. (Contemporary Diabetes). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-153-6_7

ŽIVOTOPIS

Dinko Šoić rođen je 3. travnja 1995. godine u Zagrebu. Diplomski studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. godine. Tijekom studija sudjelovao je na različitim studentskim kongresima i simpozijima.

Od prosinca 2019. godine zaposlen je kao asistent na projektu na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te sudjeluje u izvođenju praktične nastave iz kolegija diplomskog studija farmacije i medicinske biokemije. Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

Objavio je tri znanstvena rada, te održao više posterskih priopćenja na međunarodnim i domaćim kongresima.

Znanstveni radovi (CC):

Šoić D, Keser T, Štambuk J, Kifer D, Pociot F, Lauc G, et al. High-Throughput Human Complement C3 N-Glycoprofiling Identifies Markers of Early Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *Mol Cell Proteomics*. 2022 Oct;21(10):100407.

Šoić D, Mlinarić Z, Lauc G, Gornik O, Novokmet M, Keser T. In a pursuit of optimal glycan fluorescent label for negative MS mode for high-throughput N-glycan analysis. *Front Chem*. 2022 Oct 3;10:999770. doi: 10.3389/fchem.2022.999770. PMID: 36262345; PMCID: PMC9574008.

Rudman N, Kaur S, Simunović V, Kifer D, Šoić D, Keser T, et al. Integrated glycomics and genetics analyses reveal a potential role for N-glycosylation of plasma proteins and IgGs, as well as the complement system, in the development of type 1 diabetes. *Diabetologia, in press* (accepted: 21 December 2022).

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Doktorski rad

VISOKOPROTOČNA ANALIZA N-GLIKOZILACIJE KOMPONENTE KOMPLEMENTA C3 KAO BILJEGA ŠEĆERNE BOLESTI TIP 1

Dinko Šoić

SAŽETAK

Ubrzani razvoj analitičkih tehnika u posljednjih nekoliko desetljeća omogućio je temeljito istraživanje procesa N-glikozilacije u brojnim patofiziološkim stanjima, a uočene promjene u mnogima od njih dovele su do strelovitog rasta interesa za glikobiologiju. Promjene u N-glikozilaciji danas se smatraju vrijednim biljezima raznih bolesti, te se njihova specifičnost pokušava iskoristiti u diferencijalne, dijagnostičke i prognostičke svrhe. Prethodne studije pokazale su da je N-glikanski profil plazmatskih proteina promijenjen u šećernoj bolesti tipa 1 (ŠBT1). Jedna od izraženije uočenih promjena bila je ona u zastupljenosti visokomanoznih glikanskih struktura u plazmatskom N-glikomu. Ove strukture dominantno bi mogle potjecati s komponente komplementa C3, budući da je to glikoprotein s isključivo visokomanoznim glikanima vezanima na proteinsku okosnicu za kojeg je poznato da doprinosi razvoju ŠBT1 pojačavanjem autoimunih upalnih procesa. Iz tog je razloga u ovom radu razvijena visokoprotokna metoda za analizu N-glikozilacije pojedinih glikozilacijskih mjesta ljudskog C3 proteina upotrebom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrom masa (LC-MS) temeljena na njegovu obogaćivanju iz plazme pomoću lektinskog afinitetnog medija visokog afiniteta za manozu. Novorazvijenom metodom zatim je analizirana krvna plazma ispitanika novodijagnosticiranih šećernom bolesti tipa 1 i njihove zdrave braće i sestara te su uočene značajne promjene C3 N-glikoma. ŠBT1 povezana je s porastom manje procesuiranih struktura s više manoznih podjedinica na oba N-glikozilacijska mjesta. Nadalje, C3 N-glikozilacija je analizirana u odrasloj populaciji ispitanika s različitim stupnjem najčešćih komplikacija ŠBT1 – retinopatije i albuminurije. Pokazano je da se C3 N-glikom značajno mijenja u teškoj albuminuriji u ŠBT1, no da je neovisan o trajanju bolesti. Retinopatija je pak dovela do promjene samo jedne glikoforme, dok su svi osim jednog C3 glikopeptida značajno povezani s razinama hemoglobina A1c (HbA1c). Predstavljene spoznaje ukazuju na uključenost N-glikozilacije i C3 komponente komplementa u patofiziologiju šećerne bolesti tipa 1 te upućuju na značaj C3 N-glikoma kao potencijalnog dijagnostičkog i prognostičkog biljega ove bolesti i njoj pridruženih komplikacija.

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

Rad sadrži: 101 stranica, 15 grafičkih prikaza, 17 tablica i 136 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikozilacija, N-glikani, glikoproteomika, C3 komponenta komplementa, sustav komplementa, šećerna bolest tipa 1, LC-MS, spektrometrija masa

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Marijana Vučić Lovrenčić, znanstvena savjetnica, Klinička bolnica Merkur
Dr. sc. Srećko Marušić, naslovni izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: 15. ožujak 2023.

Basic documentation card

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

Doctoral thesis

HIGH-THROUGHPUT N-GLYCOSYLATION ANALYSIS OF COMPLEMENT COMPONENT C3 AS BIOMARKER OF TYPE 1 DIABETES

Dinko Šoić

SUMMARY

Rapid development of analytical techniques in the last few decades has enabled a thorough investigation of the N-glycosylation process in numerous pathophysiological conditions, and the observed changes in many of them have led to a rapid growth of interest in the field of glycobiology. Changes in N-glycosylation are now considered valuable biomarkers of various diseases, and their specificity is being exploited for differential, diagnostic and prognostic purposes. Previous studies have shown that the N-glycan profile of plasma proteins is altered in type 1 diabetes (T1D). One of the more pronounced changes observed was in the abundance of high-mannose glycans in the plasma N-glycome. These structures could predominantly originate from the complement component C3, a glycoprotein with exclusively high-mannose glycans attached to its protein backbone, which is known to contribute to the development of T1D by enhancing autoimmune inflammatory processes. For this reason, a high-throughput method for the site-specific N-glycosylation analysis of human C3 protein was developed in this study using liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (LC-MS), based on its enrichment from plasma using lectin affinity matrix. The newly developed method was then used to analyze blood plasma of subjects newly diagnosed with type 1 diabetes and their healthy siblings, and significant changes in C3 N-glycome were observed. T1D was associated with an increase in less processed structures with more mannose subunits at both C3 N-glycosylation sites. Furthermore, C3 N-glycosylation was analyzed in the adult population of T1D subjects with different degrees of the most common complications of T1D – retinopathy and albuminuria. It was shown that C3 N-glycome significantly changes in severe albuminuria in T1D, but is independent of disease duration. Retinopathy led to a change in only one glycoform, while all but one C3 glycopeptide was significantly associated with levels of hemoglobin A1c (HbA1c). The findings presented indicate the involvement of N-glycosylation and the C3 complement component in the pathophysiology of type 1 diabetes and indicate the importance of C3 N-glycome as a potential diagnostic and prognostic biomarker of this disease and its associated complications.

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

Rad sadrži: 101 pages, 15 figures, 17 tables i 136 references. The original is in Croatian language.

Keywords: N-glycosylation, N-glycans, glycoproteomics, C3 complement component, complement system, type 1 diabetes, LC-MS, mass spectrometry

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

Reviewers: **Ana Mornar Turk, PhD**, *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Marijana Vučić Lovrenčić, PhD, *Scientific adviser, Merkur Clinical Hospital*
Srećko Marušić, PhD, *Titular Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: March 15th 2023.