

N-glikozilacija imunoglobulina A ovisno o dobi i spolu ispitanika

Kraljević, Pavla

Master's thesis / Diplomski rad

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:163:280585>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



Pavla Kraljević

**N-glikozilacija imunoglobulina A ovisno o
dobi i spolu ispitanika**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

SADRŽAJ

<u>1. UVOD</u>	4
1.1. Imunoglobulini	5
1.2. Imunoglobulin A	5
1.3. Glikozilacija	9
1.4. N-glikozilacija proteina	10
1.5. IgA kao glikoprotein	11
1.6. Ovisnost N-glikozilacije o dobi i spolu	12
<u>2. OBRAZLOŽENJE TEME</u>	14
<u>3. MATERIJALI I METODE</u>	16
3.1. Uzorci ispitanika	17
3.2. Materijali	17
3.3. Priprema otopina	18
3.4. Izolacija IgA	19
3.5. Deglikozilacija N-glikana IgA	20
3.6. Obilježavanje i pročišćavanje N-glikana IgA	21
3.7. Analiza N-glikana IgA (HILIC-UPLC)	21
<u>4. REZULTATI</u>	23
4.1. N-glikom imunoglobulina A	24
4.2. Statistička obrada podataka	25
4.3. Ovisnost N-glikana IgA o dobi	28
4.4. Ovisnost N-glikana IgA o spolu	30
<u>5. RASPRAVA</u>	33
<u>6. ZAKLJUČCI</u>	37
<u>7. POPIS KRATICA</u>	39
<u>8. POPIS LITERATURE</u>	42
<u>9. SAŽETAK</u>	46
<u>10. SUMMARY</u>	48

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, pristupačnosti i velikoj motivaciji.

Zahvaljujem mag. biol. mol. Mateju Nemčiću na strpljenju i velikoj pomoći prilikom provedbe eksperimentalnog dijela rada i statističke obrade podataka. Hvala i svim članovima Zavoda biokemije i molekularne biologije kao i kolegici Sofiji Shkunnikovej na pozitivnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem dragoj prijateljici mag. math. Petri Šinki na pomoći izrade prikaza rezultata.

Velika hvala prijateljima, mojim ogledalima, a posebno onima koji su sa mnom studirali i učinili godine studiranja puno lakšim, ljepšim i vrijednim sjećanja.

Na kraju bih se posebno zahvalila svojoj obitelji na ljubavi i podršci tijekom cijelog studija, vi ste moj vjetar u leđa. 😊

1. UVOD

1.1. Imunoglobulini

Imunoglobulini su skupina globularnih proteina (150 kDa) koji su sastavni dio imunskog sustava s ulogom uklanjanja antigena iz organizma. Mogu se naći vezani na membranu imunskih stanica ili u slobodnom obliku u tjelesnim tekućinama ovisno o vrsti imunoglobulina, a čine čak 20% ukupnih proteina u plazmi (Justiz-Vaillant i sur., 2022.).

Struktura osnovnog funkcionalnog monomera imunoglobulina nalik je slovu Y i sastoji se od ukupno četiri polipeptidna lanca koja čine dva identična teška lanca i dva identična laka lanca. Na svaki teški lanac koji čine okosnicu molekule vezan je disulfidnim vezama po jedan laki lanac. Monomer imunoglobulina sadrži jednu Fc regiju (C-terminalni kraj polipeptida) koja služi za vezanje imunoglobulina na stanične receptore i dvije Fab regije (N-terminalni kraj polipeptida) koje vežu antigen. Fab regije imunoglobulina sastoje se od slijeda aminokiselina koji tvore varijabilne i hipervarijabilne regije specifične za prepoznavanje pojedinih antigena zbog čega se imunoglobulini međusobno razlikuju po vrsti antigena koji prepoznaju.

Ovisno o vrsti teškog lanca u molekuli, imunoglobuline možemo podijeliti na 5 klasa: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Od svih klasa imunoglobulina, organizam proizvodi najveće količine upravo IgA, čak više nego svih ostalih klasa imunoglobulina zajedno (de Sousa-Pereira i Woof, 2019).

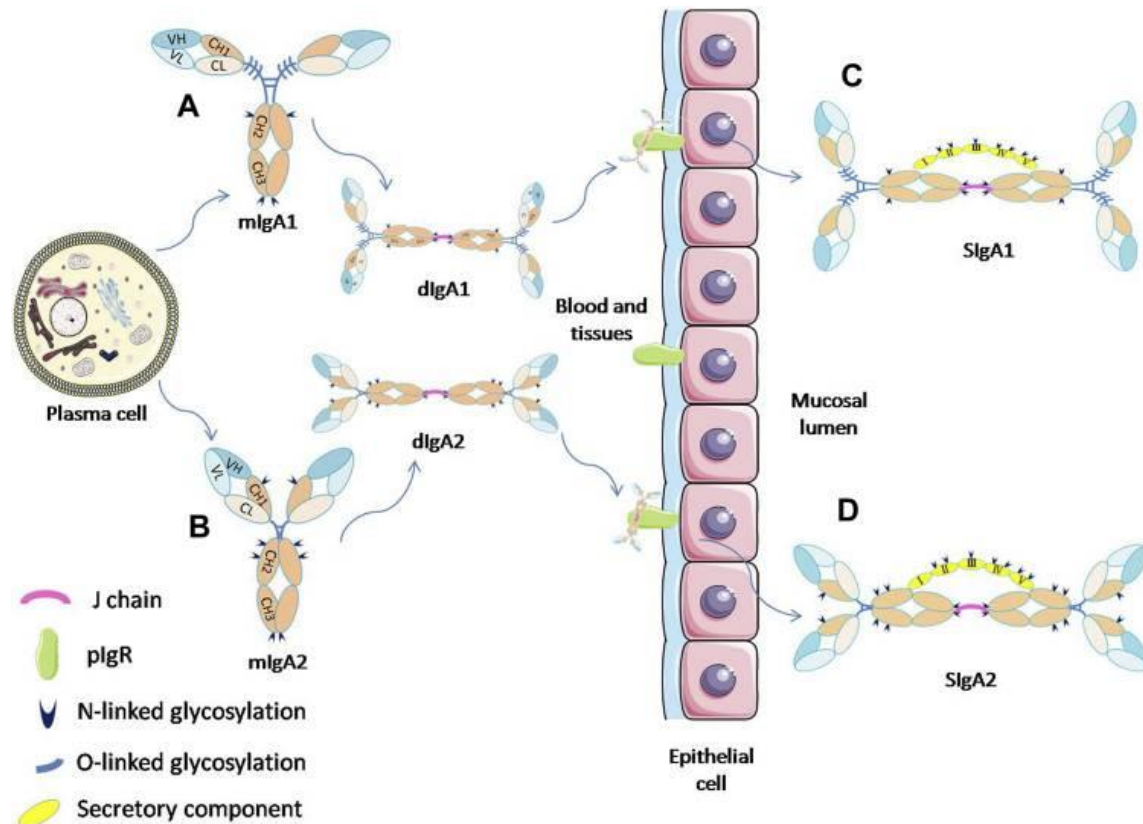
1.2. Imunoglobulin A

Sluznice u ljudskom organizmu zauzimaju približno 400 m² u koje ubrajamo sluznice dišnog, gastrointestinalnog i urogenitalnog sustava. Budući da su one stalno izložene vanjskim utjecajima, upravo imunoglobulin A (IgA) ima ključnu ulogu u obrani površine sluznice od mikroorganizama i štetnih antigena.

U ljudskom se organizmu dnevno po kilogramu težine prosječnog čovjeka proizvodi 60 mg IgA od čega se većina nalazi na površinama sluznica. Osim što je IgA najzastupljenija klasa imunoglobulina na površini sluznica, u serumu je prisutan kao drugi najzastupljeniji imunoglobulin poslije IgG, u koncentraciji 2-3 mg/mL (de Sousa-Pereira i Woof, 2019). Također, IgA se može pronaći i u tjelesnim sekretima uključujući slinu, suze, majčino mlijeko i sluz. IgA proizvode plazma stanice aktiviranih B limfocita kojima je bio predodređen određeni antigen nakon

čega je uslijedila rekombinacija klase iz klasa IgD ili IgM u klasu IgA. Osim u koštanoj srži, slezeni i limfnim čvorovima, najviše IgA proizvode plazma stanice u *lamini propria* crijeva.

Strukturno teški lanac se sastoji od tri konstatne domene ($Ca1$, $Ca2$ i $Ca3$) i jedne varijabilne (VH) domene dok se laki lanac sastoji od jedne konstatne domene (CL) i jedne varijabilne (VL) domene. Definiramo dvije podklase IgA, IgA1 i IgA2 koje su kodirane različitim genima, a razlikuju se po dužini fleksibilne zglobne regije koja se nalazi između $Ca1$ i $Ca2$ domene. Klasa IgA1 ima puno dužu zglobnu regiju koja ne sadrži disulfidne veze zbog čega sekvence koje vežu antigene imaju veću sposobnost savijanja neovisno jedna o drugoj, ali je zbog toga IgA1 osjetljivija na proteolitičku aktivnost (de Sousa-Pereira i Woof, 2019). U serumu prevladavaju monomerni oblici IgA koji proizvode plazma stanice ili B stanice u koštanoj srži, slezeni i limfnim čvorovima, od kojih 90% čini subklasa IgA1 i 10% subklasa IgA2 (Woof i Russell, 2011). Također, do danas su opisane i tri alotipske varijante IgA2m (1), IgA2m (2) i IgA2 (n) koje se razlikuju po načinu povezivanja lakih i teških lanaca. Dok su laki i teški lanci u IgA2m (2) i IgA2 (n) povezani disulfidnim mostovima kao kod ostalih imunoglobulina, kod IgA2m (1) molekule veze između teških i lakih lanaca stabiliziraju se nizom nekovalentnih veza. (Woof i Kerr, 2005).



Slika 1. Prikaz dimerizacije IgA umetanjem J lanca te vezanje dIgA na pIgR na bazolateralnom dijelu membrane epitelnih stanica. Internalizacijom dIgA i pIgR i transcitozom dolazi do otpuštanja dIgA na luminalnoj strani epitela na površinu sluznice prilikom čega se transmembranski rep (sekretorna komponenta) sa receptora pIgR kida i veže na dIgA te nastaje sekretorni oblik dIgA (sIgA). Gornji prikaz (A i C) - klasa IgA1 sa produženom zglobnom regijom. Donji prikaz (B i C) – klasa IgA2 (Ding i sur., 2022).

IgA se u sluznicama nalazi uglavnom u obliku dimera (dIgA) ili rjeđe polimera (tetramera) koji nastaju umetanjem J (joining) lanca između Fc regija svakog monomera. Na C-terminalnom kraju IgA (Fc regija) nalazi se produžetak od 18 aminokiselina koji je ključan u dimerizaciji, a slična sekvenca se nalazi i na C-kraju IgM koji također ima sposobnost polimerizacije (Yoo i Morrison, 2005). dIgA se prenosi u mukozne sekrete preko polimernog Ig receptora (pIgR) koji se nalazi na bazolateralnom dijelu membrane epitelnih stanica tvoreći barijeru sluznice. Nakon specifičnog vezanja, pIgR-dIgA kompleks se internalizira i transcitozom se prenosi do apikalnog (luminalnog) dijela membrane. Cijepanjem izvanstaničnog dijela pIgR koji je disulfidnim vezama spojen na dIgA nastaje fragment poznat kao sekretorna komponenta (SC), a kompleks dIgA i SC nazivamo sIgA koji se oslobađa u sekret sluznice (Woof and Russell, 2011). SC štiti sIgA od razgradnje proteaza i igra važnu ulogu u vezanju na stanice domaćina i bakterija.

Vrlo visoka koncentracija IgA u kolostrumu ističe važnost u imunološkoj zaštiti novorođenčeta. Majčino mlijeko sadrži sIgA koja su sposobna neutralizirati širok spektar mikrobnih antigena te je dokazano kako dojenje smanjuje smrtnost dojenčadi od gastrointestinalnih i respiratornih infekcija (Akhter H i sur., 2021).

Izravno vezanje IgA na patogene preko svojih receptora može neutralizirati toksine, ali i blokirati aktivnost virusa, bakterija i protozoa čime se u startu sprječava njihova adhezija na stanice domaćina. Također, glikani na molekuli IgA mogu sudjelovati u procesu aglutinacije različitih patogena čime stvoreni agregati ne mogu prodrijeti kroz sluz koja oblaže površinu sluznica. Dodatnu zaštitu od patogena može potaknuti i komunikacija IgA sa urođenim obrambenim čimbenicima kao što su mucini, laktoferin ili sustav laktoperoksidaze. Neke in vitro studije pokazale su kako ulazak dIgA preko specifičnog receptora pIgR omogućuje blokiranje rasta virusa (influenca, rotavirus, HIV, virus ospica) u procesu transcitoze i neutralizaciju endocitiranog bakterijskog lipopolisagarida (LPS) (de Sousa-Pereira i Woof 2019).

Osim neutralizacije, IgA sudjeluje i u aktivaciji alternativnog puta komplementa, a uglavnom se

radi o aktiviranju lektinskog puta jer je zabilježeno da vezanje MBL (engl. mannose-binding lectin) na IgA inducira aktivaciju komplementa. Međutim sposobnost IgA da aktivira sustava komplementa ovisi o stupnju glikozilacije IgA (Roos i sur., 2001).

Uz neutralizaciju i sustav komplementa, IgA posreduje u različitim efektorskim funkcijama vezanjem na brojne receptore domaćina eksprimiranih na različitim vrstama stanica. Obitelji Ig Fc receptora pripada receptor Fc α RI, poznat i kao CD89, koji se eksprimira na neutrofilima, eozinofilima, monocitima, makrofagima, Kupfferovim stanicama i nekim dendritičkim stanicama. Ishod signalizacije vezanja dIgA na Fc α RI ovisan je o stanici na kojoj se receptor nalazi, od fagocitoze, stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, otpuštanja citokina, kemokina ili upalnih medijatora do izbacivanja sadržaja neutrofila poznato kao NET (engl. neutrophil extracellular traps). Neke bakterije kao što su streptokoki grupe A i B kao i *Staphylococcus aureus* evolucijski su doskočile ovom mehanizmu stvaranjem proteina koji kompetitivno inhibiraju vezanje IgA za receptor Fc α RI (Breedveld A i van Egmond M, 2019).

Monoklonska protutijela IgA (mIgA) postaju sve zanimljivija meta istraživanja jer se upravo veza dIgA-Fc α RI smatra ključnom za prepoznavanje i privlačenje neutrofila u kontroli raznih infekcija i raka. Prednost razvijanja mIgA kao izbora terapije je sama struktura IgA i sposobnost polimerizacije čime se povećava avidnost i omogućava se stvaranje aglutinata koji ne mogu prijeći barijeru sluznice te postaju lakša meta imunskim stanicama. Obzirom na prevalenciju i visoku funkcionalnost IgA na površinama svih sluznica, uvelike je pogodnije razviti terapiju mIgA koja se uzima oralno. S druge strane, ograničenje prilikom proizvodnje terapije je kratko poluvrijeme života (4-6 dana) IgA zbog čega bi terapija bila skuplja i zahtjevala puno češće doziranje u odnosu na terapiju mIgG koji ima puno duže poluvrijeme života (21 dan) (de Sousa-Pereira i Woof, 2019).

1.3. Glikozilacija

Istraživanje glikana postaje sve važnije u biomedicinskim znanostima obzirom na njihovu raznolikost, rasprostanjenost u živom svijetu te široku paletu uloga glikana u biološkim procesima. Upravo zbog svoje prirode glikani su relativno topljive molekule, fleksibilne i pokretljive u vodenom okolišu te ekstremno raznolike zbog čega su zanimljive i nedovoljno istražene molekule koje daju prostora za nova otkrića. Sinteza svakog proteina određena je redoslijedom

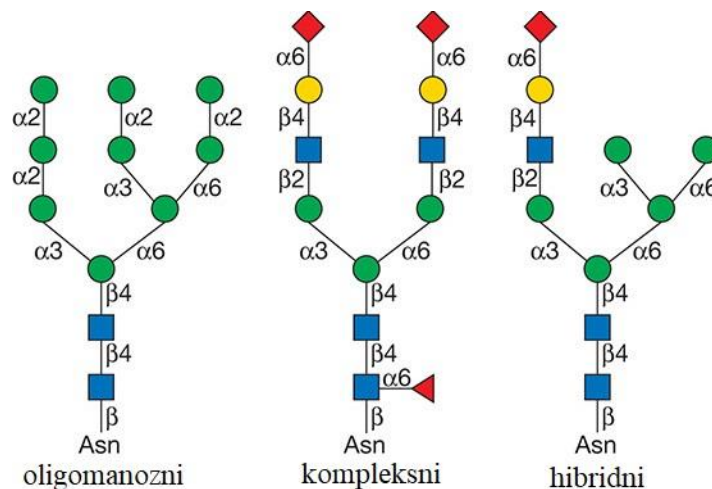
aminokiselina, ali su upravo glikani vezani na protein zaslužni za topljivost istog proteina, njegovo pravilno smatanje, stabilnost i naposljetku pokretljivost kroz stanicu i izvanstanični matriks kako bi protein mogao izvršiti svoju funkciju. Međustanično prepoznavanje i signalizacija uloga su glikana koji se nalaze na staničnoj membrani vezani za brojne proteine i lipide.

Makromolekule koje nastaju vezanjem glikana na proteine, lipide ili nukleinske kiseline nazivamo glikokonjugati, a detaljnije ćemo govoriti o glikoproteinima - proteinima na koje su procesom glikozilacije vezani glikani. Glikozilacija je posttranslacijska enzimatska modifikacija proteina koja se odvija u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu (GA), a enzimi koji kataliziraju taj proces nazivaju se glikoziltransferaze i glikozidaze. Iako monomernih jedinica koje sudjeluju u glikozilaciji ima svega desetak, izvor raznolikosti glikoproteina krije se u različitom slijedu monosaharidnih jedinica, ali također ovisi o konfiguraciji glikozidne veze (α ili β) kao i broju i položaju mjesta grananja (Seeberger PH, 2017). Glikozilacija proteina uključuje N-glikozilaciju, O-glikozilaciju, modifikaciju s glikozilfosfatidilinozitol (GPI) sidrima, a proteini modificirani s glikozaminoglikanskim (GAG) lancima nazivaju se proteoglikani (Colley i ostali, 2017).

1.4. N-glikozilacija proteina

N-glikozilacija je visoko očuvana modifikacija proteina što svjedoči i činjenica da je kod ljudi opisano više od 7000 N-glikoziliranih proteina (Hirata i Kizuka, 2021). N-glikozilacije su uobičajene za membranske proteine i sekretorne glikoproteine, uključujući imunoglobuline IgA i IgG. N-glikani nastaju vezanjem N-acetilglukozamina (GlcNAc) β 1-glikozidnom vezom na dušikov atom amino skupine asparagina (Asn) na motivu glikozilacije Asn-X-Ser/Thr u kojem X označava bilo koju aminokiselinu osim prolina (Pro). Ove razgranate i visoko heterogene N-glikanske strukture sastoje se od glikanske jezgre koja sadrži dva ostatka GlcNAc i tri ostatka manoze (Man) što kraticama pišemo kao motiv $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ (Reily i sur., 2019). Na osnovnu strukturu mogu se dodavati i uklanjati različiti monosaharidi kao što su galaktoza, manaza, N-acetilglukozamin, fukoza ili sijalinska kiselina (Reily i sur., 2019). Navedene modifikacije određuju hoće li se konačna struktura klasificirati kao N-glikan s visokim sadržajem manoze (oligomanozni), kompleksni N-glikan ili

hibridni N-glikan (Slika 2).



Slika 2. Prikaz tri tipa N-glikana sa osnovnom strukturom dva N-acetilglukozamina i 3 manoze ($Man_3GlcNAc_2Asn$). Plavi kvadrat-GlcNAc, zeleni krug-Man, crveni trokut-Fuc, žuti krug-Gal, crveni romb-sijalinska kiselina (Varki i sur., 2017).

Sinteza N-glikana započinje na luminalnoj strani membrane ER na lipidnom nosaču dolihol fosfatu na kojemu se sintetizira oligosaharid od 14 monosaharidnih jedinica. Enzim oligosaharil-transferaza katalizira N-glikozilaciju pri čemu se nastali oligosaharid prenosi sa dolihol fosfata na proteinski Asn u motivu Asn-X-Ser/Thr. Proces dorade N-glikana nastavlja se u lumenu ER gdje glukozidaza uklanja tri glukoza ostatka (Glc), a manozidaza uklanja manozni ostatak (Man) sa oligosaharida. Takvo kidanje pomaže u pravilnom savijanju glikoproteina koji odlazi u GA gdje se nastavlja uklanjanje manoznih ostataka do oblika $Man_5GlcNAc_2$. Enzim α -manozidaza II kida dvije vanjske manoze pri čemu ostaje osnovni kostur N-glikana $Man_3GlcNAc_2$ koji se produžuje dodatkom fukoze (Fuc), galaktoze (Gal) i sijalinske kiseline kako bi se dobio kompleksni N-glikan s dvije grane. Nepotpuno djelovanje α -manozidaze II može rezultirati nastajanjem hibridnih N-glikana budući da sa jedne grane nisu uklonjene sve manoze (Stanley i sur., 2017).

Funkcije N-glikana uvelike su bile određene iz značajki ljudskih bolesti koje se nazivaju kongenitalni poremećaji glikozilacije (CDG) kod kojih zbog genetskog nedostatka enzima u procesu glikozilacije dolazi do težih poremećaja. Također je poznato da N-glikani postaju više razgranati kada stanice postanu kancerogene, a ta promjena olakšava napredovanje raka. Tumori nastali kod miševa kojima nedostaje enzim N-acetilglukozaminiltransferaza 5 (VMGAT5) puno sporije napreduju u usporedbi sa tumorima miševa koji posjeduju isti enzim. Stoga, određene

glikoziltransferaze mogu biti prikladne mete za dizajn terapije raka (Varki i sur., 2017). Jedna od studija pokazala je da stupanj grananja i broj N-glikana mogu regulirati staničnu proliferaciju i diferencijaciju. Što je više N-glikana vezano na glikoprotein, ekspresija tog proteina se povećava na površini stanice, a jedan od primjera na kojima je to dokazano je GLUT4 koji regulira unos glukoze u stanice te na taj način glikozilacija može biti također povezana sa razvojem dijabetesa (Lau i sur., 2007).

1.5. IgA kao glikoprotein

Klase imunoglobulina razlikuju se po broju N-glikana prisutnih na njihovim teškim lancima. Neki imunoglobulini, kao što su IgA1 i IgD, također sadrže O-glikane, koji su obično grupirani u segmentima zglobne regije ovih antitijela. Glikani vezani na imunoglobuline utječu na efektorske funkcije protutijela ovisno o grananju N-glikana, ali i monosaharidima vezanima na njih kao što su galaktoza i sijalinska kiselina. IgA je poznat kao jedno od najjače glikoziliranih antitijela među ljudskim imunoglobulinima. Za razliku od IgG, koji sadrži samo jedno očuvano mjesto N-glikozilacije, IgA1 i IgA2 monomeri sadrže više mjesta N-glikozilacije u Fc regiji, a IgA1 tipično ima 3-6 O-glikana u produženoj zglobnoj regiji koji se vežu na Ser i Thr. Sastav monosaharida O-glikana u zglobnoj regiji je promjenjiv, ali uglavnom uključuje GalNAc, Gal i različite oblike sijalinske kiseline. Sekretorna komponenta polimernog IgA je također N-glikozilirani polipeptid koji je izveden iz polimernog imunoglobulinskog receptora (pIgR) i dodaje se IgA tijekom transcitoze kroz epitelne stanice sluznice (Woof i Mestecky, 2005).

Do sada su funkcije glikoziliranog IgG poznate, no istraživanje glikozilacije IgA i njegove povezanosti s bolestima je još u ranoj fazi. Pokazalo se da glikozilacija IgA ima značajan učinak na njegovu imunološku funkciju te su varijacije u glikoformi IgA često glavna karakteristika autoimunih bolesti kao što su IgA nefropatija (IgAN), IgA vaskulitis (IgAV), sistemski eritemski lupus (SLE) i reumatoidni artritis (RA) (Ding i sur., 2022). Na primjeru IgA nefropatije (IgAN) nepotpuna glikozilacija IgA može uzrokovati autoimuno stvaranje IgG protutijela na pogrešno sintetizirana IgA1 bez galaktoze. Greška se događa uslijed promijenjene transkripcije enzima koji manjkavo glikoziliraju IgA1 koji odlazi u krvotok i izaziva reakciju stvaranja autoimunih IgG antitijela te se stvoreni imunološki kompleksi talože u bubrezima i izazivaju patologiju (Knoppova

i sur., 2016).

1.6. Ovisnost N-glikozilacije o dobi i spolu

Glikomika se razvila kao ideja da se glikani trebaju proučavati skupno budući da glikani formiraju uzorke na stanicama koji se mijenjaju tijekom razvoja i progresije raka, infekcija i mnogih drugih bolesti (Rudd i sur., 2017). Glikomi biljaka i prokariota jasno se razlikuju od glikoma kraljevnjaka, ali i glikom svake stanice uvelike može biti promijenjen ovisno o proteomu, razini dostupnih monosaharida i uvjetima mikrokoliša. Procjenjuje se da je do 50% varijabilnosti glikoma u plazmi nasljedno, a preostala varijabilnost očito je uzrokovana okolišnim čimbenicima te podložna epigenetskim promjenama (Krištić i sur., 2014).

Starenje je složen proces akumulacije oštećenja molekula, stanica i organa, što dovodi do gubitka funkcije i povećane osjetljivosti na bolesti i upale te konačno do smrti. Identifikacija molekularnog biljega starenja u novije je doba veliki interes u glikobiologiji, a neki su glikoproteini već i otkriveni kao dobri biljezi za praćenje procesa starenja obzirom da starenjem dolazi do promjene u glikozilaciji. U kojoj mjeri glikani utječu na efektorske funkcije antitijela govori i primjer kako glikoform IgG s N-glikanima bez galaktoze djeluje proupalno, dok IgG sa sijaliniziranim N-glikanima djeluje protuupalno (Reily i sur., 2019). Već male promjene glikanskih struktura Fc regije IgG potiču vezanje IgG na različite receptore i na taj način moduliraju djelovanje imunološkog sustava prema proupalnom efektu koji posljedično uzrokuje starenje. Samo neki od primjera su drastična promjena fiziološke uloge IgG dodavanjem sijalinskih kiselina na glikane pretvarajući ih iz proupalnih u protuupalne agense (Kaneko Y i sur., 2006). Nadalje, dodavanje fukoze glikanskoj jezgri ometa vezanje IgG na Fc γ RIIIa receptor i smanjuje njegovu sposobnost da uništi ciljne stanice putem stanično posredovane citotoksičnosti ovisne o antitijelima (ADCC) (Ferrara i sur., 2006). S druge pak strane nedostatak fukoze u jezgri povećava kliničku učinkovitost monoklonskih protutijela, koja ostvaruju svoj terapijski učinak ubijanjem posredovanim ADCC-om (Shinkawa i sur., 2003).

Imunoglobulin G (IgG) je glikoprotein sa najbolje istraženom glikozilacijom zbog čega se većina istraživanja na temu promjene glikozilacije ovisno o dobi i spolu rade upravo na molekuli IgG. Jedno od istraživanja koje je provedeno na četiri različite populacije (5117 ispitanika) pokazalo je

kako se udio negalaktoziliranih glikana IgG postojano povećava s godinama i to puno izražajnije kod žena između 45. i 50. godine života ulaskom u menopauzu (Krištić i sur., 2014). Žene, za razliku od muškaraca, doživljavaju značajne promjene u razini estrogena u različitim životnim fazama kao što su adolescencija, izmjene menstrualnih ciklusa, trudnoća i menopauza. Osim što estrogen kod žena utječe na povećanu proizvodnju hormona koji su također glikoproteini, estrogen može djelovati i na signalne puteve koji su povezani s glikozilacijom proteina. U drugom istraživanju koje je provedeno na uzorku od 170 djece u dobi 6-18 godina utvrđeno je da ne postoje značajne razlike između N-glikana IgG između dječaka i djevojčica u dobi prije puberteta. Tek s početkom puberteta kod oba se spola može uvidjeti trend smanjenja stupnja grananja glikana, galaktozilacije i sialinizacije s dobi. Ova studija uočava i suprotan trend N-glikoma IgG u plazmi između djece i odraslih obzirom da je kod odraslih uobičajen trend povećanja negalaktoziliranih glikana, a kod djece se uočava trend smanjenja razine negalaktoziliranih glikana i fukoizilacije jezgre, a povećanja digalaktoziliranih glikana s dobi (Pučić i sur., 2012).

Obzirom da je studijama pokazana dobra korelacija između serumskog N-glikoma i procesa starenja, provedena je studija koja je ispitala potencijal N-glikana kao biljega dobi u forenzici. Analiza DNA se ponekad u forenzici ne može koristiti kao biljeg dobi zbog premalo dostupnog uzorka i oštećene DNA, stoga je analiza N-glikana dobra zamjenska metoda kojom bi se mogla predvidjeti dob osobe s pogreškom od 9,07 godina (Gudelj i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikozilacija imunoglobulina pokazala se ključnom za njihovu stabilnost, poluvrijeme života i njihove funkcije kao što je aktiviranje imunološkog sustava i međustanično prepoznavanje sa stanicama imunološkog sustava. Obzirom da je imunoglobulin G (IgG) najistraženiji imunoglobulin u kontekstu glikozilacije, pokazano je kako promjene u N-glikozilaciji IgG mogu poslužiti kao potencijalni prognostički, dijagnostički i terapijski biljezi raznih patoloških stanja.

Glikozilacija imunoglobulina A (IgA) s druge strane je slabije istražena. Osim što je IgA najvažniji imunoglobulin u obrani organizma od patogena duž površine svih sluznica koje imaju izravan doticaj s potencijalnim opasnostima za naš organizam, promjene u glikomu IgA mogu biti okidač za razvoj autoimunih bolesti obzirom da svojim djelovanjem moduliraju djelovanje imunskog sustava.

Budući da su starenjem primijećene promjene u N-glikozilaciji imunoglobulina, a glikani utječu na efektorske funkcije imunoglobulina, oni nam mogu poslužiti kao biljezi starosti. Studije pokazuju kako je trend promjene N-glikozilacije IgG u ovisnosti o dobi suprotan kod djece i odraslih. Dok kod djece s početkom puberteta postoji trend smanjenja razine negalaktoziliranih glikana, kod odraslih je s dobi poznato da se udio negalaktoziliranih glikana povećava s izraženijim skokom prisutnim kod ženskog spola. Obzirom da N-glikozilacija IgA u ovisnosti o dobi i spolu do sada nije istražena, a važno ju je poznavati i kod ispitivanja dijagnostičkog potencijala ovog proteina, ciljevi ovog rada su: 1. analizirati N-glikozilaciju IgA kod 84 zdrava ispitanika, 2. ispitati ponašanje pojedine glikanske strukture ovisno o dobi i spolu te 3. identificirati glikanske strukture prisutne na IgA koje se razlikuju između žena i muškaraca u pojedinoj dobnoj skupini.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci ispitanika

Za izradu ovog diplomskog rada analizirana su 84 uzorka plazme zdravih ispitanika dobi 30-60 godina od kojih su 41 uzorak žene i 43 uzorka muškarci. Studija je osmišljena u suglasnosti s Helsinškom deklaracijom te su svi sudionici studije potpisali informirani pristanak na temelju čega je Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta odobrilo studiju.

3.2. Materijali

Tablica 1. *Popis korištenih kemikalija*

Naziv kemikalije	Kemijska formula
Anorganske kemikalije	
Amonijev bikarbonat	NH_4HCO_3
Kalijev dihidrogenfosfat	KH_2PO_4
Kalijev klorid	KCl
Kloridna kiselina	HCl
Natrijev hidrogenfosfat	Na_2HPO_4
Natrijev klorid	NaCl
Organske kemikalije	
Acetonitril LC-MS razine čistoće	
Dimetilsulfoksid (DMSO)	
Etanol, 96%	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Igepal	
Ledena octena kiselina	CH_3COOH
Mravlja kiselina, konc.	HCOOH
Natrijev dodecilsulfat (SDS)	
Prokainamid	
Tris(hidroksimetil)aminometan	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$
2-pikolin boran	

Osim kemikalija i uzoraka, korišteni su standardi (pool-ovi zdravih dobrovoljaca) i ultračista voda (miliQ) kao slijepa proba. Od opreme su korišteni pH-metar, digestor, centrifuga, vortex, laboratorijsko posuđe (čaše, menzure, tikvice), pipete i multikanalne pipete, mikroeprovete (Eppendorf), magnetska miješalica, tresilica.

3.3. Priprema otopina

3.1.1. Otopina za pohranu (1M Tris-HCl sa 20% EtOH, pH=8,5)

Tris pufer se koristi kao pufer za održavanje pH vrijednosti reakcijske smjese i održava stabilnost obzirom da pokriva široki raspon pH (7-9). Otopina za pohranu pripravljena je otapanjem Tris-a u ultračistoj vodi (miliQ) nakon čega se dodavao etanol tako da njegov ukupni maseni udio u otopini bude 20%. Na kraju je otopina titrirana sa HCl do pH 8,5 što je provjereno pH-metrom. Otopina se skladišti u hladnjaku.

3.1.2. Priprema 10 x PBS

PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) je pufer koji se sastoji od fosfatnih soli te je kao izotonična otopina korištena za ispiranje i čišćenje matriksa na kojem se izolirao IgA. Otopina se priprema otapanjem soli natrijeva klorida (NaCl), natrijeva hidrogenfosfata (Na_2HPO_4), kalijeva dihidrogenfosfata (KH_2PO_4), i kalijeva klorida (KCl). Kada sve soli otopimo u ultračistoj vodi, otopina se nadopuni do 1L u odmjernoj tikvici i profiltrira. Na kraju se pH-metrom provjeri pH pripravljene otopine koji mora biti između 6,6 i 6,8.

3.1.3. Priprema 1 x PBS i 5 x PBS pufera

Za pripremu 1 x PBS potrebno je razrijediti otopinu 10 x PBS sa ultračistom vodom u omjeru 1:9 te se otopina titrira sa NaOH do pH=7,4. Za pripremu 5 x PBS postupak je isti osim što razrjeđujemo 10 x PBS sa ultračistom vodom u omjeru 1:4.

3.1.4. Priprema 0,1 M otopine formijatne (mravlje) kiseline

Otopina formijatne kiseline priprema se u digestoru. Za pripremu 200 mL 0,1 M formijatne kiseline potrebno je ispipetirati 754 μL formijatne kiseline u 160 mL ultračiste vode koja je prethodno dodana u menzuru. Potom se pH-metrom provjeri pH koji mora biti 2,5 i menzura se

dopuni ultračistom vodom do 200 mL. Otopina se skladišti u hladnjaku.

3.1.5. Priprema 1 M otopine amonijeva bikarbonata

Otopina amonijeva bikarbonata korištena je u izolaciji IgA iz plazme ispitanika u koraku eluiranja IgA sa matriksa, a pripravljena je otapanjem 7,9 g amonijeva bikarbonata u 80 mL ultračiste vode uz pomoć magnetske miješalice. Nakon otapanja, otopina je nadopunjena ultračistom vodom do 100 mL u menzuri te je spremna za korištenje.

3.4. Izolacija IgA

Prvi korak u postupku analize N-glikoma IgA je izolacija IgA iz uzoraka plazme ispitanika. Cijeli postupak se izvodi uz pomoć vakumske pumpe (*Pall Corporation*), CaptureSelect™ afinitetnog matriksa na koji se veže IgA, Orochem filter ploča i ploča za sakupljanje (*Waters*). Priprema uzoraka uključuje odmrzavanje uzoraka i centrifugiranje istih 3 min na 13 400 rpm nakon čega se odvaja supernatant koji se koristi u daljnjem postupku.

Postupak izolacije IgA započinje pipetiranjem 25 µL matriksa u svaku od 96 jažica na filter ploči. Afinitetni matriks je oblikovan u sitne kuglice na koje su vezana specifična antitijela koja selektivno i specifično vežu IgA protein. Nakon dodatka matriksa potrebno ga je pripremiti ispiranjem propisanim slijedom pripremljenih otopina (2x miliQ voda, 1x otopina formijatne kiseline, 1x 10xPBS, 3x 1xPBS) koristeći vakumsku pumpu nakon dodatke svake otopine. Nakon ispiranja, filter ploča sa pripremljenim matriksom stavlja se na ploču za sakupljanje (zapremnine svake jažice 1 mL) te se u filter ploču na matriks pipetira 40 µL uzorka, standarda ili slijepe probe. Važno je naglasiti kako se prethodno napravio nasumičan redoslijed kojim se uzorci, standardi i slijepa proba trebaju pipetirati kako bi se smanjio broj sustavnih pogrešaka. Kako bi ubrzali vezanje IgA na kuglice matriksa obje ploče inkubiramo 10 min na treskalici poslije čega ih stavljamo u centrifugu na 3 min 150 xg. Nakon centrifugiranja sadržaj iz ploče za sakupljanje vraćamo u filter ploču te ponavljamo postupak inkubiranja i centrifugiranja još dva puta za povećanje učinkovitosti vezanja IgA na kuglice matriksa. Uklanjanje svih nespecifično vezanih sastojaka plazme sa matriksa provodi se ispiranjem matriksa tri puta sa 1xPBS otopinom. Zadnji korak izolacije IgA je eluiranje pročišćenog IgA sa matriksa u ploču za sakupljanje. Postupak

eluiranja započinje dodatkom pripremljene 1 M otopine amonijeva bikarbonata u ploču za sakupljanje te nad njom ispiremo matriks sa vezanim IgA 0,1 M otopinom formijatne kiseline. IgA sa matriksa eluira zajedno sa kiselinom koja se neutralizira u otopini amonijeva bikarbonata i na kraju se ploča za sakupljanje sa izoliranim IgA stavlja na sušenje do liofilizata.

Matriks se nakon korištenja mora isprati propisanim slijedom pripremljenih otopina (2x otopina formijatne kiseline, 2x 10xPBS, 3x 1xPBS, 2x otopina za pohranu) te se filter ploča s matriksom ostavlja natopljena otopinom za pohranu i skladišti do ponovnog korištenja.

3.5. Deglikozilacija N-glikana IgA

Izolirani IgA iz uzorka plazme ispitanika mora biti denaturiran da bismo mogli enzimski provesti deglikozilaciju N-glikana molekule IgA. Liofilizatu izolirane IgA dodaje se 30 μ L 1,33% SDS-a te se inkubira 10 min na 65 °C s ciljem denaturacije proteina IgA. Poslije inkubacije i hlađenja uzorku se dodaje 10 μ L 4% IgePal-a koji stabilizira otopinu i priprema ju za dodatak enzima. Nakon 15 min inkubacije na tresilici, proces deglikozilacije provodimo dodatkom 10 μ L otopine 5xPBS i 0,12 μ L PNG-aze (N-glikozidaza) koji enzimski kida N-glikane s molekule IgA tijekom inkubacije 18 h na 37 °C.

3.6. Obilježavanje i pročišćavanje N-glikana IgA

N-glikani koji su enzimski uklonjeni sa IgA moraju se obilježiti i pročititi od nečistoća kako bi se mogli detektirati na završnom koraku kromatografije. Otopina za obilježavanje priprema se dodatkom 30%-ne otopine octene kiseline u DMSO u koju dodajemo još prokainamid A i 2-pikolin boran. U svaku jažicu s uzorkom dodajemo 25 μ L pripremljene otopine za obilježavanje te ploču inkubiramo 10 min na tresilici nakon čega se inkubira 2 h na 65 °C.

Nakon hlađenja slijedi pročišćavanje N-glikana IgA od svih zaostalih nečistoća iz koraka obilježavanja. Pročišćavanje se radi na GHP filter pločama (*Pall*) koju pripremamo tako što ju redom ispiremo 70%-om otopinom etanola, ultračistom vodom (miliQ) i 96%-om otopinom acetonitrila (ACN) koristeći pritom vakumsku pumpu. Postupak pročišćavanja počinje dodatkom

100%-og ACN svakom uzorku te se mješavina automatski pipetira na GHP ploče i inkubira 2 min, a vakumskom pumpom se ukloni višak tekućine. Potom se obilježeni N-glikani isperu četiri puta sa hladnim 96%-nim ACN, a peti puta se dodaje također hladni 96%-ni ACN te se centrifugira 5 min na 1000 rpm. U jažice GHP ploče s obilježenim N-glikanima dodaje se ultračista voda (miliQ) te se GHP ploča stavlja na PCR (*FrameStar*) ploču te se zajedno stave u inkubator 15 min na tesilicu i potom u centrifugu 5 min na 1000 rpm. Postupak dodavanja vode, inkubiranja i centrifugiranja se ponove još jednom, a na kraju se ploča s uzorcima hermetički zatvori i pohrani u hladnjak.

3.7. Analiza N-glikana IgA (HILIC-UPLC)

Obilježeni i pročišćeni N-glikani IgA analiziraju se kromatografskom tehnikom HILIC-UPLC (engl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Ultra-Performance Liquid Chromatography, *Waters, USA*) koja kombinira princip hidrofilnih interakcija i UPLC tehnologije za analizu i razdvajanje spojeva u tekućoj fazi. UPLC uređaj sastoji se od visokotlačne pumpe koja osigurava konstantan protok mobilne faze kroz kolonu, injekcijski sustav koji služi za precizno unošenje uzorka u sustav, kolone koja se u ovom slučaju sastoji od hidrofilne stacionarne faze i fluorescencijskog detektora koji identificira i kvantificira fluorescentno obilježene N-glikane. Uvjeti protoka kroz kolonu podešavani su u softveru koji je povezan na uređaj (*Empower* program, *Waters*) u kojemu su se također prikupljali podaci i analizirali rezultati. Obrada rezultata obuhvaćala je ručno integriranje površine ispod kromatograma, statističku obradu u Excelu i *MedCalc*-u te crtanje i prikazivanje rezultata u obliku grafova uz pomoć programa *R*.

Uvjeti razdvajanja N-glikana IgA prikazani su u Tablici 2 uzimajući u obzir da se sastav mobilne faze mijenjao sa omjera 28% otapala A i 72% otapala B na 41% otapala A i 59% otapala B. Tijekom procesa razdvajanja potrebno je kontrolirati tlak koji ne smije premašivati 15 000 bara te se protok podiže za 0,1 mL/min do željene brzine.

Tablica 2. Uvjeti razdvajanja N-glikana IgA na UPLC-u

PARAMETAR	OPIS
Kolona	ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide Column 150 mm
Veličina čestica	1,7 μm (veličina pora - 130Å)

Temperatura kolone	60°C
Temperatura uzorka	10°C
Otopina A (hidrofilno otapalo)	0,1 M amonijev formijat (pH=4,4)
Otopina B (hidrofobno otapalo)	Acetonitril (ACN)
Brzina protoka	0,561 mL/min
Valna duljina ekscitacije	310 nm
Valna duljina detekcije	370 nm

4. REZULTATI

4.1. N-glikom imunoglobulina A

Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvojeni su tekućinskom kromatografijom koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC) te se kao rezultat analize dobije kromatogram N-glikana prisutnih na IgA. Kromatogram sadrži 30 glikanskih pikova (GP) pri čemu neki pikovi obuhvaćaju više od jednog N-glikana (*Slika 3*). Varijabla praćena na x-osi je retencijsko vrijeme (RT) koje pokazuje koliko su neki N-glikani hidrofilni ili hidrofobni. Obzirom da je stacionarna faza polarna i hidrofilna, glikani sa više šećernih jedinica biti će polarniji sa više negativnog naboja i jače će se vezati za stacionarnu fazu što rezultira kasnijim izlaskom tih glikana iz analize i većim retencijskim vremenom. S druge strane, glikani s manje šećernih jedinica imaju manji afinitet za vezanje na stacionarnu fazu što ih čini hidrofobnijima te ih nepolarna mobilna faza brže eluira kroz kolonu što rezultira manjim retencijskim vremenom. Varijabla koju pratimo na y-osi je intenzitet pojedine glikanske strukture što vidimo kao glikanske pikove (GP) stoga količinu određenog glikana svakog pika izražavamo kao postotak ukupne integrirane površine.

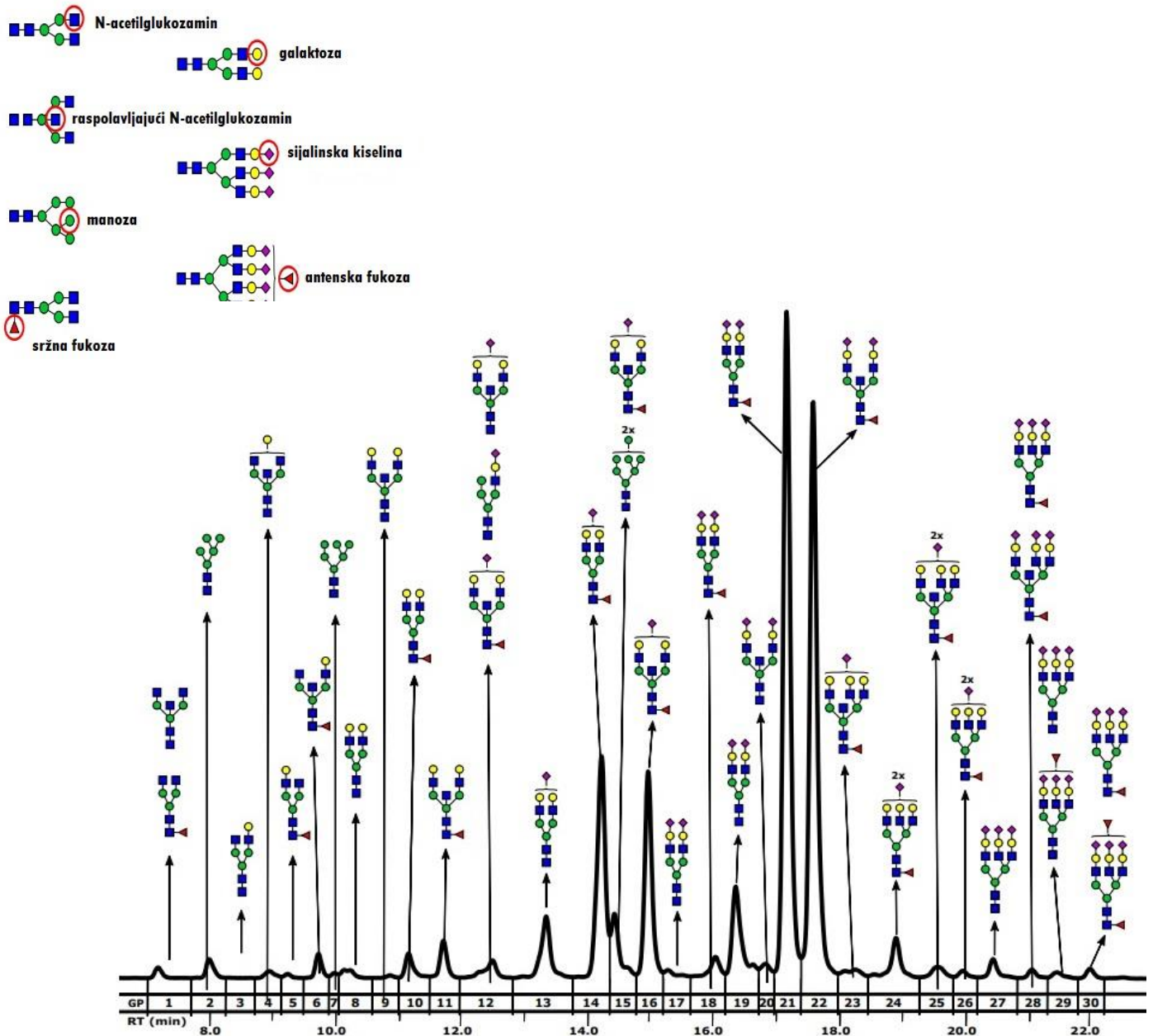
4.2. Statistička obrada podataka

Dobivene rezultate je bilo potrebno statistički obraditi prije provođenja statističkih testova. Podaci glikana su prvo normalizirani na ukupnu površinu kromatograma te se takve normalizirane vrijednosti koriste u daljnjem postupku. Normalizirane vrijednosti koristile su se za prikaz trenda svakog GP u ovisnosti o dobi (*Slika 4*).

Drugi korak podrazumijeva testiranje distribucije podataka Shapiro Wilk-ovim testom normalnosti sa pretpostavkom da distribucija podataka određenog GP prati normalnu raspodjelu te ako je p manje od 0,05 odbacuje se hipoteza i zaključuje se da distribucija određenog GP ne prati normalnu raspodjelu. Budući da je za daljnje testiranje potrebno koristiti normalizirane podatke, a testiranje glikana je pokazalo kako distribucija nije normalna, u trećem koraku je napravljena logaritamska transformacija svih podataka. Takvi logaritmirani podaci upisali su se u Excel tablicu sa filterima spola i filterom dobi svih zdravih ispitanika u tri dobne skupine [30 – 40), [40 – 50) i [50 – 60].

Takvi podaci korišteni su za daljnju statističku analizu u programu MedCalc gdje se koristio

statistički T-test za nezavisne uzorke. Njime se testiralo koji se glikani statistički značajno razlikuju između spolova te koji se glikani statistički značajno razlikuju između spolova unutar pojedine dobne skupine.



Slika 3. Prikaz kromatograma N-glikoma IgA sa grafičkim prikazom dominantne glikanske strukture koja odgovara svakom vrhu glikana (GP) sa popratnom legendom glikanskih sastavnih jedinica.

Za interpretaciju rezultata potrebno je prikazati N-glikom IgA sa svim navedenim glikanskim strukturama i karakteristikama (Tablica 3) (Štambuk T. i sur, 2023).

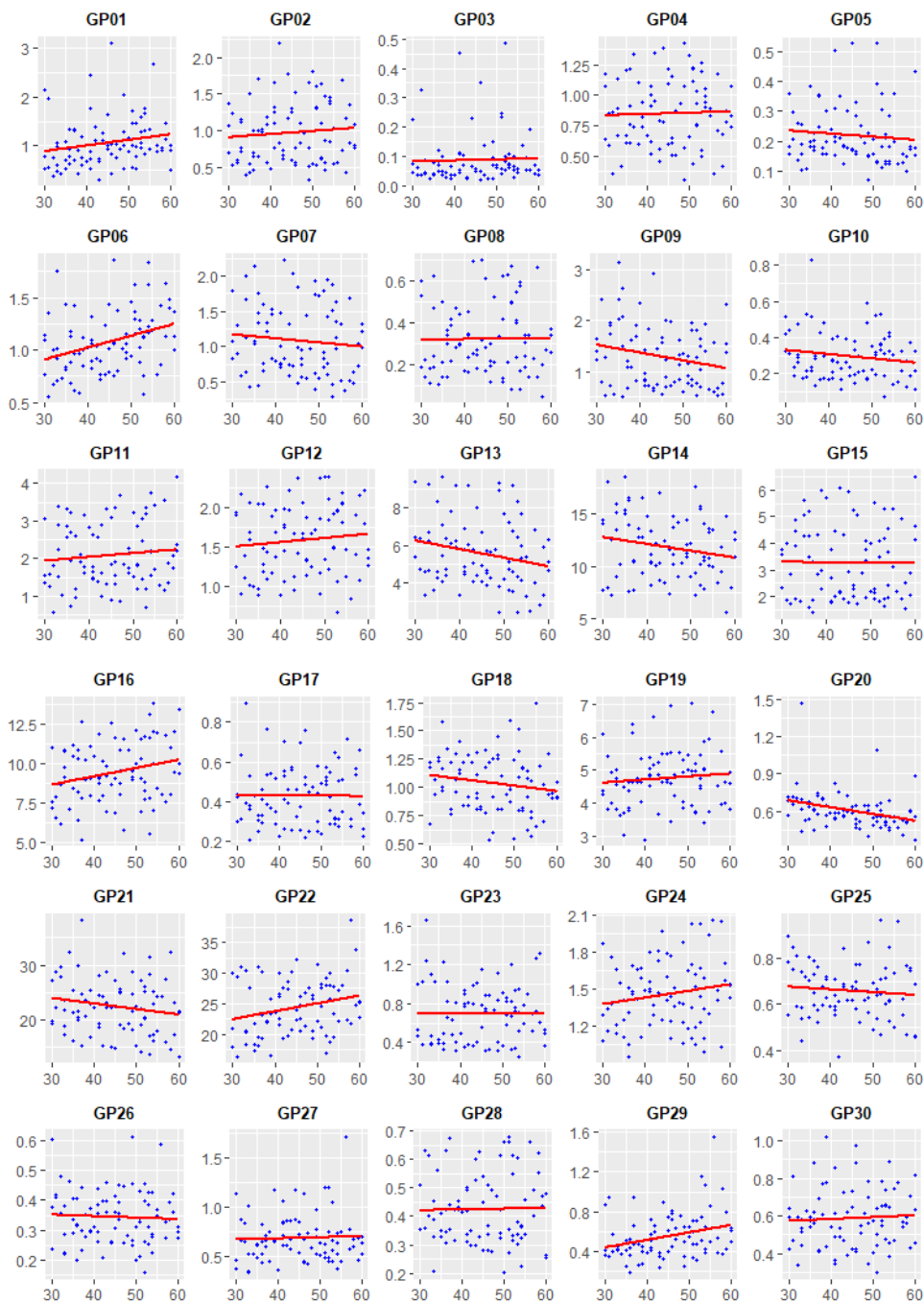
Tablica 3. N-glikom IgA

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

GP17	A2G2S2	digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni
GP18	FA2G2S2	sržna fukoza, digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni
	M9	oligomanozni
GP19	A2G2S2	digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni
GP20	A2BG2S2	digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni s račvajućim GlcNAc
GP21	FA2G2S2	sržna fukoza, digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni
GP22	FA2BG2S2	sržna fukoza, digalaktozilirani i disijalinizirani biantenarni s račvajućim GlcNAc
GP23	FA3BG3S1	sržna fukoza, trigalaktozilirani i monosijalinizirani triantenarni s račvajućim GlcNAc
GP24	FA3G3S2	sržna fukoza, trigalaktozilirani i disijalinizirani triantenarni
GP25	FA3BG3S2	sržna fukoza, trigalaktozilirani i disijalinizirani triantenarni s račvajućim GlcNAc
GP26	FA3G3S2	sržna fukoza, trigalaktozilirani i disijalinizirani triantenarni
GP27	A3G3S3	trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni
GP28	FA3G3S3	sržna fukoza, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni;
	FA3BG3S3	sržna fukoza, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni s račvajućim GlcNAc
GP29	A3G3S3	trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni
	A3F1G3S3	antenarna fukozilacija, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni
GP30	FA3G3S3	sržna fukoza, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni
	FA3F1G3S3	sržna i antenarna fukozilacija, trigalaktozilirani i trisijalinizirani triantenarni

4.3. Ovisnost N-glikana IgA o dobi

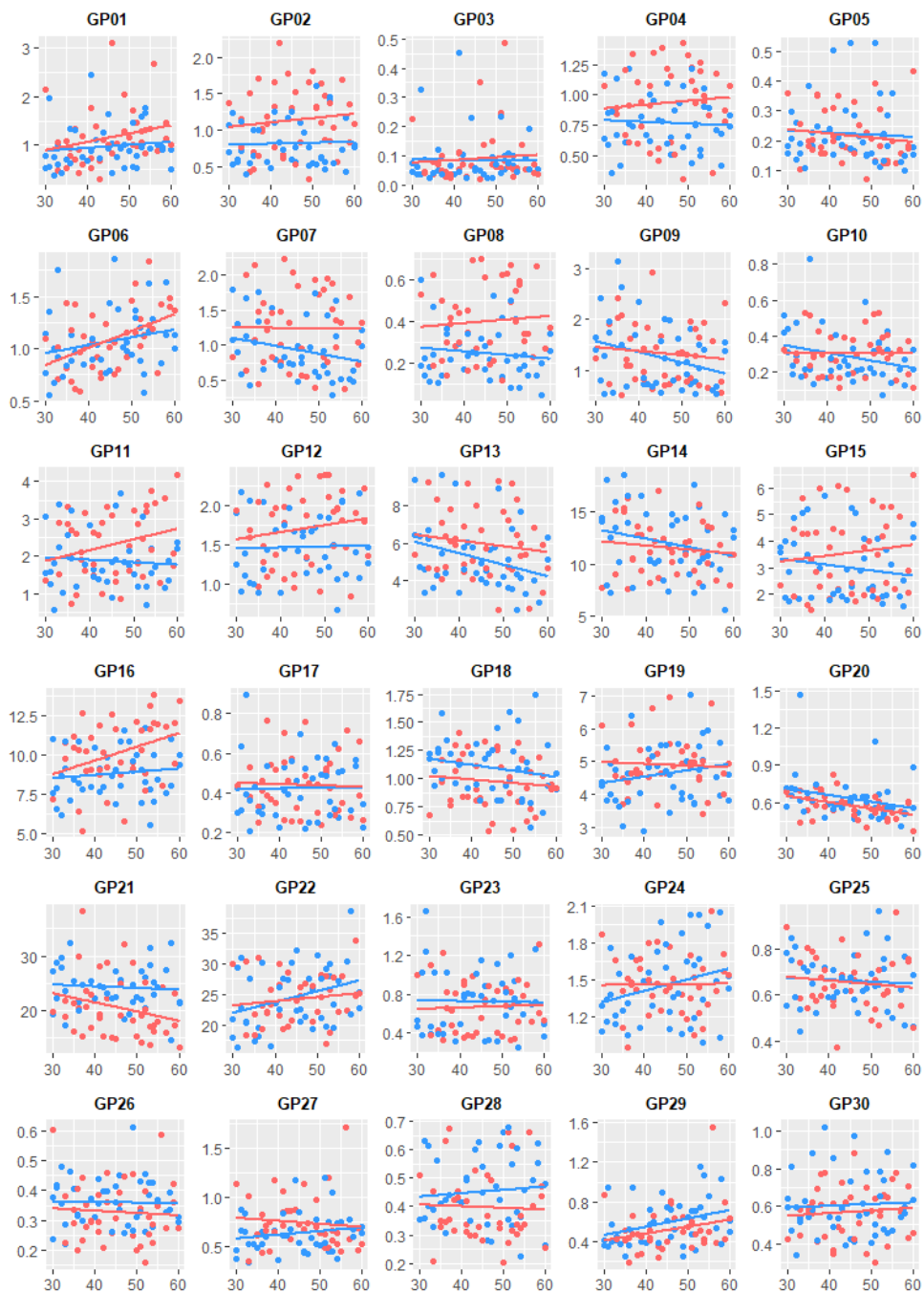
Kako bismo mogli analizirati N-glikozilaciju IgA kod zdrava 84 pojedinaca ovisno o dobi i ispitati ponašanje pojedine glikanske strukture ovisno o dobi, na *Slici 4.* je prikazan trend kretanja pojedinog glikana ovisno o dobi.



Slika 4. Grafički prikaz rezultata ovisnosti razine pojedinog glikana o dobi kako bismo prikazali tendenciju glikana u dobnom rasponu 30 - 60 godina kod 84 zdrava ispitanika.

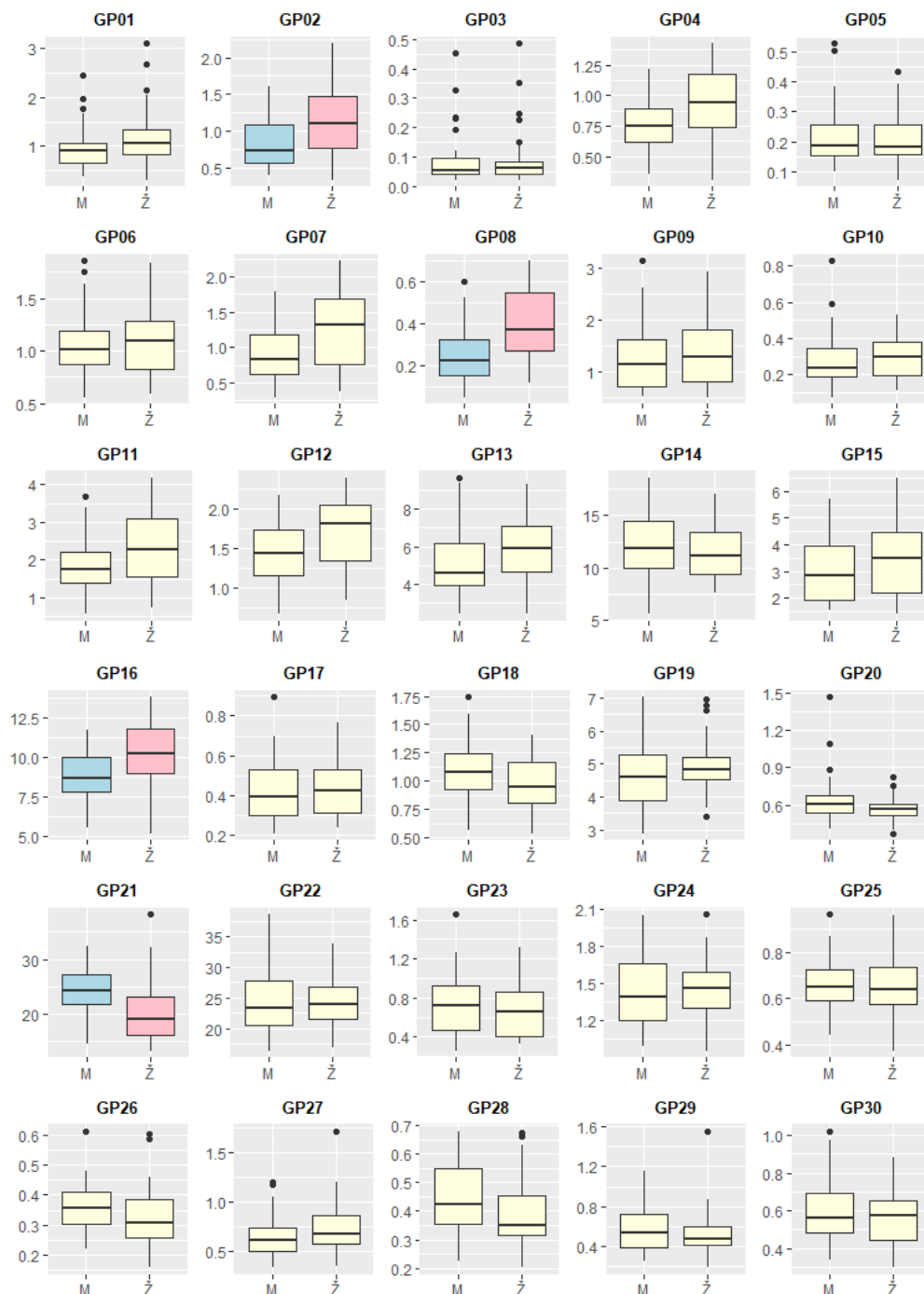
4.4. Ovisnost N-glikana IgA o spolu

Kako bismo mogli analizirati N-glikozilaciju IgA kod zdrava 84 pojedinca ovisno o spolu i ispitati ponašanje pojedine glikanske strukture ovisno o spolu, na *Slici 5.* je prikazan trend kretanja pojedinog glikana u ovisnosti o dobi za svaki spol.

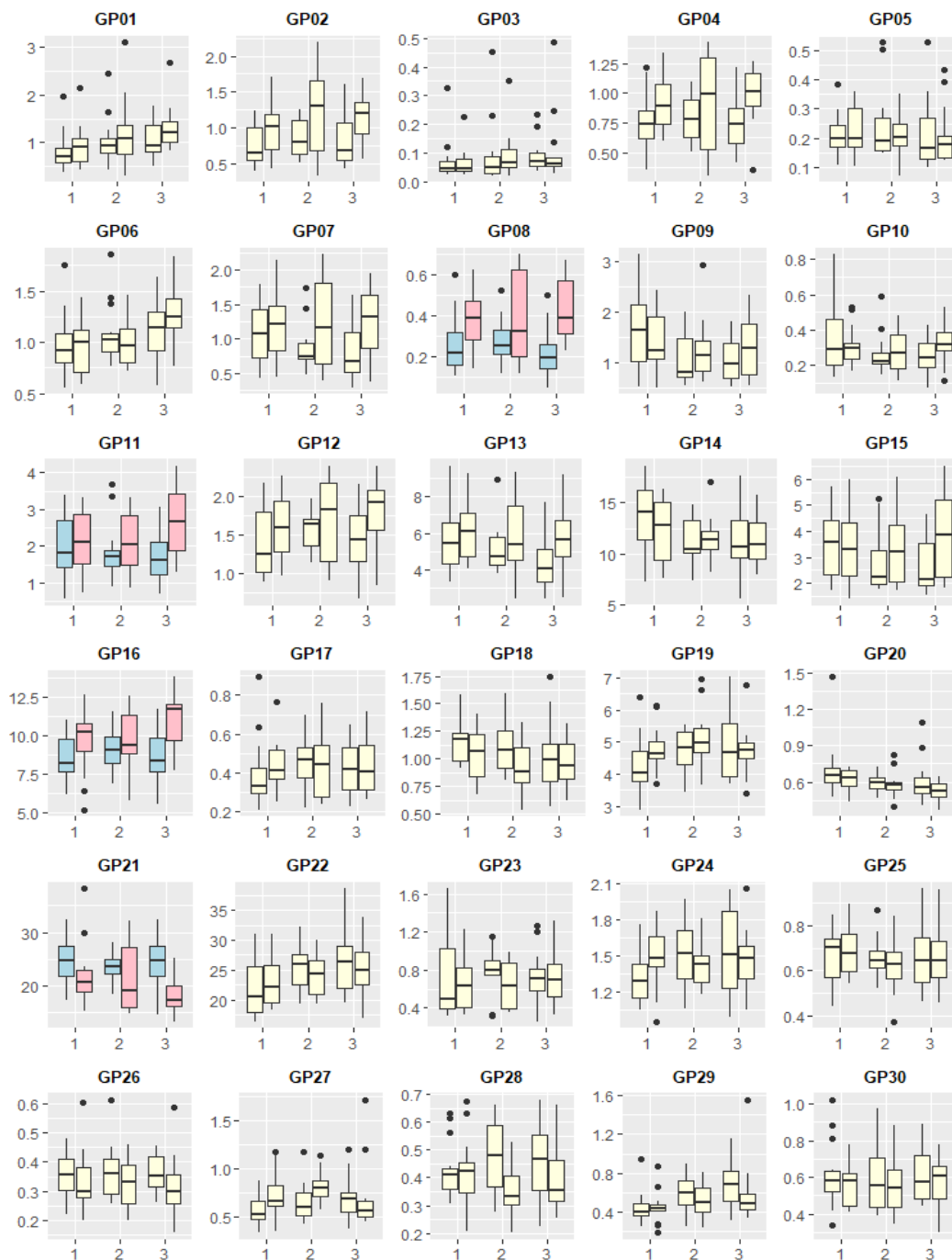


Slika 5. Prikaz rezultata ovisnosti razine pojedinog glikana o dobi 30-60 godina koji prikazuju trend svakog spola što vidimo kao dvije linije gdje plava linija označava muškarce, a crvena linija označava žene.

Budući da je cilj ovog diplomskog rada također identificirati glikanske strukture prisutne na IgA koje se razlikuju između spolova u pojedinoj dobnoj skupini, napravljena je analiza koja je obuhvaćala T-test logaritmiranih podataka i korekcija tih rezultata Benjamini Hochberg metodom. Rezultati su prikazani kao ovisnost razine glikana o spolu u dobi 30-60 godina (*Slika 5*) i kao ovisnost razine glikana o spolu u pojedinoj dobnoj skupini (*Slika 6*).



Slika 6. Prikaz rezultata statističke analize ovisnosti razine pojedinog glikana o spolu neovisno o dobi. Svaki grafikon predstavlja jedan GP iz kojeg možemo iščitati razliku u količini određenog glikana između spolova u dobi 30-60 godina (muškarci=M, žene=Ž). Obojani grafički prikazi predstavljaju statistički značajne glikane (plavo=muškarci, ružičasto=žene).



Slika 7. Prikaz rezultata statističke analize ovisnosti razine pojedinog glikana o spolu u pojedinim dobnim skupinama 1. [30-40), 2. [40-50) i 3. [50-60]. Svaki grafikon predstavlja jedan GP, a obojani grafički prikazi predstavljaju statistički značajne glikane (plavo=muškarci, ružičasto=žene).

5. RASPRAVA

N-glikozilacija plazmatskih proteina sve češće se istražuje u kontekstu raznih bolesti, kako s ciljem razumijevanja njihovog nastanka, tako i kao potencijalni dijagnostički biljeg. Stoga budućim studijama o istraživanju i razvoju prognostičkih, dijagnostičkih i terapijskih biljega i novih lijekova vezanih za imunoglobulin A uvelike mogu doprinijeti informacije o biološkoj varijabilnosti N-glikoma IgA ovisno o dobi i spolu. Budući da ovisnost IgA o dobi i spolu nije do sada istražena, upravo je ovaj diplomski rad imao za cilj pokazati postoje li razlike N-glikozilacije IgA ovisno o dobi i spolu. Sakupljeno je 84 uzoraka plazme zdravih pojedinaca te je nakon izolacije IgA, njegove deglikozilacije i fluorescentnog obilježavanja N-glikana provedena analiza kromatografskom tehnikom hidrofilne interakcije s detekcijom fluorescencije (HILIC-UPLC).

Rezultati su predočeni u obliku grafičkih prikaza na kojima možemo svaki glikan komentirati u ovisnosti o dobi ili spolu. Analizirajući *Sliku 4* porast razine glikana s povećanjem dobi pokazuju GP 1, 2, 6, 11, 12, 16, 19, 22, 24 i 29, a pad razine glikana s povećanjem dobi pokazuju GP 5, 7, 9, 10, 13, 14, 18, 20 i 21. Glikani čija se razina ne mijenja s povećanjem dobi su GP 3, 17, 23, 25, 26, 28 i 30. Iako grafički prikazi ovisnosti o dobi za oba spola (*Slika 4*) pokazuju kako glikani GP 4, 8, 15 i 27 ne pokazuju promjenu razine glikana s godinama, na *Slici 5* jasno se vide razlike između spolova za navedena četiri glikana. Naime, *Slika 5* pokazuje tendenciju razine pojedinog glikana svakog spola ovisno o dobi te je za navedena četiri glikana uočen upravo suprotan trend između spolova koji je rezultirao lažnom stagnacijom razina navedenih glikana. Dok se razina glikana GP 4, 8 i 15 kod žena povećava s povećanjem dobi, kod muškaraca se smanjuje. GP27 pak pokazuje obrnuti tijek razine glikana pa se kod žena vremenom smanjuje, a kod muškaraca povećava.

Analiziranjem karakteristika pojedinih glikana iz *Tablice 3* može se zaključiti kako se povećanjem dobi događaju veće promjene u razini glikana sa niskim stupnjem grananja, nego kod glikana sa visokim stupnjem grananja, u ovom slučaju triantenarnih glikana (GP 23-30). Jedini triantenarni glikanski pikovi kod kojih se uočavaju promjene porasta razine glikana su GP24 i GP29 i to s naglaskom na porast kod muškaraca, dok kod žena jedino GP29 pokazuje blagi porast s povećanjem dobi.

Praćenjem galaktozilacije, uočen je trend porasta negalaktoziliranih glikana s povećanjem dobi i to samo kod žena. Glikani nižeg stupnja galaktozilacije u koje ubrajamo monogalaktozilirane glikane (GP6 i GP12) i digalaktozilirane glikane (GP 8, 11, 15, 16, 22) također pokazuju porast

razine glikana kod žena povećanjem dobi i to s naglaskom najveće promjene u trećoj dobnoj skupini 50-60 godina. Povećanje razine glikana s manjim stupnjem galaktozilacije kod žena u dobi 50-60 godina može se povezati s podudarnim ulaskom u menopauzu kod većine žena kada u ženskom organizmu dolazi do brojnih bioloških promjena (Ding N i sur., 2011).

Kod muškaraca je zapaženo smanjenje razine digalaktoziliranih glikana (glikani niskog stupnja galaktozilacije) povećanjem dobi na što ukazuju trendovi glikana GP 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 18 i 20. Svi navedeni glikani, osim GP5 koji je monogalaktoziliran i GP7 koji pripada oligomanoznim glikanima, pripadaju skupini digalaktoziliranih glikana. Dosadašnje studije N-glikoma IgG pokazuju da galaktozilacija ima tendenciju smanjenja sa starenjem, a rezultati ovog rada N-glikoma IgA pokazuju sličnosti temeljem povećanja razine agalaktoziliranih glikana kod žena i smanjenjem digalaktoziliranih glikana kod muškaraca (Paton i sur., 2021).

U svrhu identifikacije glikanskih struktura prisutnih na IgA koje se razlikuju između žena i muškaraca u pojedinoj dobnoj skupini, proveden je statistički T-test uzimajući podatke neovisno o dobi za pojedini spol. Rezultati takvog testiranja pokazali su da postoji statistički značajno odstupanje kod glikanskih struktura GP 2, 8 16 i 21 između muškaraca i žena. U prijevodu, možemo reći da je razlika u razini glikana tijekom 30-60 godina između muškaraca i žena statistički značajna za navedene glikanske pikove. Dok GP 2, 8 i 16 kod žena pokazuju trend porasta razine glikana, GP21 pokazuje trend pada razine glikana kod žena u odnosu na muškarce.

Na kraju je provedeno i statističko testiranje ovisno o spolu za tri dobne skupine koje su definirane kao [30 – 40), [40 – 50) i [50 – 60]. Usporedbom muškaraca i žena u svakoj dobnoj skupini pokazana je statistički značajna razlika za GP 8, 11, 16 i 21 i to u trećoj dobnoj skupini (50-60) za sva četiri glikana. Navedeni rezultati za GP 8, 16 i 21 potvrđuju prethodno testiranje (*Slika 6*) i nadopunjuju zaključak kako se u dobi kada većina žena ulazi u menopauzu događaju najveće promjene u razinama N-glikana IgA.

Obzirom da glikani dokazano modificiraju funkcije proteina i sudjeluju u međustaničnim biološkim procesima, meta su brojnih istraživanja kao potencijalni prediktivni biljezi starenja, ali i u svrhu razvoja terapija i lijekova. Važno je poznavati karakteristike i promjene glikoma u ovisnosti o dobi i spolu budući da on odražava status interakcija u stvarnom vremenu te stoga bilo kakve promjene u glikomu mogu poslužiti za razvoj potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biljega za multifaktorijalne bolesti kao što su diabetes mellitus tipa 2, metabolički sindromi i

kronične upalne bolesi.

6. ZAKLJUČCI

N-glikozilacija imunoglobulina A u ovisnosti o dobi i spolu do sada nije istraživana, a rezultati praćenja tendencije i ponašanja pojedinog glikana uspoređene su ovisno o karakteristikama glikana te su dobivene statistički značajne razlike razina određenih N-glikana IgA obzirom na spol.

Povećanjem dobi događaju se veće promjene u razini glikana niskog stupnja grananja u usporedbi s glikanima visokog stupnja grananja, koje su u slučaju N-glikana IgA triantenarni (GP 23-30). Izuzetak su GP24 i GP29 koji pokazuju značajniji porast razine glikana kod muškaraca.

Budući da je GP1 jedini predstavnik struktura negalaktoziliranih glikana IgA, za njih je uočen trend porasta koji je izraženiji kod žena s povećanjem dobi nego kod muškaraca. Povećanje razine negalaktoziliranih glikana podudara se sa dosadašnjim studijama N-glikoma IgG, kao i tendencija smanjenja digalaktoziliranih glikana, ali samo kod muškaraca. Ono što se razlikuje je tendencija povećanja razine N-glikana manjeg stupnja galaktozilacije s povećanjem dobi kod žena. Monogalaktozilirani i digalaktozilirani glikani pokazuju trend povećanja starenjem kod žena s naglaskom na najveću promjenu u trećoj dobnoj skupini (50-60).

Rezultati statističkog testiranja pokazuju da se razine glikana između muškaraca i žena u pojedinim dobnim skupinama statistički značajno razlikuju u GP 8, 11, 16 i 21. Sva četiri glikanska pika pokazuju statistički značajnu razliku u trećoj dobnoj skupini (50-60) što se podudara sa vremenom kada većina žena ulazi u menopauzu prilikom čega u organizmu dolazi do brojnih hormonskih i bioloških promjena.

Činjenica da se razine N-glikana IgA mijenjaju s dobi i da postoje statistički značajne razlike određenih glikanskih struktura između spolova ukazuju na postojanje neprestanih promjena u ljudskom glikomu te dobiveni rezultati mogu poslužiti kao podloga za otkrivanje novih biljega starenja i bolesti kao i razvoja novih lijekova.

7. POPIS KRATICA

ACN	acetonitril
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (engl. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
Asn	asparagain
CDG	kongenitalni poremećaji glikozilacije (eng. <i>Congenital disorders of glycosilation</i>)
CL	konstatna domena lakog lanca imunoglobulina
Ca1, Ca2, Ca3	konstatne domene teškog lanca imunoglobulina
dIgA	dimerni oblik IgA
DMSO	dimetilsulfoksid
ER	endoplazmatski retikulum
FcαRI (CD89)	receptor na imunskim stanicama
Fuc	fukoza
GA	golgijev aparat
GAG	glikozaminoglikan
Gal	galaktoza
Glc	glukoza
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GLUT4	transporter glukoze na membrani mišićnih stanica i adipocita (engl. <i>Glucose transporter type 4</i>)
GP	glikanski pik
GPI	glikozilfosfatidilinozitol
HILIC-UPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofobnim interakcijama (engl. <i>Hydrophilic Interaction Liquid Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
IgA	imunoglobulin A
IgAN	IgA nefropatija
IgAV	IgA vaskulitis
IgePal	nonilfenoksietanol (emulgator, deterdžent i surfaktant)
IgG	imunoglobulin G
Man	manoza

MBL	lektin koji veže manozu (engl. <i>mannose-binding lectin</i>)
mIgA	monoklonska protutijela IgA
mIgG	monoklonska protutijela IgG
NET	ekstracelularne zamke neutrofila (engl. <i>neutrophil extracellular traps</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pIgR	polimerni imunoglobulinski receptor
Pro	prolin
RA	reumatoidni artritis
RT	retencijsko vrijeme
SC	sekretorna komponenta
SDS	natrijev dodecilsulfat
sIgA	sekretorni oblik IgA
SLE	sistemska eritemski lupus
VH	varijabilna domena teškog lanca imunoglobulina
VL	varijabilna domena lakog lanca imunoglobulina
VMGAT5	enzim <i>N</i> -acetilglukozaminiltransferaza 5

8. POPIS LITERATURE

Akhter H, Aziz F, Ullah FR, Ahsan M, Islam SN. *Immunoglobulins content in colostrum, transitional and mature milk of Bangladeshi mothers: Influence of parity and sociodemographic characteristics*. J Mother Child, 2021, 24 (3), 8-15.

Breedveld A, van Egmond M. *IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities*. Frontiers in Immunology, 2019, 10, 553.

Colley KJ, Varki A, Kinoshita T. *Cellular Organization of Glycosylation*. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology 3rd ed*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015–2017.

de Sousa-Pereira P, Woof JM. *IgA: Structure, Function, and Developability*. Antibodies (Basel), 2019, 8 (4), 57.

Ding L, Chen X, Cheng H, Zhang T, Li Z. *Advances in IgA glycosylation and its correlation with diseases*. Frontiers in Immunology, 2022, 10.

Ding N, Nie H, Sun X, Sun W, Qu Y, Liu X, Yao Y, Liang X, Chen CC, Li Y. *Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent*. Age Ageing, 2011, 40 (5), 568-75.

Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brünker P, Umaña P. *The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms*. Journal of biological chemistry, 2006, 281 (8), 5032-6.

Gudelj I, Keser T, Vučković F, Škaro V, Goreta SŠ, Pavić T, Dumić J, Primorac D, Lauc G, Gornik O. *Estimation of human age using N-glycan profiles from bloodstains*. International Journal of Legal Medicine, 2015, 129 (5), 955-61.

Hirata T, Kizuka Y. *N-Glycosylation*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2021, 1325, 3-24.

Justiz Vaillant AA, Jamal Z, Patel P, et al. *Immunoglobulin*. StatPearls, 2023, 1-9.

Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. *Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation*. Science, 2006, 313 (5787), 670-3.

Knoppova B, Reily C, Maillard N, Rizk DV, Moldoveanu Z, Mestecky J, Raska M, Renfrow MB,

Julian BA, Novak J. *The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy*. *Frontiers in Immunology*, 2016, 12 (7), 117.

Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N, Sarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Spector T, Lauc G. *Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages*. *Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2014, 69 (7), 779-89.

Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, Dennis JW. *Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation*. *Cell*, 2007, 129 (1), 123-34.

Paton B, Suarez M, Herrero P, Canela N. *Glycosylation Biomarkers Associated with Age-Related Diseases and Current Methods for Glycan Analysis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (11), 5788.

Pucic M, Knezevic A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, Gornik O, Supraha-Goreta S, Wormald MR, Redžić I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, Wilson JF, Rudan I, Wuhrer M, Rudd PM, Josić D, Lauc G. *High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations*. *Mol Cell Proteomics*. 2011, 10 (10).

Pucic M, Muzinic A, Novokmet M, Skledar M, Pivac N, Lauc G, Gornik O. *Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence*. *Glycobiology*, 2012, 22 (7), 975-82.

Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. *Glycosylation in health and disease*. *Nature Reviews Nephrology*, 2019, 15 (6), 346-366.

Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. *Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway*. *Journal of Immunology*, 2001, 167 (5), 2861-8.

Rudd P, Karlsson NG, Khoo KH, Packer NH. *Glycomics and Glycoproteomics*. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology 3rd ed*. Cold Spring

Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015–2017.

Seeberger PH. *Monosaccharide Diversity*. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology 3rd ed*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015–2017.

Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. *N-Glycans*. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology 3rd ed*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015–2017.

Štambuk T, Kifer D, Smirčić-Duvnjak L, Vučić Lovrenčić M, Gornik O. *Associations between plasma protein, IgG and IgA N-glycosylation and metabolic health markers in pregnancy and gestational diabetes*. PLoS One, 2023, 18 (4).

Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. *The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity*. Journal of biological chemistry, 2003, 278 (5), 3466-73.

Varki A, Kannagi R, Toole B, Stanley P. *Glycosylation Changes in Cancer*. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology 3rd ed*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015–2017.

Woof J.M., Kerr M.A. *The function of immunoglobulin A in immunity*. Journal of Pathology, 2006, 208, 270-282.

Woof J.M., Mestecky J. *Mucosal immunoglobulins*. Immunological Reviews, 2005, 206, 64-82.

Yoo EM, Morrison SL. *IgA: an immune glycoprotein*. Clinical Immunology, 2005, 116 (1), 3-10.

9. SAŽETAK

Promjene u procesu N-glikozilacije glikana vezanih na imunoglobulin A dokazano modificiraju djelovanje imunološkog sustava budući da glikani sudjeluju u procesu smatanja i transporta proteina, ali i izvršavanja funkcije proteina unutarstaničnom i izvanstaničnom signalizacijom. Obzirom da je N-glikozilacija imunoglobulina A do sada neistražena, ciljevi ovog diplomskog rada bili su 1) analizirati N-glikozilaciju IgA kod 84 zdrava ispitanika, 2) ispitati ponašanje pojedine glikanske strukture ovisno o dobi i spolu te 3) identificirati glikanske strukture prisutne na IgA koje se razlikuju između žena i muškaraca u pojedinoj dobnoj skupini. Učinjena je izolacija IgA iz plazme ispitanika, deglikozilacija N-glikana te obilježavanje i pročišćivanje N-glikana, a analiza je učinjena kromatografskom tehnikom hidrofilne interakcije s detekcijom fluorescencije (HILIC-UPLC).

Rezultati su pokazali događanje većih promjena u razini glikana niskog stupnja grananja u usporedbi s glikanima visokog stupnja grananja (GP 23-30). Uočen je trend porasta negalaktoziliranih glikana izraženiji kod žena povećanjem dobi. Monogalaktozilirani i digalaktozilirani glikani pokazuju trend porasta kod žena, dok se razina digalaktoziliranih glikana smanjuje kod muškaraca s dobi. Glikanske strukture GP 8, 11, 16 i 21 pokazuju statistički značajnu razliku između žena i muškaraca u trećoj dobnoj skupini (50-60) što se podudara sa grafičkim prikazima tendencija glikana. Stoga možemo zaključiti da se najveće promjene razina glikana s naglaskom na ženski spol događaju u trećoj dobnoj skupini (50-60) što se može povezati sa ulaskom većina žena u period menopauze kada se događaju brojne biološke promjene u organizmu.

Pokazane promjene koje se događaju ovisno o dobi i spolu i bolje poznavanje biološke varijabilnosti N-glikana imunoglobulina A trebaju se uzeti u obzir u budućim istraživanjima potencijalnih prognostičkih, dijagnostičkih i terapijskih biljega kao i biljega starenja.

10. SUMMARY

Changes in the N-glycosylation profile of immunoglobulin A have been proven to modify the function of the immune system, as glycans participate in the protein folding and transport process, as well as in the intracellular and extracellular signaling processes. Since N-glycosylation of immunoglobulin A has been unexplored so far, the aim of this study was to 1) analyze the N-glycosylation of IgA in 84 healthy individuals, 2) investigate the behavior of individual glycan structures depending on age and gender, and 3) identify glycan structures present on IgA that differ between women and men in specific age groups. Glycan analysis included isolation of IgA from participants' plasma, deglycosylation of N-glycans, glycan labeling, purification and final separation of N-glycans using ultra-performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions (HILIC-UPLC).

The results showed greater changes in the levels of low-branched glycans compared to high-branched glycans (GP 23-30), which level is more stable over time. Increased levels of agalactosylated glycans were observed in women with increasing age. Monogalactosylated and digalactosylated glycans showed an increasing trend in women, while digalactosylated glycans decreased in men with age. Glycan structures GP 8, 11, 16, and 21 exhibited statistically significant differences between men and women in the third age group (50-60), which aligns with the graphical representations of glycan trends. Therefore, we can conclude that the most significant changes in glycan levels, particularly for the female gender, occur in the third age group (50-60), which may be associated with entering menopause for most women when numerous biological changes occur in the body.

Shown results of changes depending on age and gender lead to a better understanding of the biological variability of N-glycans in immunoglobulin A, which should be taken into account for future research in identifying potential prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers, as well as biomarkers of aging.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA A OVISNO O DOBI I SPOLU ISPITANIKA

Pavla Kraljević

SAŽETAK

Promjene u procesu N-glikozilacije glikana vezanih na imunoglobulin A dokazano modificiraju djelovanje imunološkog sustava budući da glikani sudjeluju u procesu smatanja i transporta proteina, ali i izvršavanja funkcije proteina unutarstaničnom i izvanstaničnom signalizacijom. Obzirom da je N-glikozilacija imunoglobulina A do sada neistražena, ciljevi ovog diplomskog rada bili su 1) analizirati N-glikozilaciju IgA kod 84 zdrava ispitanika, 2) ispitati ponašanje pojedine glikanske strukture ovisno o dobi i spolu te 3) identificirati glikanske strukture prisutne na IgA koje se razlikuju između žena i muškaraca u pojedinoj dobnoj skupini. Učinjena je izolacija IgA iz plazme ispitanika, deglikozilacija N-glikana te obilježavanje i pročišćivanje N-glikana, a analiza je učinjena kromatografskom tehnikom hidrofilne interakcije s detekcijom fluorescencije (HILIC-UPLC).

Rezultati su pokazali događanje većih promjena u razini glikana niskog stupnja grananja u usporedbi s glikanima visokog stupnja grananja (GP 23-30). Uočen je trend porasta negalaktoziliranih glikana izraženiji kod žena povećanjem dobi. Monogalaktozilirani i digalaktozilirani glikani pokazuju trend porasta kod žena, dok se razina digalaktoziliranih glikana smanjuje kod muškaraca s dobi. Glikanske strukture GP 8, 11, 16 i 21 pokazuju statistički značajnu razliku između žena i muškaraca u trećoj dobnoj skupini (50-60) što se podudara sa grafičkim prikazima tendencija glikana. Stoga možemo zaključiti da se najveće promjene razina glikana s naglaskom na ženski spol događaju u trećoj dobnoj skupini (50-60) što se može povezati sa ulaskom većina žena u period menopauze kada se događaju brojne biološke promjene u organizmu.

Pokazane promjene koje se događaju ovisno o dobi i spolu i bolje poznavanje biološke varijabilnosti N-glikana imunoglobulina A trebaju se uzeti u obzir u budućim istraživanjima potencijalnih prognostičkih, dijagnostičkih i terapijskih biljega kao i biljega starenja.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 7 grafičkih prikaza, 3 tablice i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Imunoglobulin A, N-glikozilacija, HILIC-UPLC, dob, spol

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

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

Dr. sc. Toma Keser, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Domagoj Kifer, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

N-GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN A DEPENDING ON THE AGE AND GENDER OF A SUBJECT

Pavla Kraljević

SUMMARY

Changes in the N-glycosylation profile of immunoglobulin A have been proven to modify the function of the immune system, as glycans participate in the protein folding and transport process, as well as in the intracellular and extracellular signaling processes. Since N-glycosylation of immunoglobulin A has been unexplored so far, the aim of this study was to 1) analyze the N-glycosylation of IgA in 84 healthy individuals, 2) investigate the behavior of individual glycan structures depending on age and gender, and 3) identify glycan structures present on IgA that differ between women and men in specific age groups. Glycan analysis included isolation of IgA from participants' plasma, deglycosylation of N-glycans, glycan labeling, purification and final separation of N-glycans using ultra-performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions (HILIC-UPLC).

The results showed greater changes in the levels of low-branched glycans compared to high-branched glycans (GP 23-30), which level is more stable over time. Increased levels of agalactosylated glycans were observed in women with increasing age. Monogalactosylated and digalactosylated glycans showed an increasing trend in women, while digalactosylated glycans decreased in men with age. Glycan structures GP 8, 11, 16, and 21 exhibited statistically significant differences between men and women in the third age group (50-60), which aligns with the graphical representations of glycan trends. Therefore, we can conclude that the most significant changes in glycan levels, particularly for the female gender, occur in the third age group (50-60), which may be associated with entering menopause for most women when numerous biological changes occur in the body.

Shown results of changes depending on age and gender lead to a better understanding of the biological variability of N-glycans in immunoglobulin A, which should be taken into account for future research in identifying potential prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers, as well as biomarkers of aging.

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

Thesis includes: 48 pages, 7 figures, 3 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Immunoglobulin A, N-glycosylation, HILIC-UPLC, age, sex

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

Reviewers: **Olga Gornik Kljaić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Toma Keser, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Domagoj Kifer, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.