

Dugovječnost i glikozilacija IgG: Studija stabilnosti N-glikana tijekom desetljeća

Vuk, Jakov

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:163:170702>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Jakov Vuk

**Dugovječnost i glikozilacija IgG: Studija stabilnosti
N-glikana tijekom desetljeća**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023

Ovaj je diplomski rad prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom i u Genos d.o.o laboratoriju za glikobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca.

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Gordanu Laucu na pruženoj prilici i realizaciji
eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Posebne zahvale dugujem prijatelju i kolegi mag. med. biochem. Borni
Rapčanu koji je svo vrijeme bio uz mene, poticao me, pružio mi podršku,
bio izvor informacija i savjeta te mi nastojao omogućiti zanimljivu i
nadasve kvalitetnu izradu ovog diplomskog rada.*

Zahvaljujem.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GLIKANI I GLIKOKONJUGATI.....	1
1.2. GLIKOZILACIJA PROTEINA	4
1.2.1. N-glikozilacija	4
1.2.2. O-glikozilacija	6
1.3. N-GLIKOM	7
1.3.1. N-glikom krvne plazme.....	7
1.3.2. N-glikom imunoglobulina G (IgG)	10
1.4. METODE ANALIZE N-GLIKANA	15
1.5. AUTOMATIZACIJA ANALIZE GLIKANA IGG-A.....	21
1.6. VAŽNOST GLIKANA U PREDIKTIVNOJ MEDICINI	26
2. OBRAZLOŽENJE TEME	28
3. MATERIJALI I METODE	29
3.1. MATERIJALI	29
3.1.1. Kemikalije i enzimi	29
3.1.2. Uređaji i pribor.....	31
3.1.3. Priprema pufera i otopina	32
3.1.4. Ispitanici i uzorkovanje.....	34
3.2. METODE	35
3.2.1. Izolacija IgG iz krvne plazme automatiziranom metodom pomoću monolita s proteinom G	35
3.2.1.1. Pripremanje plazma standarda i plazma uzoraka	35
3.2.1.2. Filtriranje uzoraka.....	35
3.2.1.3. Pre-kondicioniranje Protein G pločice monolita	35
3.2.1.4. Vežanje IgG i ispiranje.....	36
3.2.1.5. Elucija IgG	36
3.2.1.6. Regeneracija i čuvanje pločice monolita s proteinom G.....	36
3.2.1.7. Mjerenje koncentracije i pohrana IgG	36
3.2.2. In solution deglikozilacija i APTS bojanje za xCGE-LIF	37
3.2.2.1. Denaturacija	37
3.2.2.2. Deglikozilacija.....	37
3.2.3. HILIC-SPE pročišćavanje N-glikana za xCGE-LIF	37
3.2.3.1. Zaustavljanje reakcije obilježavanja glikana	37
3.2.3.2. Priprema i kondicioniranje Bio-Gel P-10 gela	38
3.2.3.3. Pročišćavanje APTS-obilježenih N-glikana	38
3.2.3.4. Elucija APTS-obilježenih N-glikana	38
3.2.3.5. xCGE-LIF analiza N-glikana IgG	39
3.2.3.6. Analiza podataka	40
4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. VREMENSKA STABILNOST N-GLIKANA IGG U RAZDOBLJU OD PET GODINA	47
4.2. VREMENSKA STABILNOST N-GLIKANA IGG U RAZDOBLJU OD DESET GODINA	50
5. ZAKLJUČCI	53
6. LITERATURA	54
7. SAŽETAK	59
8. SUMMARY	60

9. Temeljna dokumentacijska kartica

10. Basic documentation card

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

2-AA	2-antranilna kiselina
2-AB	2-aminobenzamid
2-PB	2-pikolin boran
ACN	Acetonitril
ADCC	Citotoksičnost ovisna o protutijelima
ANTS	2-aminonaftalen trisulfonska kiselina
APTS	8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
BCR	Receptor B stanice
CDC	Citotoksičnost ovisna o komplementu
CE	Kapilarna elektroforeza
C_H	Konstantna regija teškog lanca
C_L	Konstantna regija lakog lanca
ConA	Lektin konkavalin A
CRP	C-reaktivni protein
Cys	Cistein
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
ER	Endoplazmatski retikulum
ESI	Elektron-sprej ionizacija
FcγR	Fc gama receptor
Fuc	α -L-fukoza
GAG	Glikozaminoglikan
Gal	Galaktoza
GalNAc	N-acetil- α -D-galaktozamin
Glc	α -D-glukoza
GlcA	D-glukuronska kiselina
GlcNAc	N-acetil- α -D-glukozamin
GPI sidra	Glikozil-fosfatidilinozitolna sidra
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IdoA	L-iduronska kiselina
IgA	Imunoglobulin A
IgD	Imunoglobulin D
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IUPAC	Međunarodna organizacija za čistu i primijenjenu kemiju
LC	Tekućinska kromatografija
Man	α -D-manoza

MS	Masena spektrometrija
NeuAc	N-acetilneuraminska kiselina
Neu5Gc	N-glikolilneuraminska kiselina
NK-stanica	Stanice prirodne ubojice
NMR	Nuklearna magnetska rezonancija
NSAIL	Nesteroidni antiinflamatorni lijekovi
OST	Oligosaharil transferaza
PA	2-aminopiridin
PCA	Prokainamid
PNGaze F	Peptid-N(4)-(N-acetil-beta-glukozaminil) asparagin amidaza
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinska kiselina
SDS	Natrijev dodecil sulfat
Ser	Serin
Sia	Sijalinska kiselina
SILAC	Obilježavanje stabilnim izotopima aminokiselina u staničnim kulturama
sLex	Sijalil-Lewis x epitop
SRM	Selektivno praćenje reakcije
TEA	Trietanolamin
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UHPLC	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti
V_H	Varijabilna regija teškog lanca
V_L	Varijabilna regija lakog lanca
WGA	Agglutinin pšeničnih klica (wheat germ agglutinin)
xCGE-LIF	Multipleksna kapilarna gel elektroforeza s laserom potaknutom fluorescencijom
Xyl	β-D-ksilozu

1. Uvod

1.1. Glikani i glikokonjugati

Prema Međunarodnoj organizaciji za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC), termin se glikan poistovjećuje s terminom polisaharid, što označava spojeve sastavljene od velikog broja monosaharida međusobno povezanih glikozidnim vezama (<https://goldbook.iupac.org/terms/view/G02645>). Međutim, u praksi se termin „glikan“ također koristi kako bi se referiralo na šećerni, odnosno, ugljikohidratni dio glikokonjugata (glikoproteini, proteoglikani, glikolipidi). Repertoar je monosaharida u glikokonjugatima ograničen, a najčešći su α -D-glukoza (Glc), α -D-galaktoza (Gal), N-acetil- α -D-glukozamin (GlcNAc), N-acetil- α -D-galaktozamin (GalNAc), α -D-manoza (Man), α -L-fukoza (Fuc), β -D-ksilozu (Xyl) i N-acetilmuraminska kiselina (sijalinska kiselina; Sia) (Lauc i sur., 2014). Cjelokupni repertoar glikana u određenom vremenu i uvjetima nekog organizma, stanice, tkiva ili proteina nazivamo glikom, a područje koje se bavi proučavanjem glikoma naziva se glikomika.

Glikani imaju važnu ulogu u mnogim staničnim procesima zbog svoje široke prisutnosti. Oni su osnovna struktura stanica i mnogih makromolekula, poput imunoglobulina, te se sastoje od kovalentno vezanih monosaharida ili oligosaharida (Varki A i sur., 2022). Glikani igraju ključnu ulogu kao prvi kontakt između stanica, patogena ili toksina. Sudjeluju u staničnoj adheziji, ekstravazaciji leukocita, međudjelovanju makromolekula, smatanju i sekreciji proteina te imaju važnu ulogu u imunološkim procesima i patofiziologiji različitih bolesti (Varki A i sur., 2022). Svojom strukturom i negativnim nabojem, glikani privlače vodu i formiraju gelove, što doprinosi formiranju izvanstaničnog matriksa. Oni obavljaju različite uloge, poput lubrikacije i zaštite (mucini), transporta (transferin), hormonske regulacije (tireostimulirajući hormon), građevinskih funkcija (hitin, celuloza) te služe kao izvor energije (glikogen, škrob) (Cummings i Etzler, 2009). Njihova prisutnost na endotelu kapilara omogućuje fleksibilnost kapilara i prolazak eritrocita kroz njih. Također, Marek i suradnici su pokazali kako je deficijencija N-glikozilacije u staničnim linijama letalna za embrij, što sugerira da je formacija N-glikana esencijalna za ranu embriogenezu (Marek i sur., 1999). Ukratko, glikani su ključne biomolekule koje sudjeluju u raznim staničnim procesima i imaju važne uloge u organizmu, uključujući interakciju između stanica, formiranje izvanstaničnog matriksa te regulaciju funkcija i signalizaciju u tijelu.

Uzimajući u obzir činjenice da čovjek brojem gena premašuje jednostavne bakterije za samo faktor pet, da imamo gotovo isti broj gena kao miš ili zebrica, te da se naš genom od genoma čimpanze razlikuje za samo 4%, jasno je kako naša posebnost i determiniranost ne proizlazi samo iz broja gena ili gena koji su jedinstveni čovjeku (Gornik i sur., 2012). Projekt sekvenciranja ljudskog genoma 90' godina imao je za cilj otkriti što nas čini posebnima, ali se ispostavilo da se genomi ljudi i bliskih životinja zapravo malo razlikuju. Geni su samo alati, a naša sposobnost da ih koristimo na poseban način leži u epigenetici, nekodirajućoj DNA, izrezivanju RNA (RNA splicing), posttranslacijskim modifikacijama i drugim biološkim procesima. Jedna od važnih posttranslacijskih modifikacija koja ima veliki potencijal u razumijevanju načina na koji koristimo naše gene je glikozilacija. Razumijevanje glikozilacije u čovjeku je važan korak prema potpunom rasvjetljavanju načina na koje ljudsko tijelo funkcionira (Gornik i sur., 2012).

Važnost glikana najbolje dočarava činjenica da značajan dio mase stanica ili glikokonjugata čini glikanski dio, odnosno, dio koji sadrži šećerne jedinice (Varki, 1993). Sinteza glikana se razlikuje od sinteze proteina temeljene na DNA predlošku. Umjesto toga, sinteza glikana ovisi o kombinaciji genetičkih i epigenetičkih čimbenika, što omogućuje brzu prilagodbu organizma na promjene u okolini. Glikani integriraju ove genetske i okolišne faktore te predstavljaju oblik stanične memorije koji modulira trenutnu staničnu fiziologiju na temelju nedavnih događaja. Za promjenu ili prilagodbu ljudskih proteina obično su potrebne godine, mutacije i nasljeđivanje odabranih karakteristika, dok su glikani gotovo trenutno promjenjivi (u usporedbi s proteinima) tijekom čitavog životnog vijeka. Stoga, glikani nisu izravno kodirani u genomu, već su sekundarni proizvodi gena. Najmanje 10% ljudskog genoma (Lauc i sur., 2014) odgovorno je za proizvodnju transportera i enzima koji sudjeluju u biosintezi glikanskih struktura, uglavnom tijekom kotranslacijskih i posttranslacijskih modifikacija proteina. Aktivnost enzima koji sudjeluju u biosintezi glikana, posebno glikozil-transferaza i glikozidaza, odražava se u velikoj bioraznolikosti glikanskih struktura. Ovi se enzimi natječu za supstrate, a njihova lokalizacija unutar stanice je organizirana, što doprinosi strukturnoj raznolikosti glikana (Varki A i sur., 2022). Velika strukturna raznolikost glikana proizlazi iz položaja glikozidne veze između šećera (može biti 1-2, 1-3, 1-4 ili 1-6 glikozidna veza), slijeda i sastava monosaharida unutar polisaharida (koji je manje raznolik od spektra aminokiselina, ali bogatiji od paleta nukleinskih kiselina kojih je četiri), anomerne konfiguracije C atoma na kojem je glikozidna veza (α ili β konfiguracija ovisno o položaju glikozidne veze u odnosu na cikličku

strukturu) te broja i položaja mjesta grananja (razgranatost uvelike doprinosi bioraznolikosti glikana).

Glavne su skupine glikokonjugata definirane prema prirodi veze s aglikonom (protein ili lipid).

- a) **Glikoproteini** su proteini koji imaju jedan ili više glikana kovalentno vezanih na svoju polipeptidnu okosnicu, obično preko O- ili N-veza. N-glikani nastaju N-glikozilacijom, dok O-glikani nastaju O-glikozilacijom. C- i S-vezani glikani su manje česti. Primjer O-glikana su mucini, veliki hidratizirani glikoproteini koji djeluju kao zaštitne fizičke barijere na epitelnim površinama.
- b) **Proteoglikani** su glikokonjugati koji sadrže protein kao aglikon, ali također imaju jedan ili više glikozaminoglikanskih lanaca (GAG) vezanih za proteinski nosač preko sržne regije glikana koja završava ksiloznim ostatkom povezanim s hidroksilnom grupom serinskog ostatka. GAG se formiraju ponavljajućim povezivanjem disaharidnih jedinica (heksozamina, heksoze ili heksuronske kiseline). Glikozaminoglikani imaju negativni naboj zbog prisutnosti sulfatnih i karboksilnih skupina, što im omogućuje zadržavanje velike količine vode i hidrataciju, čime se sprječava isušivanje tkiva.
- c) **Glikozil-fosfatidilinozitolna sidra** (GPI sidra) su glikanski mostovi koji povezuju C-kraj proteina s membranskim lipidima. Ova struktura je jedinstveno sidro koje veže proteine za lipidni dvosloj, odnosno staničnu membranu.

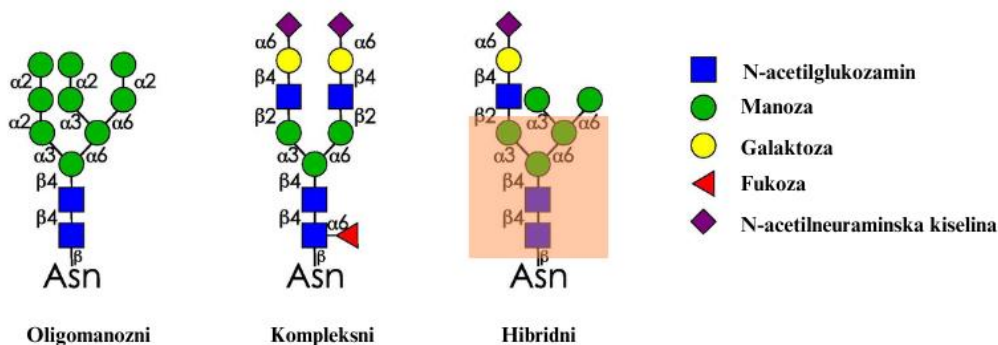
1.2. Glikozilacija proteina

Glikozilacija predstavlja najčešću i najkompleksniju modifikaciju proteina koja se javlja tijekom kotranslacije i posttranslacije (Lauc i sur., 2014). Važnost glikozilacije ogleda se u činjenici da je oko petina svih proteina glikozilirana (Khoury i sur., 2011). Osim proteina, glikozilacija može utjecati i na lipide i proteoglikane. Zanimljivo je da albumin, najzastupljeniji protein u ljudskoj plazmi (čini 50-60% ukupnih proteina plazme zdrave osobe), nije glikozilirana. Imunoglobulin G (IgG), koji je drugi po zastupljenosti protein u ljudskoj plazmi, također je glikozilirana, što ga čini najčešćim glikoproteinom u ljudskoj plazmi (Anderson i sur., 2002). Glavni enzimi koji sudjeluju u procesu glikozilacije su glikoziltransferaze, koje prenose monosaharide s jednog supstrata na drugi, te glikozidaze, koje hidroliziraju glikozidne veze i omogućuju odvajanje monosaharida (Reily i sur., 2019). Budući da glikozilacija ne prati specifičan uzorak kao translacija ili transkripcija, stanica se oslanja na veliki broj enzima, što znači da je glikozilacija ovisna o aktivnosti enzima.

Postoje različite vrste glikozilacije koje se razlikuju i imenuju prema atomu na polipeptidnoj okosnici proteina na koji se glikani vežu. Neki od primjera su N-glikozilacija, O-glikozilacija, C-glikozilacija i S-glikozilacija. O-glikozilirane proteine možemo pronaći i unutar i izvan stanice, dok ostale vrste glikozilacije utječu na proteine koji čine staničnu membranu i sekretorne proteine. Najčešća vrsta glikozilacije je N-glikozilacija (Khoury i sur., 2011).

1.2.1. N-glikozilacija

N-glikozilacija je proces koji uključuje formiranje N-glikozidne veze između GlcNAc monosaharida na glikanu i asparaginskog (Asn) ostatka glikoproteina na koji je vezan. Važno je napomenuti da se asparagin mora nalaziti unutar specifičnog peptidnog slijeda Asn-X-Ser/Thr, gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina. Svi N-glikani dijele istu pentasaharidnu srž koja se sastoji od dva N-acetilglukozamina i tri manoze (Higel i sur., 2016). Postoje tri glavna tipa N-glikana, a razlikuju se prema monosaharidima vezanima na već spomenutu pentasaharidnu srž. Oligomanozni tip sadrži dodatno vezane manoze i ne prolazi proces terminalne glikozilacije, kompleksni tip sadrži dvije ili više grana uz dodatak N-acetilglukozamina (GlcNAc), N-acetil galaktozamina (GalNAc), fukoze (Fuc) ili N-acetilneuraminske kiseline (Neu5Ac, sijalinske kiseline), a hibridni tip kombinira prethodna dva tipa.



Slika 1. – Tri osnovne vrste N-vezanih glikana: oligomanozni, složeni i hibridni, od kojih svaki sadrži sržnu strukturu $Man_3GlcNAc_2-Asn$ označenu narančastim pravokutnikom krajnje desno (Preuzeto i prilagođeno iz Higel i sur., 2016)

Konformacija proteina utječe na dostupnost šećera enzimima, što može rezultirati različitim oblicima glikana. Što je šećer više dostupan, veća je vjerojatnost da će enzim odstraniti većinu manoze, omogućujući time vezanje dodatnih šećera na sržnu strukturu i stvaranje složenijih oblika glikana. Međutim, ako je vezani glikan manje dostupan, veća je vjerojatnost da će ostati u oligomanoznom obliku.

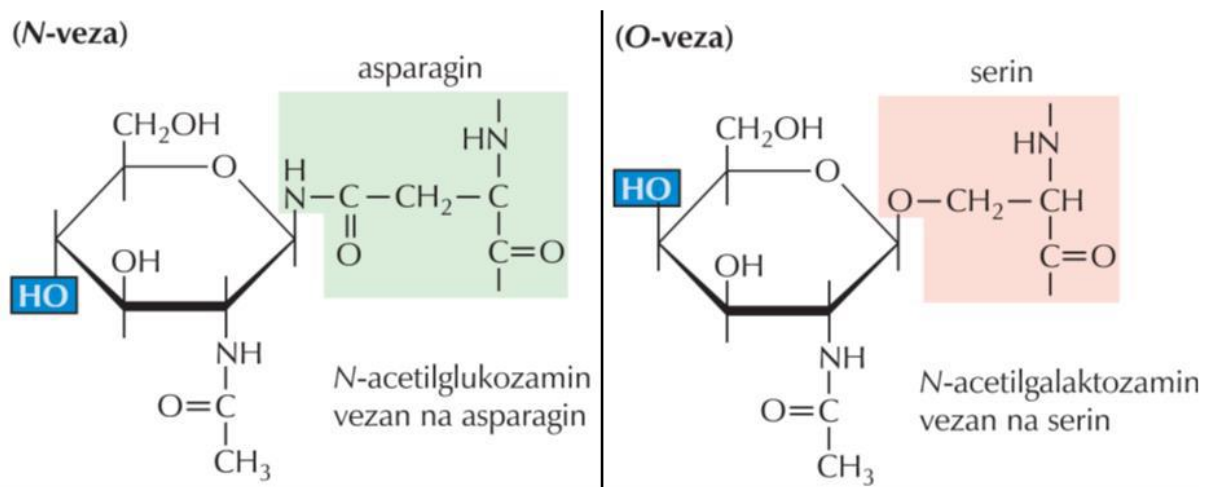
S obzirom na lokalizaciju sinteze N-glikana možemo ju podijeliti na dvije faze. Prva se faza odvija na citoplazmatskoj strani endoplazmatskog retikuluma. Ona započinje tako da se dva aktivirana UDP-GlcNAc ostatka preko pirofosfatne veze prikvače za dolikol koji je lipidni nosač i ugrađen je u membranu ER-a. Zatim se na GlcNAc, pomoću glikoziltransferaza, dodaju pet manoznih ostataka. U tom se trenutku lipidno-glikanski konjugat translocira pomoću enzima flipaze u unutrašnju stranu (luminalnu) ER-a. Mehanizam prijenosa glikolipida na luminalnu stranu ER-a je nepoznat (Sanyal i Menon, 2009). U luminalnoj strani ER-a započinje druga faza. Na pet manoznih ostataka pomoću glikoziltransferaza i aktiviranih nosača šećera dodaju se četiri manoze i tri glukoze. Time završava sinteza glikolipida koji sada sadrži 14 monosaharidnih jedinica i dvije točke grananja, odnosno tri grane (Aebi, 2013), a formula se krajnjeg produkta može zapisati kao $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Kao takvi, krajnji se produkt prenosi na dušik asparagina (Asn) unutar već spomenute sekvence u lumenu ER-a uz pomoć transmembranskog enzima oligosaharil transferaze (OST) i tako N-glikozilira. Dalje, kao takvi, N-glikozilirani proteini mogu ići u Golgijev aparat gdje se rade dodatne preinake na glikanskim formama što rezultira nastajanjem kompleksnih, oligomanoznih ili pak hibridnih formi N-glikana.

1.2.2. O-glikozilacija

Tijekom O-glikozilacije, glikan se obično veže na kisikov atom serina ili treonina u aminokiselinskom slijedu proteina putem α -glikozidne veze s N-acetilgalaktozaminom (GalNAc). Aminokiselinski slijed koji sadrži Ser/Thr često se nalazi u blizini prolinskih (Pro) ostataka. Rijetko se glikan može vezati na kisikov atom Ser/Thr proteina putem manoze, fukoze, galaktoze, glukoze ili ksiloze.

Najčešći je tip O-glikozilacije proteina sisavaca dodavanje terminalnog GalNAc, tzv. mucinski tip glikana. Daljnjim dodavanjem Gal, GlcNAc ili oboje, struktura O-glikana se proširuje, stvarajući osam uobičajenih struktura koje se često dalje proširuju dodavanjem tri sialinske kiseline. Enzimi koji sudjeluju u O-glikozilaciji su isti kao i kod N-glikozilacije, ali su njihovi supstrati različiti.

Lektini, specifični proteini koji visoko selektivno vežu određene glikanske sekvence, prepoznaju terminalne šećere O-glikana. Ove interakcije imaju ključnu ulogu u imunom sustavu i omogućuju ekstravazaciju leukocita tijekom upale.



Slika 2. – Prikaz N- i O- glikozidne veze (Preuzeto i prilagođeno iz Cooper GM i Hausman RE, 2010)

1.3. N-glikom

1.3.1. N-glikom krvne plazme

Glikom u širem smislu predstavlja cjelokupan repertoar glikanskih struktura unutar nekog organizma, stanice ili tkiva. Stoga, N-glikom ljudske krvne plazme podrazumijeva skup svih glikana koji se mogu pronaći u ljudskoj krvnoj plazmi. Ovisno o postojanosti različitih glikana i njihovih modifikacija na proteinima, govorimo o različitim glikoformama. Dakle, proteinska osnovica, kao takva, može ostati ista i nepromijenjena, međutim, ukoliko se na njoj nalaze vezani različito strukturno modificirani glikani, ti su proteini, odnosno u tom slučaju glikoproteini, različiti i mogu ispoljavati različita svojstva te pokretati različite, čak i u nekim slučajevima antagonističke učinke. Promjena je u glikozilaciji dokazana kod različitih akutnih i kroničnih upalnih bolesti (Higai i sur., 2005) i to na glavnim plazmatskim proteinima poput α 1-kiselog glikoproteina, IgG, IgA, transferina, haptoglobina, CRP i drugih.

U različitim malignim oboljenjima, uključujući karcinom dojke, hepatocelularni karcinom, karcinom jajnika i karcinom prostate, primijećena je promjena u N-glikozilaciji proteina plazme (Zhang i sur., 2016; Wang i sur., 2021). Kod karcinoma dojke primijećen je rast u sijalinizaciji, grananju i fukozilaciji vanjske grane glikana, kao i smanjenje oligomanoznih struktura i biantenarnih glikana sa sržnom fukozom (Saldova i sur., 2014). Kod hepatocelularnog karcinoma primijećena je povećana fukozilacija vanjske grane u triantenarnim i tetraantenarnim N-glikanima proteina plazme, a razina fukozilacije vanjske grane N-glikana i plazmatska koncentracija trombocita omogućuju razlikovanje pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom i pacijenata sa cirozom jetre (Mehta i sur., 2012).

Kod karcinoma jajnika primijećen je porast agalaktoziliranih glikana biantenarne strukture, povećana fukozilacija srži glikana, porast razine sijalil-Lewis x epitopa (sLex, Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4 (Fuc α 1,3) GlcNAc-R), povećano grananje glikana i sijalinizacija. Kod karcinoma prostate primijećeno je da je povećana razina biantenarnih glikana sa sržnom fukozom i α (2 \rightarrow 3) vezanih sijalinskih kiselina u odnosu na pacijente s benignom hiperplazijom prostate (Saldova i sur., 2011), što je važno za rano razlikovanje i dijagnosticiranje ovih oboljenja.

Zanimljivo je da promjene u profilu N-glikana mogu biti povezane ne samo s malignim oboljenjima, već i s drugim zdravstvenim stanjima, poput metaboličkih poremećaja kao što su povišeni krvni tlak, pretilost i pušenje. Pušenje je povezano s povećanom učestalošću grananja i galaktozilacije glikana (Knežević i sur., 2010). U pojedinaca s povećanim tjelesnim

masnoćama i povišenim krvnim tlakom primijećena je promjena u profilu N-glikana, koja se manifestira povećanom količinom agalaktoziliranih i smanjenom količinom digalaktoziliranih glikana, kao i povećanom sijalinizacijom biantenarnih struktura.

Kako je već spomenuto, glikani nisu direktni produkti genoma i u sintezi istih sudjeluje izrazito puno različitih enzima pa je jasno kako je proces neminovno osjetljiv na vrlo male promjene u fiziologiji stanica što se onda očituje na krajnjem produktu. Također, nije samo maligna promjena ili drugi poremećaj zanimljiv za praćenje promjene glikana već i uzroci tih poremećaja i promjena poput lijekova koji mogu djelovati nepovoljno na glikom. Oralni kontraceptivi, nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIL) (Park i sur., 2013) i oralni steroidi mogu izazvati promjene u glikozilaciji N-glikoma plazme (Saldova i sur., 2012), što može imati posljedice na funkciju proteina koji su glikozilirani. Primjena protuupalnih lijekova, poput acetilsalicilne kiseline, ostalih NSAIL-ova i oralnih steroida, može utjecati na smanjenje određenih glikanskih struktura u plazmi, uključujući biantenarne i triantenarne glikane sa sržnom fukozom i fukozom na vanjskoj grani, kao i oligomanozne strukture. Ovo smanjenje glikana ukazuje na protuupalni učinak tih lijekova. Hormoni i protuupalni lijekovi također mogu utjecati na glikozilaciju proteina u plazmi i modulirati upalni odgovor, što može dovesti do promjena u glikozilacijskim putevima. Biantenarni glikani sa sržnom fukozom najčešće potječu od IgG proteina, stoga promjene u njihovoj razini mogu ukazivati na modulaciju imunskog odgovora uzrokovanu primjenom hormona i protuupalnih lijekova. Ovi podaci naglašavaju važnost praćenja razine glikana u ljudskoj plazmi kao biomarkera, jer mogu ukazivati na učinak koji ovi lijekovi imaju na organizam.

Tablica 1. prikazuje najzastupljenije strukture glikana u N-glikomu ljudske plazme. Strukture su određene masenom spektrometrijom (MS) i egzoglikozidaznim digestijama. Svakom je kromatografskom piku pridružena odgovarajuća glikanska struktura.

Tablica 1.- Najzastupljenije glikanske strukture N-glikoma humane plazme. Svi glikani sastoje se od srži koju čine dva GlcNAc i tri manoze. F – fukoza $\alpha(1\rightarrow3/4)$ vezana za granu (GlcNAc) ili sržna fukoza $\alpha(1\rightarrow6)$ vezana na proksimalni GlcNAc, Mx – broj (x) manozavezanih na GlcNAc srži glikana, Ax- broj (x) grana (GlcNAc) na trimanozil jezgri, Gx – broj (x) $\beta(1\rightarrow4)$ vezanih galaktoza na granama, Sx – broj (x) $\alpha(2\rightarrow4/6)$ vezanih sijalinskih kiselina za galaktozu

Pik	Struktura	Pik	Struktura
GP1	FA2	GP21	A2BG2S2
GP2	FA2B	GP22	FA2G2S2
GP3	A2[6]BG1	GP23	FA2BG2S2
GP4	FA2[6]G1	GP24	A3G3S2
GP5	FA2[3]G1	GP25	A3BG3S2
GP6	FA2[6]BG1	GP26	A3G3S2
GP7	M6	GP27	A3G3S3
GP8	A2G2	GP28	A3G3S3
GP9	A2BG2	GP29	FA3G3S3
GP10	FA2G2	GP30	A3G3S3
GP11	FA2BG2	GP31	FA3G3S3
GP12	A2[3]BG1S1	GP32	A3F1G3S3
GP13	FA2[3]G1S1	GP33	A4G4S3
GP14	A2G2S1	GP34	A4G4S3
GP15	A2BG2S1	GP35	A4F1G3S3
GP16	FA2G2S1	GP36	A4G4S4
GP17	FA2BG2S1	GP37	A4G4S4
GP18	A2G2S2	GP38	A4G4S4
GP19	A3G3S1	GP39	A4F1G4S4
GP20	A2G2S2		

1.3.2. N-glikom imunoglobulina G (IgG)

Imunološki se sustav sastoji od dvije ključne vrste limfocita koje omogućuju selektivno prepoznavanje antigena: limfociti B i limfociti T. Limfociti B su odgovorni za proizvodnju imunoglobulina ili antitijela koja djeluju kao antigenski receptori kada se nalaze na površini stanica. Kada se izlučuju iz stanica, ta antitijela obavljaju važne efektorske funkcije (Cox i Sinclair, 2000).

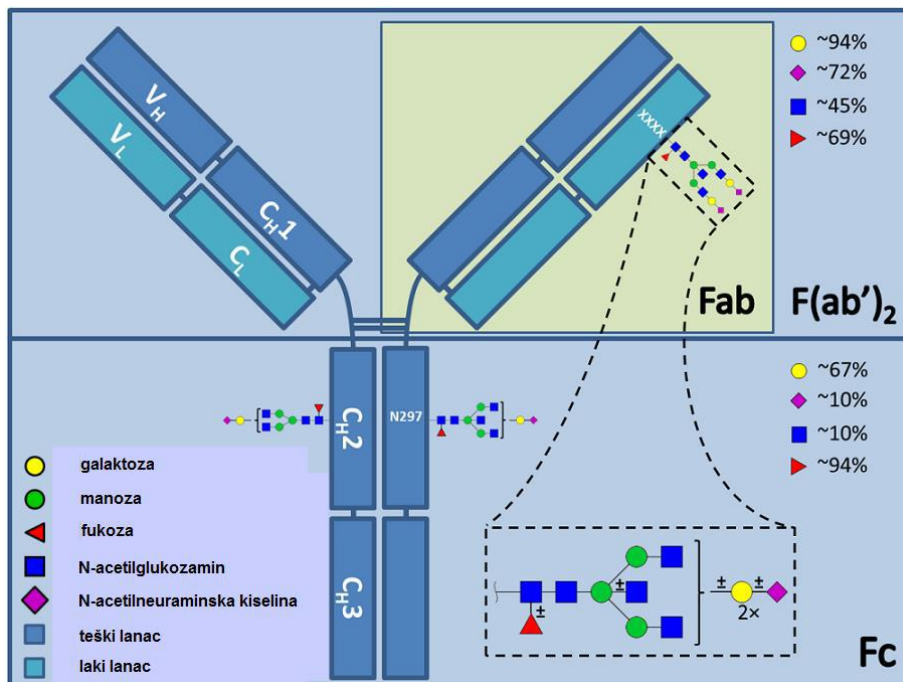
Limfociti T, s druge strane, prepoznaju antigene prezentirane na površini stanica putem molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC) i imaju različite podtipove koji izvršavaju različite funkcije. Limfociti T-helperi pomažu u aktivaciji i regulaciji imunološkog odgovora, dok limfociti citotoksični T ubijaju zaražene stanice i tumorske stanice. Ovi dvije vrste limfocita surađuju kako bi koordinirale i usmjeravale imunološki odgovor organizma (Abbas i sur., 2018).

Važno je istaknuti da imunoglobulini proizvedeni od strane limfocita B imaju ključnu ulogu u humoralnom imunološkom odgovoru, dok limfociti T igraju ključnu ulogu u staničnom imunološkom odgovoru. Ove dvije vrste limfocita međusobno komuniciraju i dopunjuju se kako bi omogućile efikasno prepoznavanje i eliminaciju patogenih organizama i abnormalnih stanica u tijelu.

Imunoglobulin G (IgG), uz ostale imunoglobuline (IgM, IgA, IgD i IgE) čini skupinu imunoglobulina glikoproteina humane plazme. Molekule se imunoglobulina dijele u posebne razrede i podrazrede, odnosno, izotipove na osnovi razlike u građi konstantne regije teškog lanca. Uz već spomenute razrede imunoglobulina, razlikujemo i izotipove IgG koji se dijele na IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 te izotipove IgA koji se dijele na IgA1 i IgA2. Različiti izotipovi i podrazredi imunoglobulina imaju različite izvršne uloge jer je većina izvršnih funkcija posredovana vezanjem konstantne regije teškog lanca za Fc-receptore na različitim stanicama poput fagocita, NK-stanica (eng. *natural-killer*) i mastocita, odnosno za plazmatske bjelančevine poput komponenti komplekta (Abbas i sur., 2018).

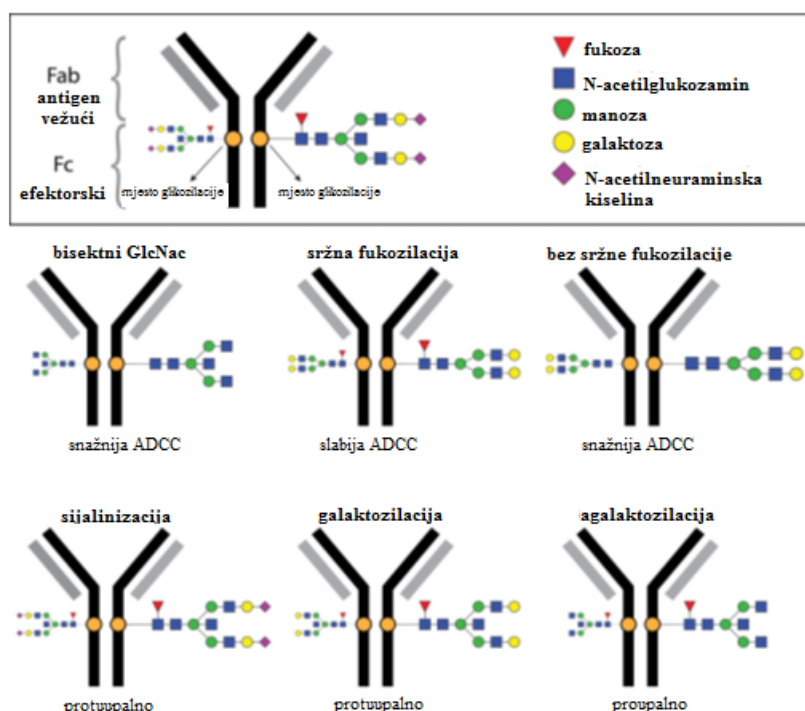
IgG je najzastupljeniji imunoglobulin u ljudskoj plazmi s prosječnom koncentracijom od 9 mg/ml (Justiz Vaillant AA i sur., 2021). Također, IgG je ujedno i najistraživaniji glikoprotein. Građen je od dva polipeptidna lanca od kojih je jedan veličine oko 50 kDa i nazvan teški (γ -lanac) lanac za koji je disulfidnim mostovima vezan laki (λ ili κ) lanac, prosječne veličine otprilike 25 kDa. Također, disulfidni mostovi povezuju i svaki teški lanac. Svaki se teški lanac sastoji od četiri regije; tri konstantne regije (C_{H1} , C_{H2} i C_{H3}) i jedne varijabilne regije (V_H).

Laki se lanci sastoje od dvije regije; jedne konstantne (C_L) i jedne varijabilne regije (V_L). U molekuli se IgG razlikuju dva fragmenta. 1959. godine Rodney Porter je dokazao da se IgG može razdvojiti na tri fragmenta od 50 kDa uz pomoć enzima papaina. Dva od tih fragmenata sadrže antigensko vezno područje te su nazvana Fab (F označava fragment; ab - eng. *antigen binding*). Treći fragment nazvan Fc ima sposobnost kristalizacije (eng. *crystallizable*) te ne posjeduje sposobnost vezanja antigena, ali ima druga važna biološka svojstva koja se nazivaju efektorske funkcije, poput pokretanja kaskade komplementa. Fragment Fc imunoglobulina ima važnu ulogu u pokretanju odgovarajućeg slijeda reakcija nakon prepoznavanja antigena. Za tu ulogu je ključna interakcija s Fcγ receptorom (FcγR) na efektorskoj stanici imunskog sustava. No, da bi ta interakcija bila moguća, potrebna je kotranslacijska modifikacija Fc-a N-glikanom. Efektorske funkcije imunoglobulina mogu biti vrlo različite i čak potpuno suprotne, kao što su upala i supresija imunog odgovora. Aminokiselinski slijed fragmenta Fc je nepromjenjiv, pa ne može biti izvor različitih efektorskih mogućnosti. No, tu ulogu preuzimaju N-glikani, koji su promjenjivi, te omogućuju različite odgovore na antigene. Stoga se N-glikani imunoglobulina smatraju ključnim za razumijevanje različitih efektorskih funkcija imunoglobulina.



Slika 3. – Shematski prikaz IgG-a i N-glikana. Označeni su Fab i Fc fragmenti. Prikazani su postotci galaktoziliranih, sijaliniziranih, fukoziliranih glikana te glikana s računajućim GlcNAc za svaki fragment. Izdvojeno je prikazana pentasaharidna srž N-glikana Fab fragmenta s mogućim dodacima (Preuzeto i prilagođeno iz Bondt i sur., 2014)

N-glikani su prisutni na visoko-konzerviranom asparaginskom ostatku 297 (Asn²⁹⁷) svake C_H2 domene antitijela. Oni se sastoje od pentasaharidne srži (Man₃GlcNAc₂Asn) koja se modificira drugim monosaharidima, poput galaktoze, sijalinske kiseline, račvajućeg N-acetilglukozamina i fukoze. Male promjene u strukturi ovih glikana mogu imati velik utjecaj na afinitet efektorskih liganda za Fc domenu, što uključuje stanične receptore FcγRI, FcγRII i FcγRIII, C1q komponentu komplementa i neonatalni Fc receptor. Ti ligandi mogu aktivirati upalni odgovor, uključujući citotoksičnost ovisnu o protutijelima (ADCC, eng. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ili citotoksičnost ovisnu o komplementu (CDC, eng. *complement-dependent cytotoxicity*) (Liu, 2015). Tako dodatak fukoze proksimalnom GlcNAc srži glikana (tzv. sržna fukoza) mijenja oblik Fc fragmenta i smanjuje njegovu sposobnost vezanja za FcγRIIIa (CD16) receptor, koji se najviše nalazi na NK-stanicama (eng. *Natural killer cells*). Kada se IgG veže na ovaj receptor preko Fc fragmenta, potiče se citotoksičnost ovisna o protutijelima (ADCC), koja destruiira ciljne stanice obložene protutijelima. Stoga, većina poliklonalnih IgG antitijela (oko 95%) sadrži sržnu fukožu kako bi se spriječila neželjena aktivnost ADCC (Gornik i sur., 2012). Nepravilna regulacija ovog procesa može dovesti do autoimunih bolesti (previsoka aktivnost ADCC) ili karcinoma (premala aktivnost ADCC). Također, druge strukturne modifikacije Fc fragmenta, poput sijalinizacije N-glikana, mogu utjecati na to hoće li IgG antitijela djelovati protuupalno ili proupalno. Kada se susretnu s patogenom ili antigenom, IgG antitijela mogu preći iz protuupalnog stanja s povećanom sijalinizacijom u proupalno stanje s manjom sijalinizacijom, potičući zaštitni upalni odgovor putem Fcγ receptora na efektorskim stanicama (Kaneko i sur., 2006). Osim toga, sijalinska kiselina na IgG utječe i na indukciju ekspresije inhibirajućeg receptora FcγRIIB receptora, eksprimiranog na B stanicama (Kaneko i sur., 2006). Pojačana ekspresija ovog jedinog inhibirajućeg Fc receptora dovodi do njegovog povezivanja s receptorom za B stanice (engl. *B cell receptor*, BCR) rezultirajući porastom praga za aktivaciju B stanica te posljedičnim smanjenjem proizvodnje protutijela što dovodi do supresije upalnog stanja (Smith i Clatworthy, 2010). Galaktozilacija glikana Fc fragmenta može posredovati protuupalna svojstva. Visoko galaktozilirani N-glikani IgG1 u imunokompleksima blokiraju proupalnu funkciju sustava komplementa i kao takvi mogu služiti kao povratna sprega koja kontrolira sustav komplementa i upalu uzrokovanu kemokinima u autoimunim bolestima i infekcijama prije nego što IgG prijeđe u proupalnu agalaktoziliranu glikoformu (Karsten i sur., 2012).



Slika 4. – Korelacija između različite glikozilacije IgG i svojstva koja ovisno o njoj ispoljava (Preuzeto i prilagođeno iz Lauc i sur., 2016)

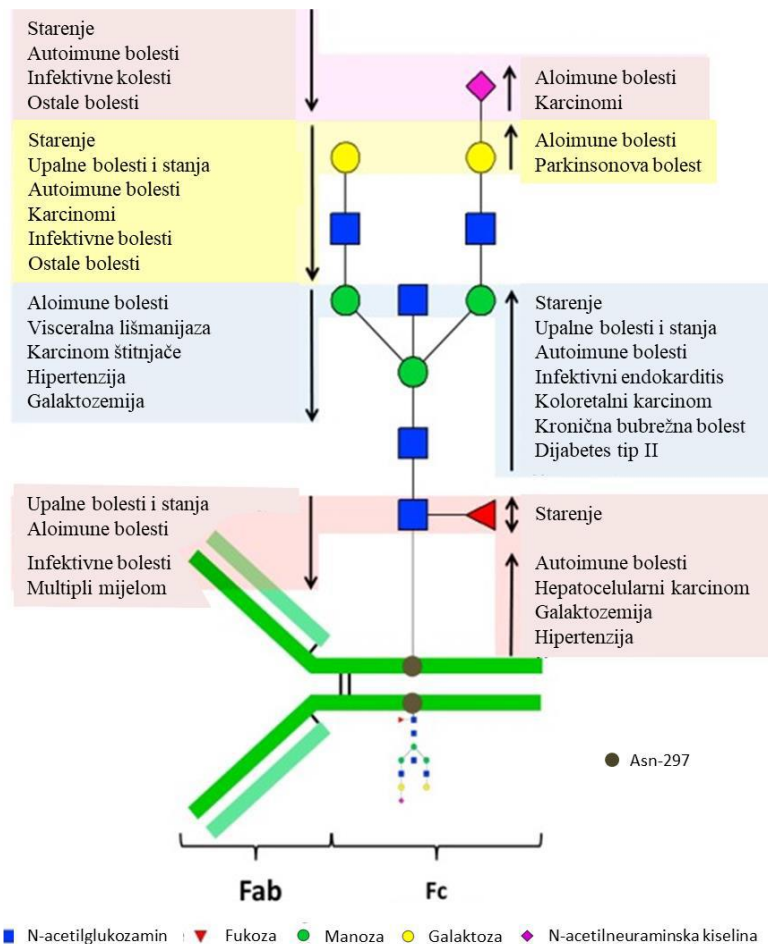
Pokazano je da otprilike 15-20% poliklonalnih humanih IgG antitijela sadrži glikane vezane za N-terminus Fab regije (Jefferis, 2005). Međutim, o tim glikanima se zna vrlo malo. N-glikani u Fab regiji su biantenarne strukture koje se nalaze na varijabilnim regijama antitijela i jasno je da utječu na afinitet IgG antitijela prema antigenima. Ovi glikani su više galaktozilirani, više sijalinizirani i sadrže veći udio račvajućih GlcNAc ostataka u usporedbi s N-glikanima Fc domene (Anumula, 2012).

Kako bi se olakšalo tumačenje rezultata i karakterizacija glikanskih promjena u različitim fiziološkim stanjima i bolestima, glikanske strukture se mogu grupirati prema njihovim zajedničkim strukturnim karakteristikama. Na primjer, sve glikane proteina plazme koji sadrže fukoza vezanu na srž ili jezgru, nazivaju se sržno fukozilirani. Glikani koji imaju dvije sijalinske kiseline nazivaju se disijalinizirani, i tako dalje. Ove zajedničke strukturne karakteristike glikanskih struktura nazivaju se derivirana svojstva.

Bitno je napomenuti da ovaj popis najčešće opisivanih deriviranih svojstava glikanskih struktura na glikoproteinima nije "zlatni standard", već prikuplja najčešće opisivana derivirana svojstva.

Najzastupljenije glikanske strukture detektirane u većini glikoproteina plazme uključuju biantenaran, digalaktozilirani i disijalinizirani glikan (glikan s dvije grane, na svakoj po jedna galaktoza i jedna sijalinska kiselina) te biantenaran, digalaktozilirani i monosijalinizirani glikan (glikan s dvije grane, na svakoj po jedna galaktoza, ali samo na jednoj od njih vezana jedna sijalinska kiselina) (Clerc i sur., 2016). Jednostavnije strukture s maksimalno dvije grane, većinom bez sijalinske kiseline, ali sa sržnom fukozom, potječu s imunoglobulina G (Clerc i sur., 2016). Kompleksnije, visoko razgranate strukture s tri ili četiri grane, manje su zastupljene od biantenarnih struktura i uglavnom dolaze s proteina akutne faze.

Sve navedeno ukazuje kako glikozilacija IgG-a igra ključnu ulogu i limitirajući je faktor u razvoju funkcionalnih terapijskih monoklonskih protutijela. Neminovno je kako je potreba za razvojem homogeno glikoziliranih protutijela velika, čime bi se, svakako, poboljšala njihova efikasnost i sigurnost (Lin i sur., 2015).



Slika 5. – Promjene u glikozilaciji IgG na Fc regiji u starenju i bolesti. Navedene se promjene odnose na odrasle ljudske jedinice. Strelica prema dole simbolizira smanjenje udjela, dok strelica prema gore pokazuje povećanje udjela određene N-glikanske strukture IgG (Preuzeto i prilagođeno iz Gudelj i sur, 2018)

1.4. Metode analize N-glikana

Analiza N-glikana predstavlja izazovan zadatak zbog varijabilnosti monosaharida, njihovog poretka i brojnosti u glikanskim strukturama. Glikozidne veze koje povezuju monosaharidne jedinice mogu imati različite orijentacije, a glikanska struktura se može vezati na različita mjesta na glikoproteinu. Radi povećanog interesa za istraživanje biološke i kliničke važnosti N-glikana, provode se opsežne kliničke i populacijske studije. U analizi strukture i profila glikana koriste se različite kemijske, enzimске i analitičke tehnike. Odabir metode ovisi o količini i čistoći uzorka, kao i njegovom izvoru. Budući da ne postoji univerzalna analitička metoda za analizu N-glikana i njihovih karakteristika, primjenjuju se različite analitičke metode za njihovo istraživanje (Varki A i sur., 2022).

Intenzivno se radi na poboljšanju već postojećih visokoprotočnih (eng. *high throughput*) analitičkih tehnika koje su iznimno korisne u analizi i karakterizaciji glikana i glikanskih konjugata. Profiliranje glikana je određivanje relativne količine strukturno različitih glikana prisutnih u glikokonjugatu, a ono uključuje nekoliko koraka. Prvenstveno se glikokonjugat (najčešće glikoprotein) od interesa izolira, zatim se pristupa deglikozilaciji i fluorescentnom obilježavanju kako bi ih kasnije mogli karakterizirati. Nakon toga slijedi pročišćavanje i ukocentriranje te analiza MS, kapilarnom elektroforezom (eng. *capillary electrophoresis*, CE) s fluorescencijskim detektorom ili tekućinskom kromatografijom visoke ili vrlo visoke djelotvornosti (eng. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) s fluorescencijskim detektorom. Također su od koristi spregnute tehnike, kada se, nakon odvajanja kromatografskim tehnikama, frakcije uzoraka, podvrgnu analizi na MS ili nuklearnoj magnetskoj rezonanci (eng. *nuclear magnetic resonance*, NMR). MS i NMR su tehnike kojima se može odrediti struktura glikana i koje služe za finalnu potvrdu njihove strukture.

Analiza specifičnih proteina uključuje nekoliko koraka, a započinje izolacijom proteina od interesa (kao što je IgG) iz krvne plazme, nakon čega slijedi analiza pripadajućih N-glikana. Za ovaj postupak često se koristi monolit s proteinom G. Monoliti su nova vrsta stacionarnih faza koja se sastoji od mreže dobro povezanih velikih pora i kanala, što ih čini pogodnim za odvajanje velikih biomolekula poput IgG, za razliku od tradicionalnih čestica koje se koriste u kromatografiji. Kanali i pore u monolitima pružaju veliku površinu za adsorpciju velikih biomolekula, što je ranije bilo teško postići s konvencionalnim kromatografskim materijalom. Polimetakrilatni monoliti su nova generacija stacionarnih faza koja ima dodatna svojstva poput pH rezistencije, mehaničke otpornosti, jednostavnosti sinteze i mogućnosti kreiranja pora. Ovi

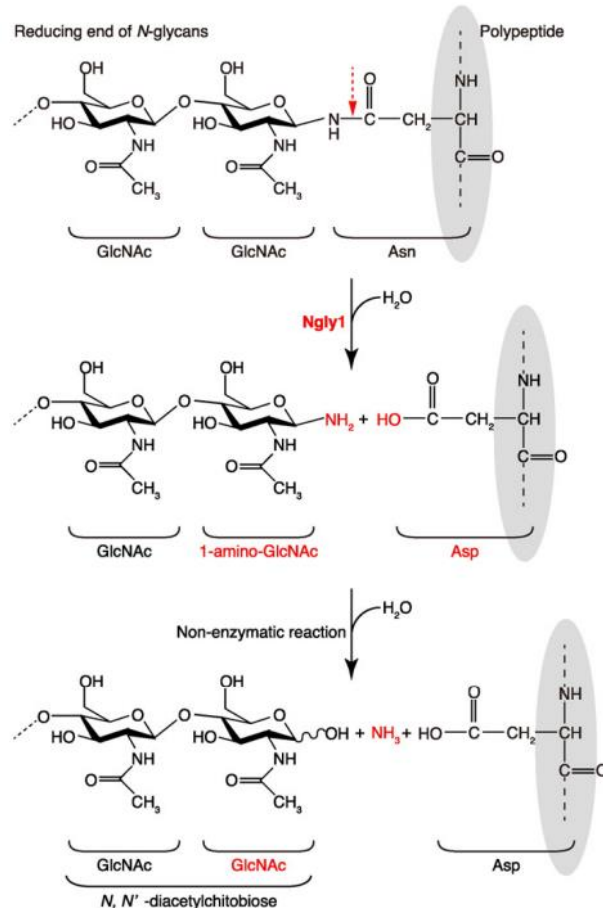
monoliti sadrže reaktivne epoksi grupe koje se mogu lako vezati za bioafinitetne ligande kao što je rekombinantni streptokokni protein G (Pučić i sur., 2012). Protein G se sastoji od proteina stanične stijenke bakterije *Streptococcus* grupe G te se koristi za izolaciju IgG-a putem afinitetnog vezanja Fc regije IgG-a na rekombinantni protein G, definirane veličine pora (0,2 µm) i kanala stacionarne faze monolita. Ova metoda se pokazala učinkovitom i robusnom za odjeljivanje IgG-a iz kompleksnih uzoraka poput krvne plazme ili seruma (Björck i Kronvall, 1984). Rekombinantni streptokokni protein G, koji se koristi kao bioafinitetni ligand, osigurava visoku specifičnost i vezivanje za IgG molekule. Kroz postupak analize, IgG molekule se vežu na monolit, dok se ostali neželjeni proteini i komponente uzorka uklanjaju ispiranjem. Nakon toga, N-glikani povezani s IgG molekulama mogu biti analizirani za karakterizaciju njihove strukture i funkcije.

Ova tehnika ima nekoliko prednosti. Prvo, omogućuje brzo i učinkovito odvajanje IgG molekula iz kompleksnih uzoraka. Drugo, monoliti s proteinom G pružaju visoku specifičnost i selektivnost za IgG molekule, čime se smanjuje prisutnost ostalih interferirajućih proteina. Treće, monoliti omogućuju analizu N-glikana vezanih za IgG molekule, što je važno za razumijevanje njihove uloge u imunološkom odgovoru i bolestima.

Nakon izolacije uzoraka koji sadrži glikoproteine, bez obzira radi li se o izoliranim glikoproteinima ili kompleksnim uzorcima plazme, odnosno, seruma, sljedeći važan korak u pripremi uzorka za analizu je denaturacija glikoproteina. Ovaj korak omogućava razdvajanje proteina od glikanskog dijela i omogućava daljnje analize strukture i funkcije glikoproteina. Zbog tercijarne i kvartarne strukture proteina, pojedini glikani mogu biti nedostupni djelovanju enzima koji oslobađa glikane pa se pristupa denaturaciji pomoću detergenta natrijevog dodecil sulfata, (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS). Veća koncentracija SDS se koristi za kompleksnije uzorke plazme ili seruma jer sadrže veću količinu proteina (Gudiksen i sur., 2006).

Nakon denaturacije IgG iz uzoraka plazme potrebno je osloboditi glikane iz glikoproteina, odnosno, provesti deglikozilaciju, koja se može provesti enzimski ili, rjeđe, kemijski. Hidrazin se koristi za kemijsko oslobađanje glikana, ali to može dovesti do oslobađanja i O-glikana uz N-glikane. Ovaj proces je vrlo agresivan i može dovesti do deacetilacije šećera koji su tako modificirani (Huhn i sur., 2009). Ona se provodi pomoću enzima PNGase F [peptid-N-(N-acetil-β-glukozaminil) asparagin amidaza F]. PNGase F je rekombinantna endoglikozidaza, amidaza, koja svojim specifičnim djelovanjem katalizira hidrolizu amidne veze između prvog GlcNAc na glikanu i bočnog lanca asparagina. Ovaj enzim

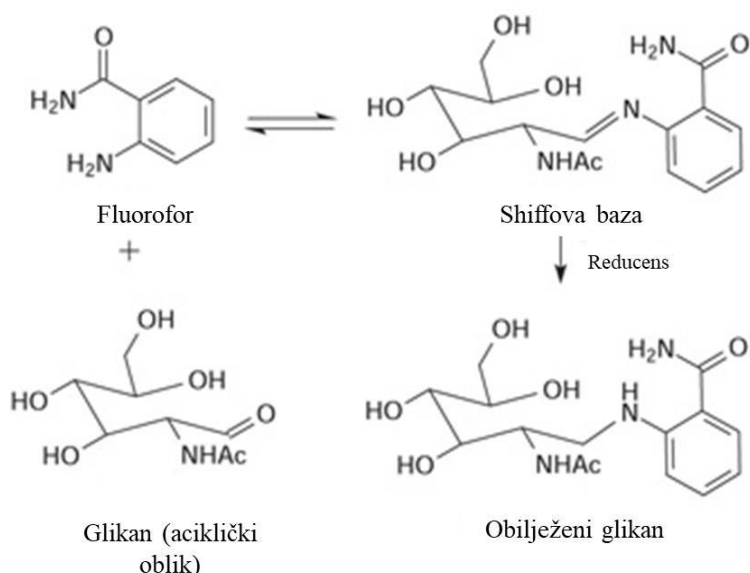
hidrolizira sve klase N-glikana (izuzev onih čija srž sadrži $\alpha(1\rightarrow3)$ fukožu, što se uglavnom odnosi na biljke (Wilson i sur., 2001)) vezanih za asparagin u polipeptidnoj okosnici. Osim PNGaze F, za deglikozilaciju se koriste i drugi enzime. PNGaza A je enzim koji također može pokidati amidnu vezu između GlcNAc i protein, čak i ako je fukoza vezana na prvom GlcNAc (Wang i sur., 2014). Međutim, neučinkovita je ako je prisutna sijalinska kiselina u strukturi glikana. Endoglikozidaze H ili F su enzimi koji se također koriste za deglikozilaciju, međutim, rjeđe, jer ostavljaju jedan GlcNAc vezan za asparaginski ostatak.



Slika 6. – PNGaza F kida amidnu vezu između prvog GlcNAc na glikanu i asparaginskog ostatka na proteinskoj okosnici. Produkti su nepromijenjeni glikan i deaminirani asparaginski ostatak, odnosno, asparaginska kiselina (Preuzeto i prilagođeno iz https://www.creative-enzymes.com/similar/pngase-f_583.html)

Zbog ne posjedovanja kromofornih skupina detekcija je glikana otežana u usporedbi s proteinima koji imaju kromofore i mogu apsorbirati UV svjetlost. Međutim, nakon što se glikani odvoje od glikoproteina procesom deglikozilacije, mogu se konjugirati s fluorescentnim bojama kao što su 2-aminobenzamid (2-AB), 2-antranilna kiselina (2-AA), prokainamid (PCA)

koji daje izuzetno visoke signale za vrlo male koncentracije glikana, 2-aminopiridin (PA), 2-aminonaftalen trisulfonska kiselina (ANTS) te 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina (APTS) (Ruhaak i sur., 2010). Konjugacija glikana i 2-AB odvija se preko formiranja Schiffove baze, koja se stabilizira redukcijom s 2-pikolin boranom (2-PB) u procesu nazvanom reduktivna aminacija. Nakon što su glikani obilježeni fluorescentnom bojom, mogu se detektirati nakon separacije (npr. HPLC, UHPLC itd.) pomoću fluorescentnog detektora. Važno je napomenuti da reducirajući kraj glikana postoji u cikličkoj i acikličkoj formi te da se reakcija karbonilne skupine acikličkog reducirajućeg kraja N-glikana i amino skupine 2-AB odvija putem Schiffove baze. Kada se koriste optimizirani reakcijski uvjeti, obilježavanje s 2-AB je vrlo učinkovito i gotovo neovisno o količini i strukturi glikana. Tijekom procesa, desijalinizacija je zanemariva (Bigge i sur., 1995). Glikani se analiziraju xCGE-LIF metodom za koju su potrebni nabijeni fluorofori kako bi se mogli kretati u električnom polju, međutim, većina glikana nije nabijena pri fiziološkom pH. U tu se svrhu najčešće koriste sulfonirani poliaromatski spojevi poput 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonske kiseline (eng. *8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid*, APTS). APTS ima izražena svojstva fluorescencije (pa ga se može koristiti puno manje) i ima tri negativna naboja u širokom pH rasponu. Reakcija je derivatizacije glikana i APTS reduktivna aminacija u prisutnosti kiseline kao katalizatora. Također, iskorištenje je veće uz jače kiseline poput limunske (Szabo i sur., 2010). Također, iskorištenje se reakcije može povećati dodatkom reduktivnog reagensa u suvišku i molekula za derivatizaciju pa se APTS obilježeni glikani, prije analize, čiste od suviška kemikalija (Ruhaak i sur., 2010).



Slika 7. – Reakcijom fluorofora (2-AB) i acikličkog oblika glikana nastaje nestabilna Shiffova baza ili imin koji se u sljedećem koraku primjenom reducensa reducira u stabilan obilježeni glikan (Prilagođeno i preuzeto iz <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en>)

Za pročišćavanje se glikana koristi metoda kromatografije hidofilnih interakcija-ekstrakcije na čvrstu fazu (engl. *hydrophilic interaction chromatography – solid phase extraction*, HILIC-SPE). U ovome je radu za čvrstu fazu korišten Bio-Gel P-10. To je hidrofilna stacionarna faza poliakrilamidnih zrnaca u smjesi otapala (voda:etanol:acetonitril=70:20:10). Princip se razdvajanja temelji na hidofilnim interakcijama stacionarne faze i glikana (glikani su sada hidrofilni jer su obilježeni APTS-om) iz uzorka pa se oni zadržavaju u gelu, dok se hidrofobne molekule i soli ispiru pogodnim otapalom. 100 mM otopina trietanolamina (eng. *triethanolamine*, TEA) u 80% acetonitrilu (eng. *acetonitrile*, ACN) (pH=8,5) se pokazala vrlo učinkovitom. Pri pH=8,5 TEA je pozitivno nabijena. Ionske interakcije s negativno nabijenim APTS stvaraju ionski par koji se ispire. Nadalje, 80% otopinom ACN ispiru se soli prije elucije glikana vodom sa čvrste faze (Ruhaak i sur., 2010). HILIC-SPE metoda pruža poboljšano odjeljivanje i kvantifikaciju fluorescentno obilježenih glikana te omogućuje razdvajanje strukturnih izomera. Vrijeme zadržavanja glikana ovisi o njegovom hidofilnom potencijalu, a na koji utječu veličina, naboj i struktura glikana, te veze i grananja unutar glikana.

Analiza se glikana provodi separacijskim tehnikama i to najčešće UHPLC ili xCGE-LIF. HILIC-UHPLC je varijacija kromatografije normalnih faza gdje je stacionarna faza polarna i tehnika se često koristi za analizu vrlo polarnih molekula. UHPLC u odnosu na HPLC pruža povećanu rezoluciju i osjetljivost zbog stacionarne faze čiji je promjer čestica 1,7 μm , a koja može funkcionirati pod većim tlakom i povećanom brzinom protoka, bez pada rezolucije i učinkovitosti kolone. Time se smanjuje vrijeme analize i potrošnja otapala koja čine mobilnu fazu. Kao što je već spomenuto HILIC-UHPLC je separacijska tehnika i kao takva za separaciju glikana najčešće koristi gradijentnu eluciju smjesom vode i organskog otapala s postupnim povećanjem udjela vode u smjesi kako bi se eluirali hidrofilni glikani (Zauner i sur., 2010). Vrijeme zadržavanja glikana na koloni ovisi o njihovoj veličini, razgranatosti, polarnosti, prisutnosti nabijenih skupina (sijalinske kiseline, glukuronske kiseline, sulfatne i fosfatne skupine). Kao vanjski se standard, koji služi za kalibraciju sustava, koristi hidrolizat dekstrana, odnosno, oligomeri glukoze obilježeni s 2-AB. Vrijeme se zadržavanja svakakog oligomera prevodi u glukozne jedinice koje se koriste kao referentne standardne vrijednosti, a dobiveni podaci postaju usporedivi (Guile i sur., 1996). U eksperimentalnim su uvjetima fluktuacije u retencijskim vremenima glikana naprosto neizbježne pa se u tu svrhu koristi kalibracija sustava već spomenutim vanjskim standardom.

Druga spomenuta separacijska tehnika je kapilarna gel elektroforeza (eng. *capillary gel electrophoresis*, CGE) s LIF (eng. *laser induced fluorescence*) detektorom. Kod CGE glikani

putuju, pošto su nabijeni, u električnom polju pri primjeni visokih potencijala (10-30 kV) u uskoj kapilari ispunjenoj gelom. Najčešće se koristi poliakrilamidni gel koji djeluje kao molekularno sito što onda omogućava odjeljivanje glikana po obliku i veličini u odjeljene zone. Molekule koje prve dolaze do detektora su one koje prve prolaze kroz poliakrilamidni gel, a to su male molekule s puno negativnog naboja. Zatim one s manje negativnog naboja i veće čestice te tako redom. Kako one prolaze laser na fluoroforima pobuđuje fluorescenciju te ih detektor može detektirati i dobivamo elektroferogram. Fluorescencija ovisi o koncentraciji glikana i proporcionalna je snazi pobudnog zračenja lasera (Hanić i sur., 2019). U uzorcima se s malom količinom fluorescentno obilježenih glikana optimira snaga pobudnog zračenja da bi količina fluorescencije bila dostatna za detekciju. Fluorescencijski su detektori i do 10 000 puta osjetljiviji od apsorpcijskih metoda. Također, multipleksna CGE omogućava paralelnu analizu i do 96 uzoraka.

1.5. Automatizacija analize glikana IgG-a

Velike studije povezane s genomom mogu pružiti vrijedne uvide u važnost glikozilacije, njenu regulaciju i ulogu u različitim stanjima (Trbojević-Akmačić i sur., 2017). Međutim, takve studije zahtijevaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom roku, što zahtijeva razvoj visokoprotočnih metoda (Trbojević-Akmačić i sur., 2017). Automatizirane metode bi pojednostavile analizu glikozilacije u područjima kao što su epidemiologija i klinička dijagnostika te omogućile brzo otkrivanje glikanskih biomarkera visoke točnosti (Hendel i sur., 2021). Pandemija COVID-19 naglasila je potrebu za većom automatizacijom i protočnošću u laboratorijima. Automatizacija pomaže u eliminiranju ljudskih pogrešaka, što rezultira pouzdanijim rezultatima (Anderson i sur., 2022). Prema studiji Groth i Cox iz 2017., većina objavljenih članaka iz životnih znanosti ima ručne protokole koji imaju automatizirane alternative (Groth i Cox, 2017). Ova statistika ukazuje na potrebu za većom automatizacijom u istraživanjima životnih znanosti. Automatizacija u laboratorijima ima prednosti kao što je isključivanje ljudskog faktora (Szecsi i Ødum, 2009), smanjenje pogrešaka i mogućnost lakšeg dijeljenja protokola među laboratorijima. Automatizirani sustavi omogućuju složenije pipetiranje i kontrolu tekućina, što nije moguće ručnim metodama. Također, laboratorijska automatizacija može smanjiti troškove istraživanja jer su potrošni materijali često jeftiniji u takvim sustavima (Hendel i sur., 2021). Automatizacija omogućuje brže izvršavanje eksperimenata i analiza, što ubrzava istraživački proces i omogućuje znanstvenicima da generiraju veći broj podataka u kraćem vremenskom razdoblju. Ovo je posebno važno u područjima kao što su genomika, proteomika i metabolomika, gdje se velike količine podataka moraju obraditi i analizirati. Dodatno, laboratorijska automatizacija pruža mogućnost reproduktivnosti i standardizacije rezultata. Automatizirani sustavi omogućuju precizno doziranje reagensa, kontrolirane uvjete i smanjenje varijabilnosti među uzorcima. To osigurava dosljedne rezultate i olakšava usporedbu rezultata iz različitih istraživačkih studija. Ukratko, laboratorijska automatizacija nudi brojne prednosti, uključujući pouzdanije rezultate, veću učinkovitost i smanjenje troškova, što je atraktivno za primjenu u životnim znanostima.

Iako laboratorijska automatizacija nudi mnoge prednosti, ona također predstavlja neke izazove, posebno u glikomici. Jedna od glavnih prepreka je složenost korištenih metoda, što otežava postizanje potpune automatizacije zbog teškoća u prenošenju svih potrebnih uređaja i tehnika koje koriste laboratorijski analitičari. Pipetiranje, iako vrlo precizno, ima nedostatke poput borbe s "mrtvim volumenima", što može povećati troškove potrebnih potrošnih materijala za analizu. Stabilnost i isparavanje uzoraka također mogu predstavljati probleme, budući da

uzorci često zahtijevaju pokrivanje i održavanje ispravne temperature, što može biti izazovno automatizirati. Iako su dostupni novi instrumenti koji omogućuju manevriranje poklopcem i kontrolu temperature, oni ipak mogu duže trajati u usporedbi s ručnim metodama.

Također, izazov je i potreba za operatorima koji su stručni u programskom jeziku ili softveru koji se koristi za upravljanje strojevima, posebno s robotima. Konačno, visoki troškovi tih sustava mogu otežati mnogim istraživačkim timovima nabavu takvih uređaja.

Automatske radne stanice za tekućine s višenamjenskim rukama dizajnirane su za automatsko uzorkovanje, miješanje i manipuliranje tekućim uzorcima. Dvije glavne vrste automatskih radnih stanica za tekućine koje se koriste u laboratorijima za glikomiku spadaju u jednu od dviju robotskih konfiguracija: kartezijsku konfiguraciju i antropomorfnu ili artikuliranu konfiguraciju (Hendel i sur., 2021).

Robotski stroj s kartezijskim sustavom je tip industrijskog robota koji koristi trodimenzionalni kartezijski koordinatni sustav (X, Y, Z) za upravljanje svojim pokretima. U kartezijskom robotu, svaki zglobov kontrolira motor koji ga kreće duž jedne od tri osi. To omogućava robotu da se kreće u ravnim linijama duž svake osi, te se kombiniranjem tih pokreta kreće u bilo kojem smjeru unutar svog radnog prostora. Kartezijski su roboti popularni u proizvodnji i montažnim aplikacijama jer su precizni, ponovljivi i lako se programiraju. Često se koriste za zadatke koji zahtijevaju visoku točnost, poput uzimanja i postavljanja malih dijelova, ili za operacije koje zahtijevaju konzistentnu razinu sile, poput apliciranja tlaka. Sveukupno, kartezijski roboti su važan alat u modernoj industrijskoj automatizaciji, a njihova upotreba pomogla je povećati učinkovitost i produktivnost u širokom rasponu industrija, a pogotovo u bioznanosti.

Automatizirani sustavi obećavaju povećanje protočnosti, pojednostavljivanje dugotrajnih koraka pripreme uzoraka, smanjenje učestalosti ljudskih pogrešaka i osiguravanje bolje ponovljivosti. Postoji širok raspon proizvođača platformi za laboratorijsku automatizaciju (više od deset konkurentskih platformi), a odabir pravog alata za posao predstavlja zastrašujući zadatak. Međutim, neki su sustavi u literaturi bili popularniji od drugih. Bilo je pokušaja razvoja metoda za analizu glikana antitijelima pomoću Biomek FX proizvedenog od strane Beckman Coultera (Szigeti i sur., 2016), korištenjem MICROLAB STARlet razvijen od strane Hamiltona (O'Flaherty i sur., 2019; Shubhakar i sur., 2018; Stöckmann i sur., 2013), Andrew Alliance poluautomatske platforme (Reed i sur., 2018) i SweetBlot 7 automatskog sustava od tvrtke System Instruments Co. (Gebrehiwot i sur., 2019). Upotreba automatizacije u glikomici još je

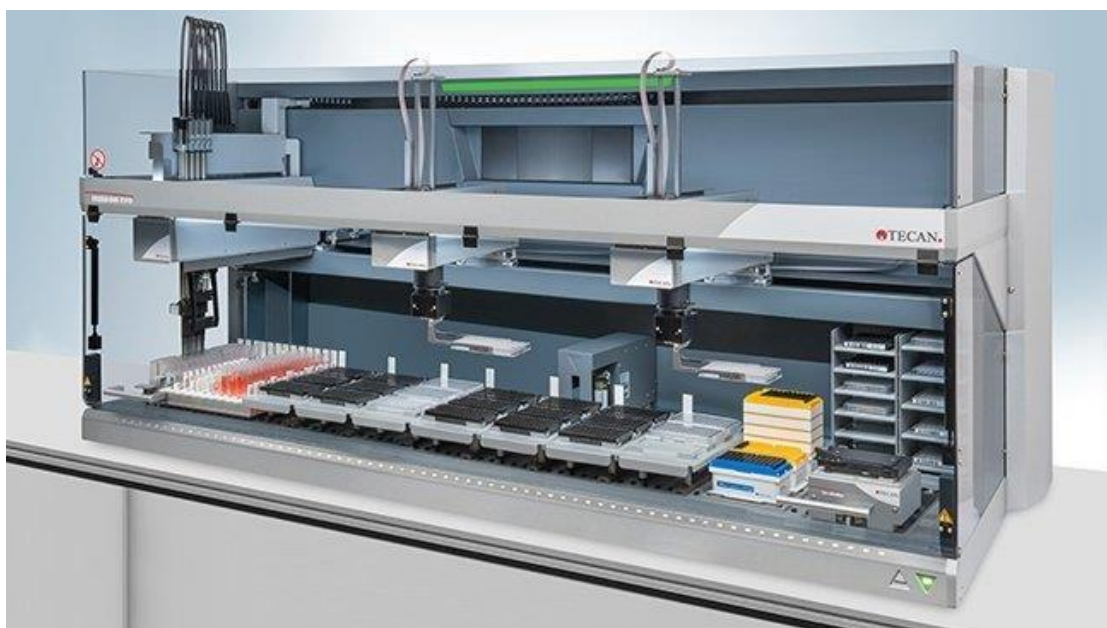
uvijek relativno mlado područje. Trenutno se većina automatiziranog rada provodi pomoću Hamiltonovog sustava od strane odabranog skupa istraživača koji aktivno rade na tom pitanju.

Za potrebe ovog istraživanja koristili smo takav kartezijanski sustav koji je razvila tvrtka Tecan u kombinaciji s njihovom automatskom jedinicom za pozitivni tlak Resolvex® A200 kao našu platformu izbora. Tecan Resolvex® A200 je automatizirani sustav za pripremu uzoraka dizajniran za obradu velikih količina tekućina. Sustav nudi pouzdano i precizno rukovanje tekućinama, čineći ga neophodnim alatom u područjima otkrića lijekova, kliničkog istraživanja i genomike. Tecan Resolvex A200 nudi niz značajki koje uključuju modularni dizajn koji se može prilagoditi različitim aplikacijama, kompaktnu veličinu koja štedi vrijedni laboratorijski prostor te sposobnost rukovanja širokim rasponom vrsta i količina tekućih uzoraka. Mogućnosti rukovanja tekućim sustavima pokreće patentirana Air Displacement Pipetting (ADP) tehnologija tvrtke Tecan, koja nudi superiornu preciznost i točnost u odnosu na tradicionalne metode rukovanja tekućinama. ADP tehnologija omogućuje precizno doziranje uzoraka u širokom rasponu volumena, od mikrolitra do mililitara. Resolvex A200 nudi i fleksibilne opcije softvera koje omogućuju prilagodbu protokola pripreme uzoraka svojim specifičnim potrebama. Softver sustava lako se programira za izvođenje različitih zadataka, poput razrjeđivanja uzoraka, dodavanja reagensa i ekstrakcije čvrste faze. Još jedna ključna značajka Tecan Resolvex A200 je njegova sposobnost automatiziranja protoka pripreme uzoraka. Sustav može rukovati s više uzoraka istovremeno, omogućujući visoko propusno procesiranje velikih skupova uzoraka. Ova automatizacija ne samo da štedi vrijeme i trud laboratorijskog osoblja, već smanjuje i rizik ljudske pogreške i varijabilnosti u pripremi uzoraka. Osim mogućnosti rukovanja tekućinama, Tecan Resolvex A200 nudi i niz dodatka koji mogu poboljšati njegovu funkcionalnost. To uključuje čitač barkoda za praćenje uzoraka, modul za miješanje i homogenizaciju i modul za hlađenje osjetljivih uzoraka.



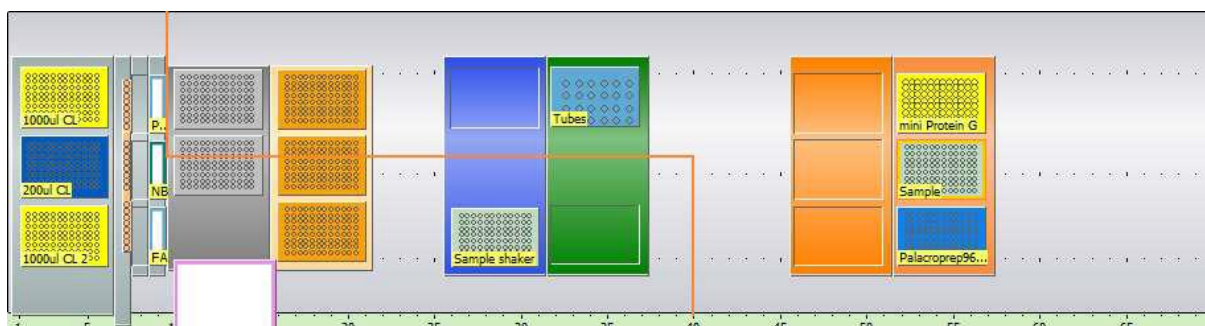
Slika 8. – Tecan Resolvex® A200-automatizirana jedinica za pozitivni tlak
(Preuzeto iz <https://protifi.com/pages/tecan-a200>)

Također, korišten je i Tecan FreedomEvo automatizirani sustav za tekućinsku manipulaciju i robotiku koji se široko koristi u područjima životnih znanosti i dijagnostike. Nudi niz značajki koje ga čine neophodnim alatom u laboratorijima i istraživačkim ustanovama, uključujući visoku propusnost, preciznost i fleksibilnost. Sustav je dizajniran za automatiziranu pipetiranje, doziranje, miješanje i rukovanje pločicama te može rukovati s raznim vrstama uzoraka i volumena. Nudi precizno i točno rukovanje tekućinama upotrebom različitih tehnologija, uključujući pipetiranje zrakom i mjerenje razine tekućine. Rukovanje tekućinama omogućuju dvije robotske ruke LiHa koja sadrži nastavke za pipete i može uvlačiti tekućinu i ispuštati isto te RoMa koja služi za pomicanje predmeta duž x,y,z osi unutar robotskog prostora. Kombinacijom se rada tih dviju robotskih ruka omogućuje potpuna automatizacija postupka. Jedna od ključnih značajki Tecan FreedomEvo je modularni dizajn koji omogućuje korisnicima prilagodbu sustava svojim specifičnim potrebama. Sustav se može konfigurirati nizom radnih stanica, uključujući pipetiranje, miješanje i kontrolu temperature, a lako se može integrirati s drugom laboratorijskom opremom, poput inkubatora i automatskih jedinica za pozitivni tlak. Tecan FreedomEvo nudi fleksibilne jednostavno programiranje i prilagođavanje protokola tekućinske manipulacije. Softver sustava lako se može integrirati s drugim laboratorijskim softverom, a može automatizirati niz zadataka, poput razrjeđivanja uzoraka, dodavanja reagensa i prijenosa pločica. Još jedna ključna značajka Tecan FreedomEvo je njegova sposobnost rukovanja s više uzoraka istovremeno, što omogućuje visok propusni kapacitet za obradu velikih skupova uzoraka. Robotika sustava također može izvršiti složene zadatke, poput repliciranja pločica, otiskivanja pločica i odabira određenih uzoraka.



Slika 9. – Tecan FreedomEvo automatizirani sustav za tekućinsku manipulaciju i robotiku
(Preuzeto iz <https://lifesciences.tecan.com/freedom-evo-platform>)

Prilikom automatizacije izolacije koristeći Tecan FreedomEvo sustav i robotiku izrazito je važno pravilno posložiti i konfigurirati naredbe unutar softvera. Precizna konfiguracija osigurava izbjegavanje grešaka i neželjenih incidenata poput sudara robotskih ruka, pipetiranja u prazno i slično. Važno je dobro podesiti volumene koje robotska ruka mora ispipetirati i vektorske parametre kako bi pipetiranje bilo točno i precizno. Također, konfiguracija radnog stola unutar Tecan sustava igra ključnu ulogu u pravilnom i simultanom radu robotskih ruka. Konfiguraciju jednog takvog radnog stola unutar Tecan FreedomEvo softvera prikazuje **Slika 10.**



Slika 10. – Radni stol unutar Tecan sustava. S lijeve se strane nalaze različiti volumeni nastavaka za pipete koje robotska ruka može uzeti (Li-Ha), pored njih su tekućine koje želimo da nam robot ispipetira, dok se na ostalim poljima nalaze mjesta za različite instrumente poput tresilice, tubica, inkubatora itd. S desne strane (narančasti stol) nalazi se prostor za stavljanje pločica u koje želimo da nam robot ispipetira tekućinu. Svako polje, odnosno, postolje ima svoje koordinate koje su bitne za precizne radnje robota.

Također, kako bismo bili sigurni da napisana skripta unutar sustava funkcionira onako kako smo zamislili potrebno je provesti test gdje se ispituje reproducibilnost i preciznost robota. Tek nakon što smo ispitali i provjerili ponovljivost i preciznost robota možemo biti sigurni kako će protokol izolacije teći kako smo zamislili.

1.6. Važnost glikana u prediktivnoj medicini

Novim metodama visoke protočnosti u biomedicinskim testovima koji generiraju veliku količinu podataka otkrivena je velika interindividualna varijabilnost u mehanizmima i faktorima koji utječu na patofiziološke procese, kao i u njihovim posljedicama na pojedinca. Postavlja se pitanje koliko ta varijabilnost može utjecati na odluku o optimalnom načinu liječenja, praćenja, prevencije i ranog otkrivanja bolesti kod svakog pojedinog pacijenta. Danas se općenito prihvaća da terapija i prevencija trebaju biti personalizirane, prilagođene jedinstvenom biokemijskom, fiziološkom, okolišnom i bihevioralnom profilu svakog pacijenta, zbog velike heterogenosti patoloških stanja. Primjer personalizirane medicine je krojenje terapije i doziranje lijekova na temelju genoma pacijenta, odnosno analiziranih gena koji utječu na metabolizam lijekova, a time i na njihovu farmakokinetiku.

Glikani su specifično vezani za pojedinca i podliježu jakom epigenetičkom utjecaju, prvenstveno utjecaju okoliša, prehrane i trenutnog stanja pojedinca. Zbog toga što u glikozilaciji sudjeluje mnogo enzima, male varijacije i odstupanja od homeostatskih uvjeta organizma (infekcija, inflamacija) izrazito utječu na glikom pojedinca. Izradom glikomskog profila osobe mogao bi se dobiti uvid u njegovo trenutno stanje bolesti i personalizirano krojiti terapiju i terapijske mete. Glikani igraju veliku ulogu u prediktivnoj medicini jer se mogu mijenjati prije nego što bolest nastupi. Redovitim glikoprofiliranjem možemo s određenom sigurnošću reći hoće li osoba razviti neki oblik bolesti u skorijoj budućnosti te ju prevenirati prije nego što uopće nastupi. Glikani mogu u tom slučaju poslužiti kao vrijedni prediktivni biomarkeri. U sklopu personalizirane medicine uvođenje osobnih graničnih vrijednosti je preferirano u odnosu na korištenje populacijskih graničnih vrijednosti dobivenih epidemiološkim studijama (Goetz i Schork, 2018).

Personalizirana medicina je jedan od četiri principa P4 medicine koji postaje dominantna paradigma u pristupu pacijentu. Ostala tri principa su prediktivna, preventivna i participativna medicina. Prediktivna medicina omogućuje detekciju patofiziološkog procesa prije nego što započne ili je u ranoj fazi, koristeći genetske, biokemijske i druge markere za predviđanje nastanka bolesti. Preventivna medicina fokusira se na održavanje zdravlja promicanjem zdravog životnog stila, edukacijom zajednice i primjenom preventivnih metoda liječenja poput cijepljenja. Participativna pak medicina zahtijeva aktivan angažman pacijenata i korisnika medicinskih usluga za preuzimanje odgovornosti za vlastito zdravlje i doprinos razvoju medicine dijeljenjem digitalnih podataka nastalih praćenjem biometrijskih parametara.

Također, personalizirana medicina ima potencijal da smanji troškove zdravstvene skrbi kroz precizniju dijagnostiku i odabir terapija. Na primjer, korištenje biomarkera kao što su glikani može pomoći u identificiranju pacijenata koji su manje vjerojatno da će reagirati na određenu terapiju, čime se izbjegava nepotrebno propisivanje lijekova i smanjuju se troškovi liječenja. Također, personalizirana medicina može pridonijeti i razvoju novih terapija i lijekova, prilagođenih specifičnim potrebama pojedinih pacijenata.

Uz sve navedeno, personalizirana medicina ima i neke izazove. Jedan od njih je nedostatak standardiziranih metoda za izradu glikomskog profila i interpretaciju podataka. Također, postavlja se pitanje kako uključiti širu populaciju u personaliziranu medicinu, posebno one koji nemaju pristup visokotehnološkoj dijagnostici ili su financijski ograničeni.

Unatoč tim izazovima, personalizirana medicina predstavlja nadu za budućnost zdravstvene skrbi. U kombinaciji s prediktivnom, preventivnom i participativnom medicinom, personalizirana medicina ima potencijal da transformira način na koji se bavimo bolestima i zdravljem, čime se poboljšava kvaliteta života pojedinaca i društva u cjelini.

2. Obrazloženje teme

Mnoge bio i makromolekule imaju glikanske forme koje su odraz njihove funkcionalnosti i koje utječu na cijeli repertoar njihovih svojstava. Glikanske forme molekule dobivaju procesom glikozilacije koji se događa post i kotranslacijski. Glikani ovise o epigenetici i stilu života pojedine osobe, te se mogu koristiti kao biomarkeri u personaliziranoj medicini. No, prije nego što ih možemo koristiti kao biomarkere, moramo biti sigurni u stabilnost N-glikoma IgG u uzorcima tijekom duljeg vremena. Bez saznanja o stabilnosti ne možemo sa sigurnošću reći vidimo li razliku u biološkim uzorcima jer ne znamo je li ona posljedica inter i intraindividualnih razlika ili nestabilnosti N-glikoma u promatranom vremenskom okviru. Stoga će se ovaj rad fokusirati na promatranje stabilnosti N-glikoma IgG u poduljem vremenskom periodu (do deset godina), a u svrhu dobivanja uvida u stabilnost glikana u uzorcima plazme kroz dulji vremenski period. Također, cilj je stvoriti automatizirani pristup prilikom izolacije glikana koji zadržava prednosti laboratorijske automatizacije minimizirajući nedostatke povezane s ručnim radom u laboratoriju, a sve u svrhu smanjivanja ovisnosti o ljudskim intervencijama i povećanja protočnosti uz postizanje zadovoljavajuće tehničke varijabilnosti.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

Tablica 2. – Popis kemikalija korištenih u radu

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
30 mM APTS u 3,6 M limunskoj kiselini	Sigma-Aldrich, SAD
2-pikolin boran	Sigma-Aldrich, SAD
Acetonitril (ACN), HPLC razina čistoće	PanReac AppliChem, SAD
Amonijev bikarbonat	Fluka, Švicarska
Bio-Gel P-10	Bio-Rad Laboratories, SAD
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, SAD
Dinatrijev fosfat	Fluka, Švicarska
Igepal® CA 360	Sigma-Aldrich, SAD
Kalijev fosfat	Kemika, Hrvatska
Kalijev klorid	Kemika, Hrvatska
Klorovodična kiselina (37%)	Kemika, Hrvatska
Ledena octena kiselina	Merck, Njemačka
Mravlja kiselina	Merck, Njemačka
Natrijev hidroksid	Kemika, Hrvatska
Natrijev klorid	CARLO ERBA Reagents, Italija
Propan-2-ol	Fluka, Švicarska
SDS (natrijev dodecil sulfat)	Invitrogen Life Technologies, Japan
TRIS pufer	Sigma-Aldrich, SAD

Tablica 3. – Popis enzima korištenih u radu

ENZIMI	
PNGaza F (10 U/ μ L)	Promega, SAD

3.1.2. Uređaji i pribor

Tablica 4. – Popis uređaja i pribora korištenih u radu

UREĐAJ I PRIBOR	PROIZVOĐAČ
Armadillo PCR Plate, 96-well, clear, clear wells PCR pločice	Thermo Scientific, SAD
AcroPrep WWPTFE0,2 μm filter pločice	Pall Corporation, SAD
AcroPrep WWPTFE0,45 μm filter pločice	Pall Corporation, SAD
Analitička vaga (Explorer®)	OHAUS, SAD
Centrifuga (model 5804)	Eppendorf, SAD
Filteri za pufere (Nalgene™ Rapid-Flow™, 0,2 μm)	Thermo Scientific, SAD
Inkubator (DNI-50, 37° C)	MRC, Izrael
Pećnica (DNO-50, 65° C)	MRC, Izrael
Pipete (jedno- i multikanalne)	Rainin (Mettler Toledo), SAD
Pločica monolita s proteinom G (CIM® r-Protein G LLD 0.2 mL Monolithic 96-qell Plate, 2μm channels)	BIA Separations (dio Sartoriusa, SAD), Slovenija
Pločice za sakupljanje, zapremina 1 i 2 mL (eng. 96-well collection plates)	Waters, SAD
Rotacijski vakuum koncentrador (model Savant™ SC210A SpeedVac™), zamka za otapalo (model Savant™ Refrigerated Vapor Traps RVT400) i vakuumska pumpa (model OFP400)	Thermo Scientific, SAD
Tresilica (model 3023)	GFL, Njemačka
pH metar Seven Compact	Mettler Toledo
Porvair termalna ljepljiva folija	Porvair, SAD
NanoDrop 8000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, SAD
3500 Series Genetic Analyzers for Human Identification	Thermo Scientific, SAD

3.1.3. Priprema pufera i otopina

Tablica 5. – Popis pufera i otopina korištenih u radu

PUFERI I OTOPINE	PRIPREMA		
10x PBS, pH=6,6	Soli	c [mmol/L]	γ [g/L]
	NaCl	137,94	80,028
	Na ₂ HPO ₄	9,74	13,832
	KH ₂ PO ₄	2,18	2,964
	KCl	2,65	1,976
	Priprema 1 L pufera: otopiti sve soli u otprilike 800 mL ultra-čiste vode, podesiti pH s 1M NaOH te nadopuniti ultra-čistom vodom do 1 L. Otopinu zatim filtrirati. Čuvati na sobnoj temperaturi.		
5x PBS	Potrebno je razrijediti 10x PBS u omjeru 1:2 (v/v) Priprema 500 mL pufera: 250 mL 10x PBS nadopuniti ultra-čistom vodom do 500 mL. Čuvati na 4°C.		
1x PBS, pH=7,4	Potrebno je razrijediti 10x PBS u omjeru 1:10 (v/v) Za 1 L pufera: 100 mL 10x PBS nadopuniti ultra-čistom vodom do 1 L te podesiti pH s 1 M NaOH. Čuvati na 4°C.		
20% etanol u 20mM TRIS + 0,1 M NaCl, pH=7,4	Soli i baze	c [mmol/L]	γ [g/L]
	TRIS (Mr = 121, 14 g/mol)	0,02	2,42
	NaCl	0,1	5,844
	Priprema 1 L pufera: sve soli otopiti u 200 mL bezvodnog etanola, nadopuniti ultra-čistom vodom do 700 mL, podesiti pH s 1 M HCl te nadopuniti ultra-čistom vodom do 1 L. Čuvati na 4°C.		

PUFERI I OTOPINE	PRIPREMA
0,1 M NaOH	Priprema 500 mL otopine: otopiti 2 g NaOH u 500 mL ultra-čiste vode te otopinu filtrirati. Čuvati na sobnoj temperaturi.
0,1 M mravlja kiselina, pH=2,5	Priprema 1 L pufera: 3,77 mL mravlje kiseline dodati u 1 L ultra-čiste vode. Čuvati na 4°C
1 M amonijev bikarbonat	Priprema 100 mL otopine: 79,06 g amonijevog bikarbonata otopiti u 100 mL ultra-čiste vode. Čuvati na 4°C.
30% (v/v) propan-2-ol	Priprema 500 mL otopine: u 150 mL propan-2-ola dodati 350 mL ultra-čiste vode te otopinu filtrirati. Čuvati na 4°C.
0,5% SDS	Priprema 100 mL otopine: otopiti 0,5 g SDS u 100 mL ultra-čiste vode. Čuvati na 4°C.
4% Igepal	Priprema 500 mL otopine: u 48 mL ultra-čiste vode dodati 2 mL Igepala te dobro promiješati. Čuvati na 4°C.
70% etanol	Priprema 50 mL otopine: u 35 mL bezvodnog etanola dodati 15 mL ultra-čiste vode. Pripremiti uvijek svježe.
80% acetonitril + 100 mM TEA	Priprema 500 mL otopine: u 400 mL acetonitrila dodati 6,925 mL 100 mM trietanolamina (TEA) te nadopuniti do 500 mL ultra-čistom vodom. Čuvati na 4°C.
APTS otopina za obilježavanje glikana	Za jedan uzorak: 220 µL APTS otopine pomiješati s 220 µL 2-pikolin borana (PB) uz vorteksiranje

3.1.4. Ispitanici i uzorkovanje

U ovom su istraživanju sudjelovali dvojica odraslih zdravih muškaraca, između 47 i 52 te između 55 i 65 godina. Obojica su dali informirani pristanak da se njihovi uzorci koriste u ovom istraživanju. Uzorci su uzimani u periodu od pet, odnosno, deset godina. Uzorci u razdoblju od pet godina uzimani su svaka tri mjeseca, dok su uzroci u razdoblju od deset godina uzimani svaka tri tjedna. Krv je uzeta na antikoagulans (EDTA) i centrifugirana, čime je odvojena krvna plazma i takva spremljena na -20°C za daljnju analizu. U koracima opisanima u poglavlju 3.2.1. **(Izolacija IgG iz krvne plazme automatiziranom metodom pomoću monolita s proteinom G)** iz plazme je, pomoću robotskog automatiziranog pristupa, izoliran IgG, čime su dobivena dva seta uzorka; oni vađenih u periodu od pet, odnosno, deset godina, kojima je analiziran profil N-glikana IgG.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija IgG iz krvne plazme automatiziranom metodom pomoću monolita s proteinom G

3.2.1.1. Pripremanje plazma standarda i plazma uzoraka

Uzorke je plazme potrebno prvo odmrznuti, a protein G pločicu monolita i sve puferne staviti 30 min na sobnu temperaturu. Zatim se odmrznuta plazma vorteksira i centrifugira kako bi se odvojili lipidi i to 3 minute na 12045g (13 400 okretaja/min u Eppendorf MiniSpin Centrifugi, rotor F-45-12-11) ili 10 minuta na 1620g (3000 okretaja/min u Eppendorf Centrifugi 5804, rotor A-4-44). Na temelju se randomizacije triplikata uzoraka odpipetira 100 µL 1x PBS u jažice koji služi kao slijepa proba (blank). Nakon toga se, u nasumično odabrane jažice na pločici, nanosi 100 µL standardnog uzorka plazme. Jažice u kojima se nalazi blank i standard uzorka plazme razrjeđuju se s 175 µL 1x PBS. Uzorci plazme volumena 25 µL razrijeđeni su 1x PBS puferom (pufer za vezanje) u omjeru 1:7 (v/v) te su nanoseni na AcroPrep WWPTFE 0,45 µm filter pločicu zapremine 1 mL i filtrirani. Filtrat se skuplja u pločicu za sakupljanje zapremine 1 mL i takav se ostavi na tresilici, dok pločica monolita s proteinom G ne bude spremna za korištenje.

3.2.1.2. Filtriranje uzoraka

Između ovih i narednih koraka, pločica se prazni automatskom jedinicom za pozitivni tlak Resolvex® A200 koja je dio Tecan FreedomEvo automatiziranog sustava. Pritom vakuum ne smije prelaziti 10 inHg ukoliko se radi o ispiranju, odnosno, 5 inHg ako se radi o prvom odsisavanju nakon nanošenja filtrirane plazme na pločicu monolita ili eluiranju IgG.

3.2.1.3. Pre-kondicioniranje Protein G pločice monolita

Pločica monolita s proteinom G može se koristiti više puta, a dok se ne koristi, čuva se u hladnjaku na 4°C u puferu za pohranu (20% (v/v) etanol u 20mM TRIS + 1M NaCl, pH 7,4). Prije uporabe, potrebno je ukloniti pufer za pohranu te isprati jažice s 0,5 mL ultra-čiste vode i 0,5 mL 1x PBS pufera, radi uklanjanja mogućih mehaničkih nečistoća. Nakon toga jažice se isperu s 0,25 mL 0,1M mravlje kiseline (pH 2,5), kako bi se eluirali proteini koji su eventualno zaostali prilikom prijašnje izolacije. Zatim se provodi neutralizacija s 0,5 mL 10x PBS pufera te ekvibracija s 1 mL 1x PBS pufera nakon čega je pločica monolita s proteinom G ponovno spremna za korištenje.

3.2.1.4. Vežanje IgG i ispiranje

Filtrirana se plazma s tresilice prenese na, sada spremnu, pločicu monolita s proteinom G kako bi se IgG vežao za protein G, te se odsiše pomoću A200. Ovako se odsisana plazma može prikupiti za daljnju analizu ili baciti u infektivni otpad. Nakon odsisavanja, jažice pločice isperu se s po 0,5 mL 1x PBS pufera, tri puta.

3.2.1.5. Elucija IgG

Pločica se monolita s proteinom G stavi iznad kolekcijske pločice zapremnine 1 mL u koju se netom prije u svaku jažicu dodalo 42,5 μ L neutralizacijskog pufera (1M amonijev bikarbonat). Amonijev se bikarbonat dodaje kako bi se spriječila desijalinizacija glikana IgG u kiselom mediju. Zatim slijedi pipetiranje 0,25 mL 0,1M mravlje kiseline u svaku jažicu pločice monolita s proteinom G kako bi se IgG eluirao i odsiše. IgG eluat se pokrije aluminijskom folijom i ostavi na tresilici kad će biti spreman za mjerenje IgG koncentracije.

3.2.1.6. Regeneracija i čuvanje pločice monolita s proteinom G

Pločica se monolita s proteinom G obnavlja na način da se doda 0,5 mL 0.1M mravlje kiseline, 0,5 mL 10x PBS pufera i 1 mL 1x PBS pufera u svaku jažicu. Potom se jažice isperu jednom s 0,25 mL pufera za pohranu, a zatim se doda 0,7 mL istog pufera koji se ne odsisava (samo se malo propusti da se pufer uvuče u jažice) te se pločica s tako dodanim puferom za pohranu čuva u hladnjaku na 4° C do sljedeće uporabe. Eluat se može koristiti za daljnju analizu odmah ili se nakon sušenja, u rotacijskom vakuum koncentratoru, pohranjuje na -20° C.

3.2.1.7. Mjerenje koncentracije i pohrana IgG

Koncentracija se IgG u eluatu (3 μ L) mjeri na NanoDrop 8000 spektrofotometru. Koncentracija se mjeri na valnoj duljini od 280 nm. Nakon mjerenja koncentracije pločica se suši 1-2 sata ovisno u volumenu u rotacijskom vakuum koncentratoru (speed vac) te se sprema u zamrzivač do deglikozilacije.

3.2.2. *In solution* deglikozilacija i APTS bojanje za xCGE-LIF

3.2.2.1. Denaturacija

Svakom je uzorku potrebno dodati 3 μL 1,66% PBS i resuspendirati pipetiranjem. Zatim se na isti način dodaje 4 μL 0,5% SDS te se stavi 10 min inkubirati na 65°C prije čega se pločica pokrila Porvair termalnom ljepljivom folijom. Nakon inkubacije doda se još 2 μL 4% Igepala i resuspendira pipetiranjem. Zatim se pločica ostavi miješati na tresilici i pristupa se pripremi enzima koji se uvijek priprema svježi.

3.2.2.2. Deglikozilacija

Najprije se pripravlja smjesa enzima i to na način da se pomiješa 1 μL 5x PBS i 0,12 μL PNGase F po uzorku. Svakom se uzorku plazme i IgG još dodaje 1 μL smjese enzima (radi moguće pogreške pipete) i resuspendira pipetiranjem. Pločica se zatim pokrije Porvair termalnom ljepljivom folijom i stavi u inkubator na 37°C točno 3 sata kako bi se oslobodili N-glikani. Nakon 3 sata smjesa se suši točno 1 sat u rotacijskom vakuum koncentratoru. Nakon toga pristupa se obilježavanju N-glikana APTS-om.

3.2.2.3. APTS obilježavanje

U svaki se uzorak doda 2 μL ultra-čiste vode i resuspendira pipetiranjem. Nakon toga, doda se 220 μL APTS otopine za obilježavanje (30 mM APTS u 3,6 M limunskoj kiselini) glikana i 220 μL 2-pikolin borana. Zatim se dodatno još doda 4 μL APTS/PB smjese za obilježavanje u svaki uzorak. Pločica se pokrije Porvair termalnom ljepljivom folijom i stavi u pećnicu na 37°C točno 16 sati kako bi se oslobođeni N-glikani fluorescentno obojali. Nakon toga slijedi pročišćavanje glikana.

3.2.3. HILIC-SPE pročišćavanje N-glikana za xCGE-LIF

3.2.3.1. Zaustavljanje reakcije obilježavanja glikana

Zaustavljanje se reakcije provodi dodatkom 100 μL , na 4°C ohlađenog, 80% ACN u svaku jažicu. Pločica se zatim pokrije aluminijskom folijom i ostavi na 4°C maksimalno 1 sat dok nije spreman za sljedeći korak, pročišćavanje.

3.2.3.2. Priprema i kondicioniranje Bio-Gel P-10 gela

Bio-Gel se pipetira u jažice nove, čiste 350 μ L wwPTFE 0,2 μ m filter pločice. Prvo se WWPTFE pločica stavi na uređaj za filtriranje pomoću vakuuma te se odpipetira 190 μ L Bio-Gel P-10 gela u svaku jažicu wwPTFE pločice i primijeni vakuum. Zatim se ispipetira 200 μ L ultra-čiste vode i inkubira 1 minutu te opet filtrira i taj se postupak ponovi još dva puta. Samo se prvi put, nakon dodatka ultra-čiste vode promiješa. Nakon toga slijedi pipetiranje 200 μ L 80% ACN, inkubacija 1 minutu i vakuum filtracija. Taj se postupak ponavlja još dva puta, a treći se put promiješa. Nakon toga se odmah kreće na korak 3.2.3.3.

3.2.3.3. Pročišćavanje APTS-obilježenih N-glikana

Totalni se volumen uzorka od 110 μ L (10 μ L uzorka + 100 μ L 80% ACN) pažljivo prebaci u WWPTFE pločicu koja sadrži Bio-Gel i koja se prvo poklopi poklopcem, a zatim stavi centrifugirat 5 minuta na 450 okretaja/min te se profiltrira pomoću vakuum pumpe (u ovom se koraku, N-glikani vežu za Bio-Gel P-10 stacionarnu fazu). Nakon toga slijedi pipetiranje 200 μ L 80% ACN koji sadrži 100 mM TEA (80:20, v/v) (pH=8,5) u svaku jažicu WWPTFE filter pločice te, nakon centrifugiranja 2 minute na 450 okretaja/min, filtracija. Taj se postupak ponovi još četiri puta. TEA služi kako bi neutralizirala višak APTS boje. Zatim slijedi pipetiranje 200 μ L 80% ACN u svaku jažicu, centrifugiranje 2 minute na 450 okretaja/min i filtracija. Taj se postupak ponavlja još dva puta. ACN služi kako bi neutralizirao višak TEA iz prethodnog procesa i reducirao udio soli. Nakon zadnjeg dodatka 200 μ L 80% ACN i filtracije WWPTFE filter pločica se stavi na 1 mL kolekcijsku pločicu te je spremna za završni korak elucije obilježenih glikana.

3.2.3.4. Elucija APTS-obilježenih N-glikana

Elucija obilježenih glikana započinje tako da se u svaku jažicu WWPTFE pločice odpipetira 100 μ L ultra-čiste vode te nakon centrifugiranja 5 minuta na 450 okretaja/min primijeni vakuum i profiltrira u 1 mL kolekcijsku pločicu. Zatim se odpipetira 200 μ L ultra-čiste vode te nakon centrifugiranja 5 minuta na 450 okretaja/min primijeni vakuum i skupi frakcija eluata u 1 mL kolekcijsku pločicu. Taj se postupak ponovi. Finalni volumen eluata iznosi oko 500 μ L. Nakon toga se pločica pokrije Porvair termalnom ljepljivom folijom i pospremi u zamrzivač dok nije spremna za xCGE-LIF. Tako spremljeni N-glikani u zamrzivaču mogu stajati i do jedne godine.

3.2.3.5. xCGE-LIF analiza N-glikana IgG

Fluorescentni APTS-obilježeni N-glikani IgG razdvojeni su na multipleksnoj kapilarnoj gel elektroforezi (xCGE), a detektirani laserom potaknutom fluorescencijom (LIF).

Uređaj koji je korišten za analizu je 3500 Series Genetic Analyzer za humanu identifikaciju koji je, u principu, kapilarna elektroforeza. Sastoji se od 8 kanalnog kapilarnog sistema, lasera koji eksitira na 505 nm, pumpe koja pumpa polimer (POP-4™, POP-6™, POP-7™) kroz kapilare, pećnice, od anodnog i katodnog pufera te njihovih nosača. Polimeri i puferi dolaze u već spremnim kadicama za korištenje tako da se eliminira potencijalna kontaminacija i minimizira održavanje istih. Najveća je prednost ovog multipleksnog analizatora ta što ima visoku protočnost, odnosno, može već za 24 sata analizirati dvije pločice od po 96 uzoraka svaka, dok bi takva ista analiza na UHPLC trajala 72 sata.

Mi smo koristili protokol IPV2, napon od 15 kV, temperaturu pećnice od 60°C i vrijeme injektiranja od 4 sekundi.



Slika 11. – Dijelovi korištenog xCGE-LIF uređaja

(Preuzeto i prilagođeno iz <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4406017>)

3.2.3.6. Analiza podataka

Prilikom statističke obrade podataka korišteni su računalni programi Microsoft Excel® 2021 i Python® (verzija 3.11.3.) s pripadajućim bibliotekama za vizualizaciju podataka (Matplotlib (verzija 3.7.1.), Pandas (verzija 1.5.3.), Seaborn (verzija 0.12.2.)). Svaki od 27 integriranih elektroferogramskih vršaka, tj. pikova (GP, eng. *Glycan peak*) dobivenih CGE-LIF analizom N-glikoma IgG, predstavlja glikanske strukture čija je količina unutar samoga pika predstavljena postotkom od ukupne površine svih integriranih pikova. Osim izmjerenih glikanskih struktura izračunata su derivirana svojstva.

Derivirana svojstva obuhvaćaju glikane koji dijele neke od dominantnih strukturnih svojstava: glikani bez galaktoze (agalaktozilirani, G0), glikani s jednom ili dvije galaktoze (mono- i digalaktozilirani, G1 i G2), glikani koji sadrže fukozu (fukozilirani, F), glikani koji sadrže račvujući (eng. *bisecting*) N-acetilglukozamin (B) te glikani koji sadrže jednu ili dvije sijalinske, odnosno, N-acetilneuraminske kiseline (mono- i disijalizirani, S1, S2).

Derivirani su parametri bolje povezani s individualnim enzimatskim aktivnostima i genetskim polimorfizmom vezanima za te enzime (Lauc i sur., 2010).

Izračun je svakog deriviranog svojstva dan u **Tablici 6.**

Tablica 6. – Izračun deriviranih svojstava za N-glikane IgG

DERIVIRANO SVOJSTVO	SUMA POVRŠINE PIKOVA
G0	GP14+GP15+GP16
G1	GP16+GP17+GP19+GP20+GP21+GP22+GP23+GP24
G2	GP25+GP26+GP27
F	GP3+GP4+GP7+GP8+GP12+GP13+GP15+GP18 +GP21+GP22+GP23+GP24+GP26+GP27
B	GP2+GP4+GP11+GP13+GP14+GP18+GP19+GP20+GP23+GP24+GP25+GP27
S1	GP5+GP6+GP7+GP8+GP9+GP10+GP11+GP12+GP13
S2	GP1+GP2+GP3+GP4
S (S1+S2)	GP1+GP2+GP3+GP4+GP5+GP6+GP7+GP8+GP9+GP10+GP11+GP12+GP13

4. Rezultati i rasprava

U ovom su istraživanju dva odrasla zdrava muškarca, u dobi između 47 i 52 te između 55 i 65 godina. Uzorci su prikupljeni tijekom petogodišnjeg i desetogodišnjeg razdoblja. Uzorci su se prikupljali svaka tri mjeseca tijekom petogodišnjeg razdoblja, dok su se tijekom desetogodišnjeg razdoblja uzimali svaka tri tjedna te im je analiziran profil N-glikana IgG. Stvoren je automatizirani pristup prilikom izolacije glikana i napisana funkcionalna skripta koja pokriva izolaciju unutar Tecan Freedom EVO softvera (**Slika 12.**), a ispitivanje reproducibilnosti i preciznosti robota provjeravali smo u sklopu ispitivanja preciznosti Tecan nastavaka za pipete od 1000 μ L (**Tablica 8a. i 8b.**). U sklopu pisanja skripte za robota izrađen je radni stol sa svim pripadajućim elementima (**Slika 10.**).

Uz pomoć pločice monolita s proteinom G koristeći Tecan automatizirani sustav i robotiku izoliran je IgG iz dijela krvne plazme svakog uzorka nakon petogodišnjeg, odnosno, desetogodišnjeg prikupljanja. Koncentracije IgG nakon automatizirane izolacije uzoraka plazme koji su skupljeni u razdoblju od pet godina prikazane su u **Tablici 7.** Ovakve su nam tablice korisne da već u ranoj fazi istraživanja uočimo ima li potencijalnih aberacija prateći koncentracije vanjskih, odnosno, unutarnjih standarda. N-glikani IgG oslobođeni su pomoću enzima PNGase F te su fluorescentno obilježeni s APTS. Tako fluorescentno obilježeni N-glikani pročišćeni su HILIC-SPE metodom te analizirani xCGE-LIF metodom, čime su dobiveni elektroferogrami koji predstavljaju profil N-glikana IgG.

Elektroferogram koji predstavlja profil N-glikana IgG podijeljen je na 28 pikova s pripadajućim strukturama glikana koje su određene MS i egzoglikozidaznim digestijama, a prikazan je na **Slici 13.** Količina je određenih glikanskih struktura u pojedinom piksu izračunata kao postotak (%) od ukupne integrirane površine za svaki uzorak u triplikatu i uzeta srednja vrijednost. Nadalje, iz toga je izračunata standardna devijacija i koeficijent varijacije koji su nam poslužili za kontrolu kvalitete.

Također, izračunata su četiri derivirana svojstva (S, G1, G2 i G0) jer je pokazano kako upravo ta derivirana svojstva igraju ključnu ulogu u starenju (Gudelj i sur., 2018). Izračunata su i dva derivirana svojstva F (glikani koji sadrže sržnu fukozu) i B (glikani koji sadrže račvujući N-acetilglukozamin) koja također mogu biti uključeni u proces starenja. Prateći trend deriviranih svojstava kroz vrijeme razvili smo grafikon (**Slika 14a.**) koji prikazuje ovisnost srednje vrijednosti udjela pika (kao %) u ukupnoj integriranoj površini u vremenu od 5 godina za četiri glavna derivirana svojstva povezana sa starenjem i njihov trend kroz vrijeme, odnosno,

kako starimo. Također, isti je grafikon napravljen za uzorke koji su vađeni u periodu od 10 godina (**Slika 15a.**). Na **Slici 14b. i 15b.** prikazani su grafovi prije normalizacije. Razvijen je i set grafova koji prikazuju promjenu deriviranih svojstava B i F za svaki vremenski period.

Svi su podaci normalizirani, što znači da su podijeljeni s prvom vrijednosti kako bi bili uniformni i što bolje usporedivi. Iz takvog se grafikona jednostavno mogu generirati postoci smanjenja, odnosno, povećanja određenih deriviranih svojstava u vremenu, a to su zapravo glavni podatci koji pokazuju kako se starenjem mijenja N-glikom IgG neke osobe.






Postoci smanjenja, odnosno, povećanja deriviranih svojstava u rasponu od 5 godina dani su u **Tablici 9.**






Tablica 7. – Prikaz koncentracija IgG nakon automatizirane izolacije iz krvne plazme za uzorke vađene u periodu od pet godina (crveno su prikazane koncentracije slijepih proba, zeleno/plavo/žuto su obojene koncentracije standarda 4/5/6 tim redosljedom, neobojeni dio prikazuje koncentracije izoliranog IgG). Koncentracije slijepe probe očekujemo da su izrazito niske, dok koncentracije standarda očekujemo da su uniformne, tj. da odstupaju minimalno.

	Koncentracija (mg/mL)						
	1	2	3	4	5	6	7
A	0,3222	0,7462	0,3686	0,6375	0,6525	0,7945	0,6661
B	0,1763	0,6556	0,8182	0,415	0,4562	0,9241	0,8155
C	0,7943	0,4841	0,7852	0,0004	0,7922	0,8404	0,3653
D	0,8805	0,8617	0,6653	0,9978	0,7509	0,9793	0,6445
E	0,7607	0,8116	0,679	0,6868	0,2118	0,8754	0,245
F	0,9068	0,1182	1,028	0,1361	0,2037	0,8971	0,8538
G	0,5743	0,9151	0,9109	0,6817	0,6942	-0,001	1,013
H	0,9397	0,3876	0,9109	0,5295	0,3992	0,4974	0,5649

Sub-Routine	C:\ProgramData\Tecon\EN\ware\doctest\Scripts\B_IgG_8to_min_1_checklist.scx Execute subroutine and wait for it to finish
Group	Sample preparation
Comment	S2-1 free
Group	Dilute sample and transfer onto filter plate
Begin Loop	36 times "Input"
Set Variable	loop_no = ~LOOP_Input~
Import Variable	1 variable(s) <== C:\Users\Admin\Desktop\Variable\input.csv retrieve LINE (loop_no)
Set Variable	pipetting_volume_~loop_no~ = startconc
Export Variable	1 variable(s) ==> C:\Users\Admin\Desktop\Variable\Output.csv
End Loop	"Input"
Begin Loop	12 times "Column"
Wash Tips	3.0 + 4.0 ml
Begin Loop	8 times "Row"
Set Variable	number = ~LOOP_Row~+8*(~LOOP_Column~-1)
Set Variable	sample_volume = pipetting_volume_~NUMBER~
If - Then	sample_volume > 160
Get DITis	DIT: 1000ul CL LH4
Else	
Get DITis	DIT: 200ul CL LH4
End If	
Set Variable	TIP_OFFSET = TIP_OFFSET+1
Export Variable	2 variable(s) ==> C:\Users\Admin\Desktop\Variable\output_pipet.csv
End Loop	"Row"
Set Variable	TIP_OFFSET = 0
Begin Loop	8 times "Aspirate"
Set Variable	number = ~LOOP_Aspirate~+8*(~LOOP_Column~-1)
Set Variable	sample_volume = pipetting_volume_~NUMBER~
Aspirate	sample_volume µl Water free dispense no detection "P85" (Col. 1, Row 1)
Set Variable	TIP_OFFSET = TIP_OFFSET+1
End Loop	"Aspirate"
Set Variable	TIP_OFFSET = 0
Begin Loop	8 times "Dispense"
Set Variable	number = ~LOOP_Dispense~+8*(~LOOP_Column~-1)
Set Variable	sample_volume = pipetting_volume_~NUMBER~
Dispense	sample_volume µl Water free dispense no detection "P85" (Col. 1, Row 1) - 2 options
Set Variable	TIP_OFFSET = TIP_OFFSET+1
End Loop	"Dispense"
Set Variable	TIP_OFFSET = 0
Drop DITis	DIT: Nested Waste LH4
End Loop	"Column"
Set Variable	sandwich_site = 3
Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '3'; Destination: Grid 'S2', Site '2'; Narrow (R:IPA 1)
inhecoMTC	StartShake(1,250.0 Circle antiklockwise)
Start Timer	1

Wait for Timer	Time: 1: 9000 sec
Group	Pre prepare plate
Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '1'; Destination: Grid 'S2', Site '1'; Narrow (R:IPA 1)
A200	TestMethod(IgG_Isolation_01_storage_removal_2_min)
A200	RunWashMethod(IgG_Isolation_01_storage_removal_2_min; StopInBot=TRUE; LayoutDefinition=Range=1-96; Column=)
A200	WaitForMethod()
Comment	Storage removed
A200	TestMethod(IgG_Isolation_05_ProtG_Regeneration_Cov1_2_min)
A200	RunWashMethod(IgG_Isolation_05_ProtG_Regeneration_Cov1_2_min; StopInBot=FALSE; LayoutDefinition=Range=1-96; Column=)
Group End	Pre prepare plate
Start Timer	2
Wait for Timer	Time: 2: 1200 sec
inhecoMTC	StopShake(1)
Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '2'; Destination: Grid 'S2', Site '2'; Narrow (R:IPA 1)
Group End	Dilute sample and transfer onto filter plate
Comment	Sample diluted and transferred
A200	WaitForMethod()
Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '1'; Destination: Grid 'S2', Site '1'; Narrow (R:IPA 1)
Group End	Sample preparation
Group	Plasma filtration
Comment	Sandwich transferred, S2-2 occupied
Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '2'; Destination: Grid 'S2', Site '1'; Narrow (R:IPA 1)
Comment	S2-2 free
A200	TestMethod(IgG_Isolation_02_PTFEFiltration)
A200	RunWashMethod(IgG_Isolation_02_PTFEFiltration; StopInBot=FALSE; LayoutDefinition=Range=1-96; Column=)
Comment	In parallel
A200	WaitForMethod()
Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '1'; Destination: Grid 'S2', Site '2'; Narrow (R:IPA 1)
Comment	Remove aspirate from sandwich to enable sample transfer onto protein g plate
Comment	Sandwich disassembled
ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Shot Deepwell plate", Grid S2, Site 2 (R:IPA 1) open from Safe to End Position, grip from End to Safe Position
User Prompt	"Has the sandwich separated properly? Check the bottom for droplets" sound : no
ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Shot Deepwell plate", Grid S2, Site 3 (R:IPA 1) move from Safe to End Position, open from End to Safe Position
Group	Sample transfer
Begin Loop	12 times "Transfer sample onto P8P"
Wash Tips	3.0 + 4.0 ml
Get DITis	DIT: 1000ul CL LH4
Aspirate	800 µl Water free dispense no detection "Sample" (Col. 1, Rows 1-8) - 1 option
Dispense	800 µl Water free dispense no detection "Trans Protein G" (Col. 1, Rows 1-8) - 1 option
Drop DITis	DIT: Nested Waste LH4
End Loop	"Transfer sample onto P8P"
Group End	Sample transfer
Comment	Sample transferred to P8P

85	Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '2'; Destination: Grid 'S1', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
86	Comment	S2-2 occupied
87	Group End	Plasma Reaction
88	Group	Binding and washing
89	Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '1'; Destination: Grid 'S1', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
90	A200	TestMethod(IgG_isolation_03_binding_and_washing_2_min)
91	A200	RunWashMethod(IgG_isolation_03_binding_and_washing_2_min;StopVibrat=Fuse;LayoutDefinition=Range=1-96;Column=)
92	Group End	Binding and washing
93	Group	Elution preparation
94	Transfer Labware	Source: Grid 'S1', Site '1'; Destination: Grid 'S2', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
95	Comment	S2-2 occupied
96	Group	neutralization buffer pipetting
97	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
98	Get DITis	 DITi 1000ul CL LiHa
99	Aspirate	 42.5*13 ul >> Water free dispense no detection << "NS" (Col. 1, Rows 1-6)
100	Begin Loop	12 times "single"
101	Dispense	 42.5 ul Water free dispense no detection "Sample" (Col. 1, Rows 1-6) ; 1 option
102	End Loop	"single"
103	Drop DITis	 DITi Nested Waste LiHa
104	Group End	neutralization buffer pipetting
105	Comment	S2-2 free, carrier with neutralization buffer transferred to S2-1
106	Group End	Elution preparation
107	Group	Wait for binding to finish
108	A200	WaitForMethod()
109	Transfer Labware	Source: Grid 'S1', Site '1'; Destination: Grid 'S2', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
110	Comment	Sample bound and washed
111	Group End	Wait for binding to finish
112	Group	Elution
113	Comment	formic acid dispensed
114	Comment	S2-2 occupied
115	ROMA Vector	Vector "Drop Acampag filter plate onto 2nd DeepWell plate v2-3 collect", Grid S2, Site 1 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
116	User Prompt	"Has the sandwich separated properly?" sound : no
117	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1st Short Deepwell plate", Grid S2, Site 2 (ROMA 1) move from Safe to End Position, opens from End to Safe Position
118	Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '2'; Destination: Grid 'S1', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
119	Group	elution
120	A200	TestMethod(IgG_isolation_04_FA_Elution_2_min)
121	A200	RunWashMethod(IgG_isolation_04_FA_Elution_2_min;StopVibrat=Fuse;LayoutDefinition=Range=1-96;Column=)
122	Group End	elution
123	Group	parallel with elution
124	Comment	ppg carrier returned
125	A200	WaitForMethod()
126	Comment	sample eluted
127	Group End	parallel with elution
128	Transfer Labware	Source: Grid 'S1', Site '1'; Destination: Grid 'S2', Site '2'; Narrow (ROMA 1)

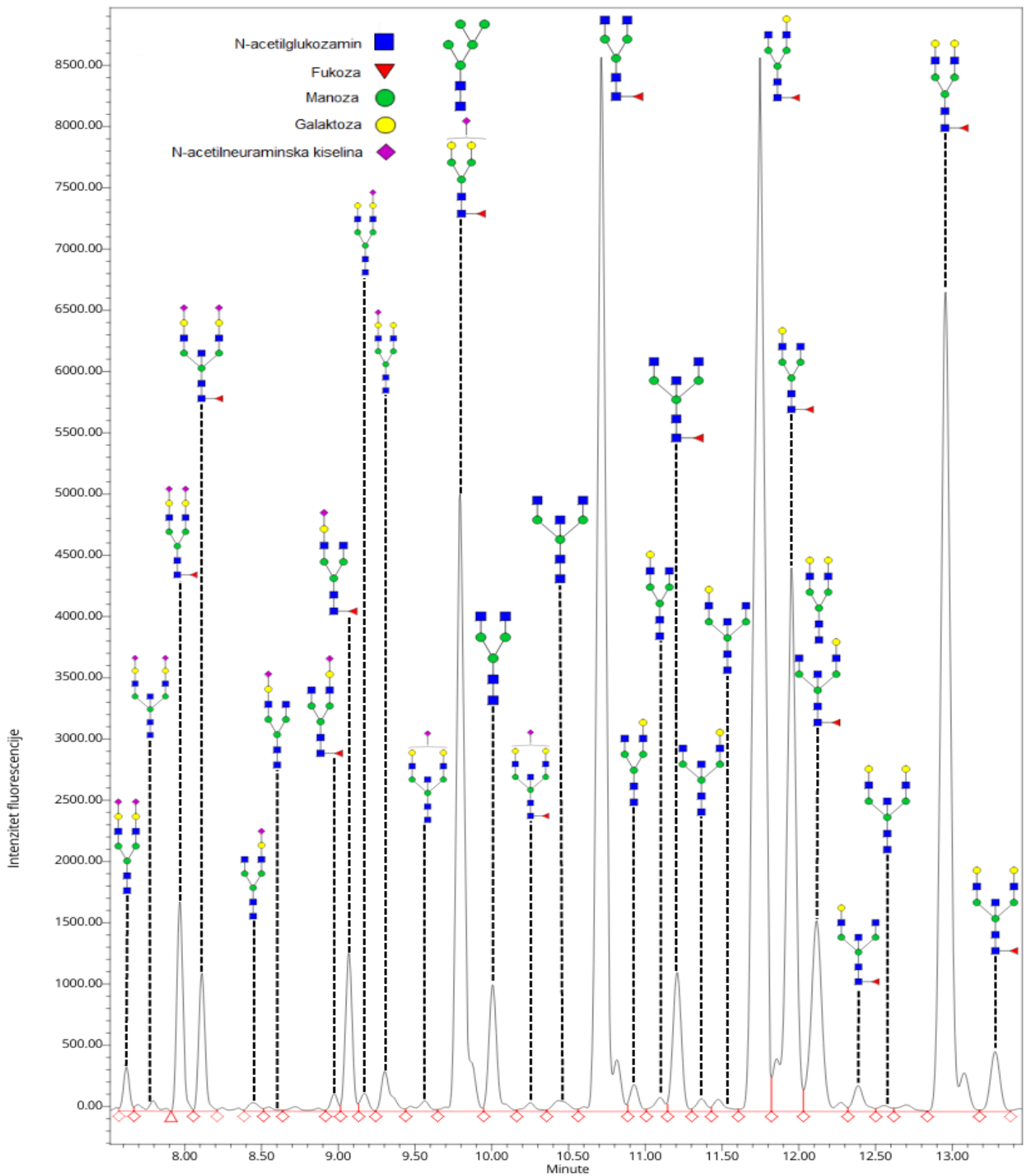
129	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1st Short Deepwell plate", Grid S2, Site 2 (ROMA 1) opens from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
130	User Prompt	"Has the sandwich separated properly?" sound : no
131	ROMA Vector	Vector "Drop Acampag filter plate onto 2nd DeepWell plate v2-3 collect", Grid S2, Site 1 (ROMA 1) move from Safe to End Position, opens from End to Safe Position
132	Comment	sandwich disassembled
133	Group End	Elution
134	Group	Regeneration of IgG plate
135	Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '1'; Destination: Grid 'S1', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
136	A200	TestMethod(IgG_isolation_05_Regeneration_Cond_2_min)
137	A200	RunWashMethod(IgG_isolation_05_Regeneration_Cond_2_min;StopVibrat=Fuse;LayoutDefinition=Range=1-96;Column=)
138	Group End	Regeneration of IgG plate
139	User Prompt	"Please make sure the shaker is empty! If you have another plate for analysis please repeat the preparation process!" sound : no
140	Group	Resuspension and shake
141	Transfer Labware	Source: Grid 'S2', Site '2'; Destination: Grid 'S1', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
142	inhecoMTC	StartShake(L750.0 Circle antiClockwise)
143	Start Timer	15
144	Wait for Timer	Timer 15 : 60 sec
145	inhecoMTC	StopShake(1)
146	Transfer Labware	Source: Grid 'S1', Site '2'; Destination: Grid 'S2', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
147	Group	resuspend and shake
148	Begin Loop	12 times "Resuspend"
149	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
150	Get DITis	 DITi 1000ul CL LiHa
151	Aspirate	 100 ul >> Water free dispense no detection << "Sample" (Col. 1, Rows 1-6) ; 1 option
152	Dispense	 100 ul Water free dispense no detection "Sample" (Col. 1, Rows 1-6) ; 1 option
153	Drop DITis	 DITi Nested Waste LiHa
154	End Loop	"Resuspend"
155	Group End	resuspend and shake
156	Comment	sample resuspended
157	Group End	Resuspension and shake
158	Group	Wait for regeneration
159	A200	WaitForMethod()
160	Transfer Labware	Source: Grid 'S1', Site '1'; Destination: Grid 'S2', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
161	Comment	Plate regenerated
162	Group End	Wait for regeneration
163	User Prompt	"If you want the sample aliquoted prepare and run script called Prepare_Sample_Drying Don't forget to put the Protein G plate into storage by running Fill protein G storage method on A200." sound : no

Slika 12. – Funkcionalna skripta za izolaciju IgG napisana unutar Tecan FreedomEvo softvera koja prikazuje sve bitne komponente (naredbe za robotsku ruku koja uzima nastavke za pipetu i pipetira tekućinu-LiHa, naredbe za robotsku ruku koja pomiče pločice duž x,y,z osi unutar radnog prostora robota-RoMa, miješanje na tresilici, A200 sustav za pozitivni tlak). Zbog preglednosti skripte komentarima su označeni pojedini dijelovi izolacije, a procesi jednog dijela grupirani su u grupe. Za radnje koje uključuju opetovana pipetiranja generirane su naredbe „petlje“ (Begin loop i End loop). Da bi izbjegli bilo kakva odstupanja kod pipetiranja važno je i nadasve preporučljivo ispirati prije svakog pipetiranja sustav pipeta i cijevi sistemskom tekućinom (dvostruko destilirana voda, dd H₂O). To se uočava u ovoj skripti gdje smo koristili naredbu „Wash Tips“ kako bismo prije svakog pipetiranja sistemskom tekućinom isprali uzete nastavke za pipetiranje i sustav cijevi unutar robota.

Tablica 8a. i 8b. – Ispitivanje preciznosti Tecan nastavaka za pipete volumena 1000 μL (negativna vrijednost pogreške označava da ispipetirano manje od očekivanog volumena dok pozitivna greška indicira da je ispipetirano više od očekivanog volumena). Dobiveni su koeficijenti varijacije unutar deklariranog raspona koeficijenata što znači da je preciznost postignuta i da se može pouzdano raditi na robotu

Proizvođač	Volumen nastavka za pipetu / μL	Očekivani volumen / μL	1. Masa praznog nastavka / mg	2. Masa praznog nastavka / mg	3. Masa praznog nastavka / mg	Prosječna masa praznog nastavka / mg
Tecan	1000	800	1002,2	1002,3	1002,3	1.002,27
	1000	800	1003,5	1003,6	1003,7	1.003,60
	1000	800	997,9	998,1	998,1	998,03
	1000	200	1018,3	1018,4	1018,4	1.018,37
	1000	200	1036,1	1036,3	1036,3	1.036,23
	1000	200	1003	1003,3	1003,3	1.003,20
	1000	50	1022,4	1022,3	1022,3	1.022,33
	1000	50	1026,5	1026,6	1026,6	1.026,57
	1000	50	1006,7	1006,8	1006,8	1.006,77

1. Masa punog nastavka / mg	2. Masa punog nastavka / mg	3. Masa punog nastavka / mg	Prosječna masa punog nastavka / mg	Volumen ispipetirane tekućine / μL	Pogreška	Koeficijent varijacije	Deklarirani koeficijent varijacije	Preciznost
1814	1814	1813,9	1814	813,51	1,69%	0,39%	$\leq 0,5\%$	2,00%
1815,7	1815,7	1818,7	1816,7	814,92	1,86%			
1815,9	1815,9	1815,8	1815,9	819,66	2,46%			
1198,9	1198,9	1198,9	1198,9	180,94	-9,53%	0,31%	$\leq 0,75\%$	-9,53%
1217,3	1217,3	1217,4	1217,3	181,5	-9,25%			
1183,1	1183,2	1183,2	1183,2	180,37	-9,82%			
1063,9	1063,9	1063,8	1063,9	41,63	-16,75%	0,55%	$\leq 5\%$	-17,26%
1067,7	1067,7	1067,6	1067,7	41,19	-17,62%			
1048	1048	1047,9	1048	41,29	-17,42%			

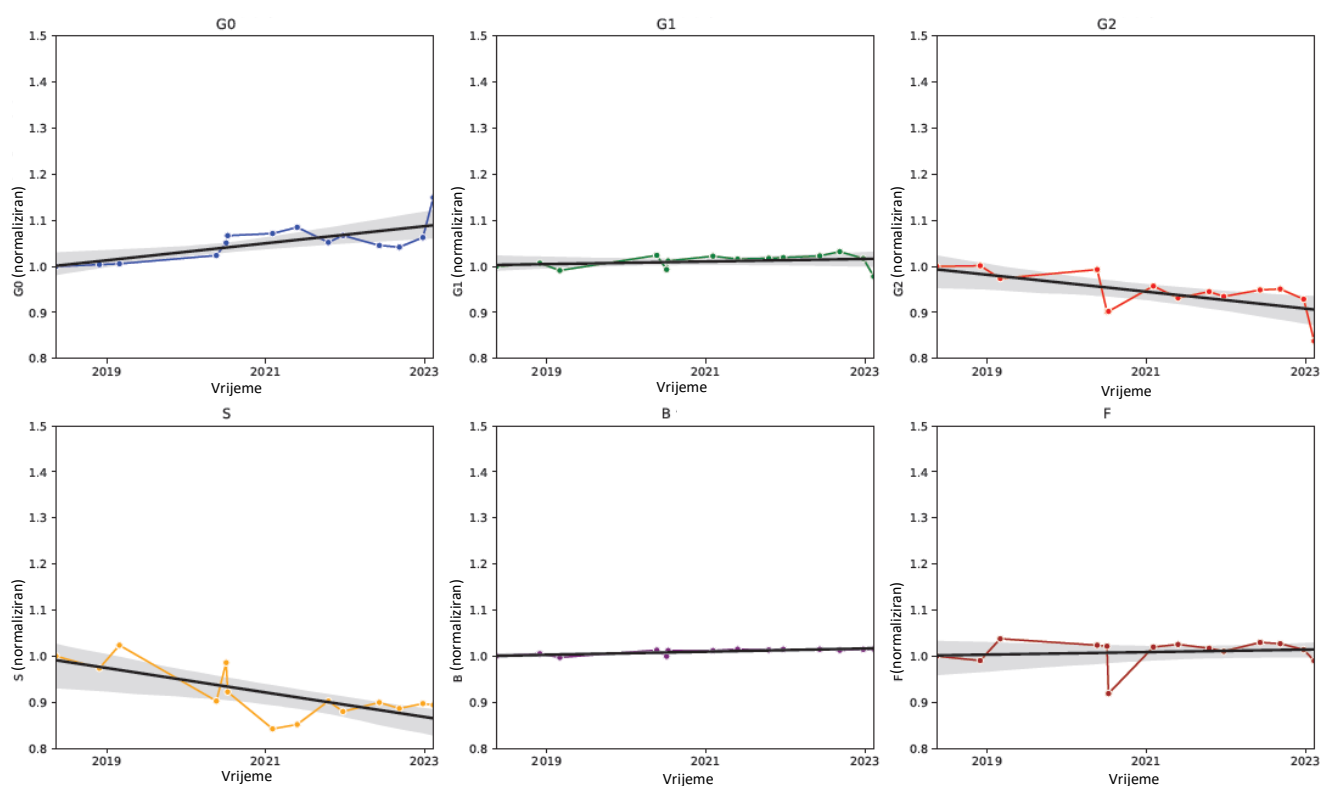


Slika 13. – Reprezentativan kromatogram N-glikoma IgG, dobiven xCGE-LIF metodom. Svakom od 28 pikova, pridružene su glavne (najzastupljenije) glikanske strukture.

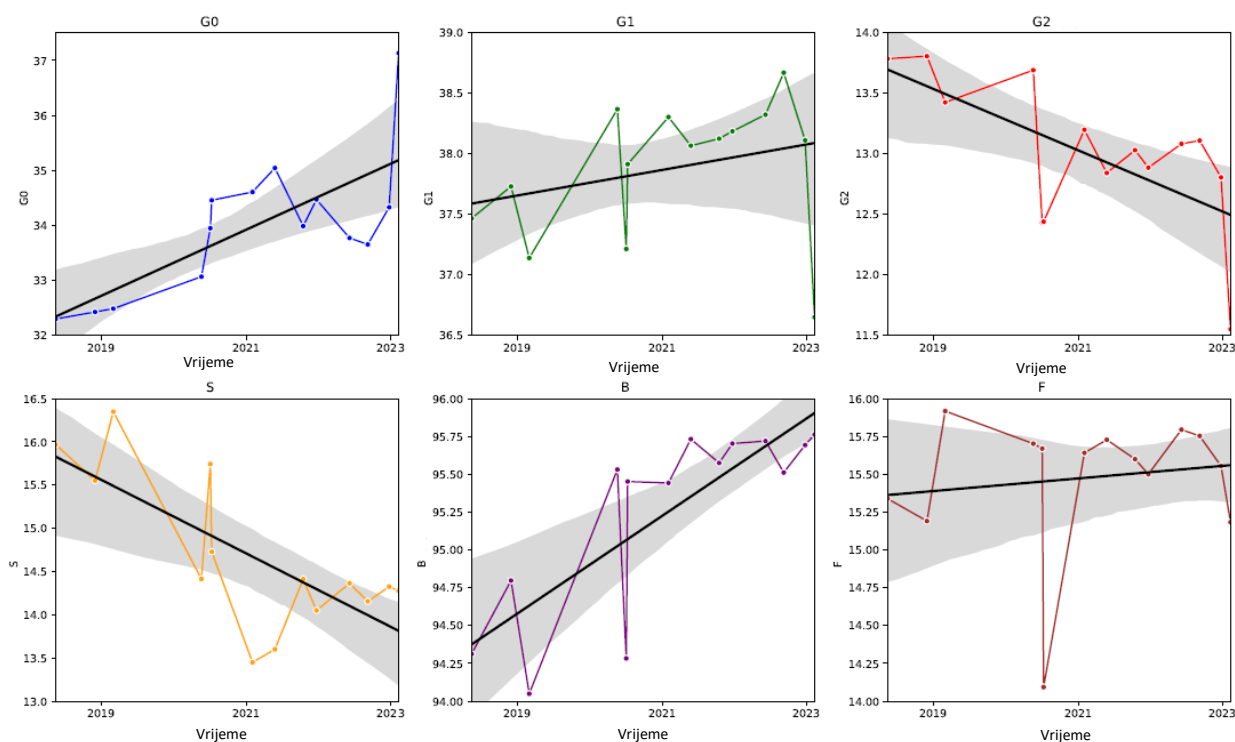
4.1. Vremenska stabilnost N-glikana IgG u razdoblju od pet godina

Tablica 9. – Promjena deriviranih svojstava u petogodišnjem vremenskom intervalu

Datum uzimanja uzorka plazme	Postotak (%) promjene deriviranih svojstava važnih za starenje			
	G0	G1	G2	S
05/2018.	100	100	100	100
11/2018.	+0,39	+0,70	+0,15	-2,62
03/2019.	+0,58	-0,87	-2,61	2,36
05/2020.	+2,38	+2,41	-0,68	-9,74
07/2020.	+5,89	+0,26	-9,79	-4,59
02/2021.	+7,14	+2,23	-4,26	-15,78
05/2021.	+8,49	+1,30	-6,84	-14,83
10/2021.	+5,23	+1,76	-5,48	-9,76
12/2021.	+6,72	+1,92	-6,53	-12,02
06/2022.	+4,56	+2,29	-5,09	-10,06
09/2022.	+4,19	+3,21	-4,90	-11,36
12/2022.	+6,28	+1,72	-7,11	-10,29
02/2023.	+14,96	-2,18	-16,19	-10,59



Slika 14a. – Ovisnost normalizirane promjene deriviranih svojstava u vremenu od 5 godina (crvena središnja linija pokazuje regresijsku liniju, a sivo osjenčani dio interval pouzdanosti)



Slika 14b. – Ovisnost nenormalizirane promjene deriviranih svojstava u vremenu od 5 godina

Na nenormaliziranom se grafu puno bolje uočavaju vrijednosti ukupne promjene izračunatih deriviranih svojstava. Naime, trend je na oba grafa (**14a.** i **14b.**) jasno vidljiv. Poznato je kako se starenjem smanjuje sijalinizacija, odnosno, gube se sijalinske kiseline iz strukture glikana, a u isto vrijeme se povećava G0 derivirano svojstvo koje označava degalaktozilaciju, odnosno, smanjenje galaktozilacije glikana (Clerc i sur., 2016; Gudelj i sur., 2018a; Lauc i sur., 2016, 2010). Također, za derivirano svojstvo B je poznato kako starenjem raste te je uključen u normalan proces starenja (Ruhaak i sur., 2010). Iz **Tablice 9.** jasno je čitljivo kako se u periodu od pet godina G0 derivirano svojstvo povećalo za gotovo 15% (nagib pravca regresije je $1,64 \times 10^{-3}$), dok je derivirano svojstvo S palo za otprilike 10,5% i ima negativni nagib pravca regresije koji iznosi $-1,16 \times 10^{-3}$. G1 i F derivirana svojstva se ne mijenjaju, odnosno, monogalaktozilirani i sržno fukozilirani glikani uglavnom ostaju nepromijenjeni u razdoblju od pet godina.

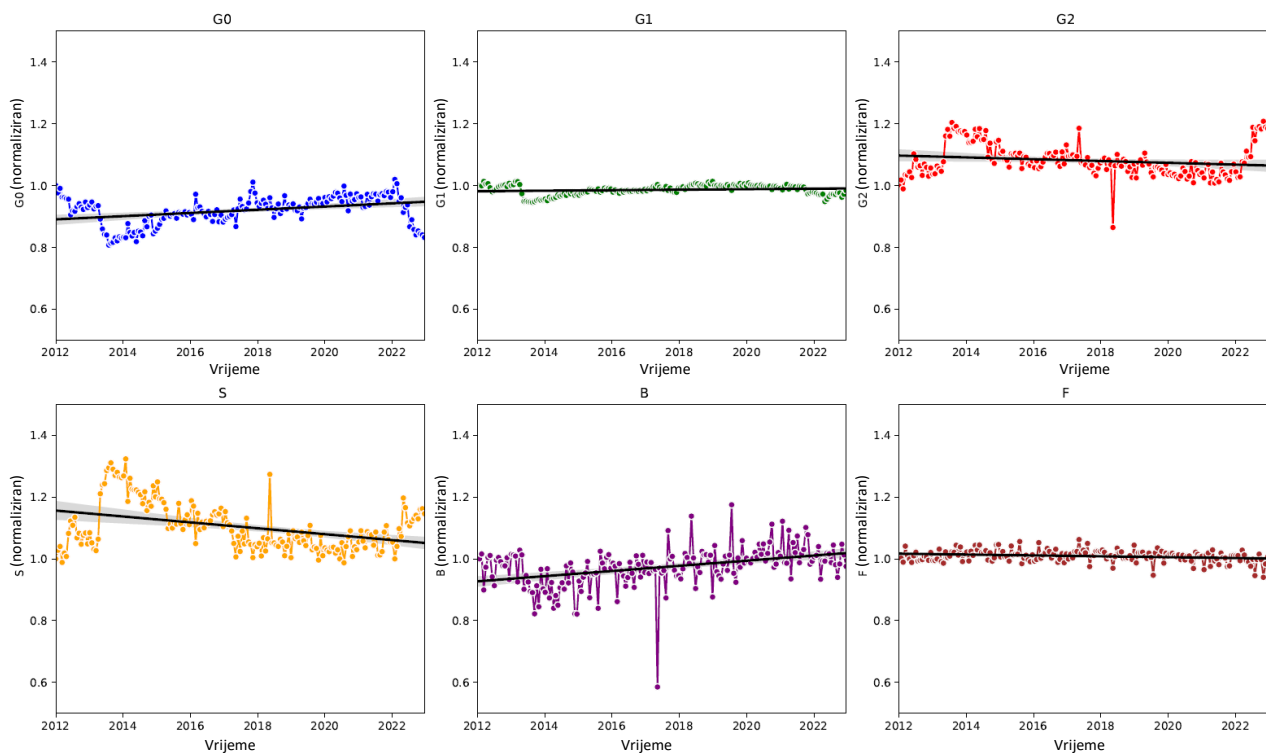
Na grafu **14a.** i **14b.** vidljiva su i neka značajnija odstupanja od trenda što se može objasniti stanjem organizma u tom trenutku pošto, kao što je već rečeno, glikani izrazito ovise o načinu života pojedinca i daju dobar otisak trenutačnog stanja organizma. Najviše odstupanja vidljivo je između 2020. i 2021. godine što je, najvjerojatnije, rezultat zaraza ili prebolijevanja

COVID-19 bolesti. Također, značajan pad galaktozilacije u 2023. godini može biti rezultat stresa i vanjskih čimbenika, poput okoliša na osobu.

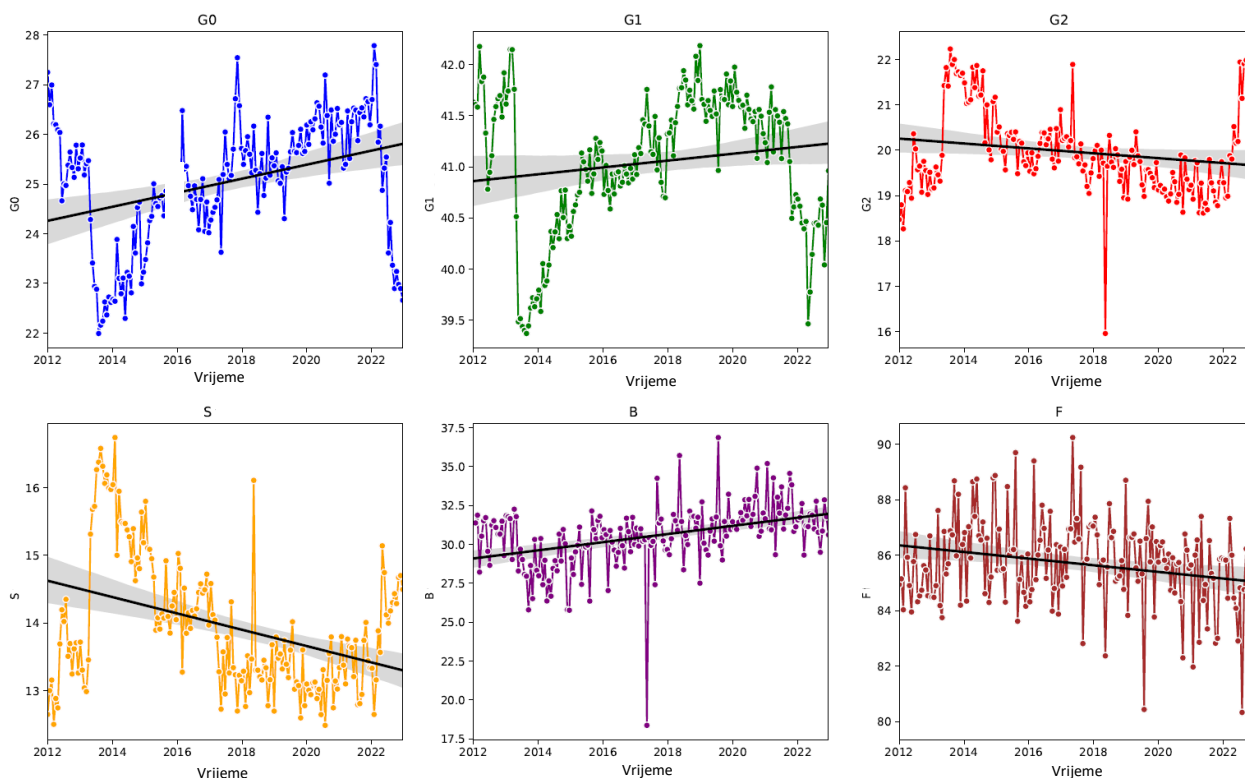
Odstupanja do 15% su normalna i očekivana u razdoblju od više godina, a koja su posljedica same biologije i načina života pojedine osobe. N-glikom je izrazito vividan i responsivan te je činjenica, da ima mogućnost alternacije u tako širokom intervalu, a da se još smatra normalnim, fascinantna. Samo za primjer, promjena se od 15% u genomu smatra fatalnom i ima detrimentalne posljedice. Takve ekstenzivne genomske promjene mogu dovesti do različitih genetičkih promjena, bolesti i karcinoma, pošto karcinom često pokazuje veliku promjenu u genomu (Sadikovic i sur., 2008). Naravno, sve ovisi u kojim se genskim regijama promjena događa, ali činjenica da genom nije ni približno toliko fleksibilan i adaptibilan kao glikom, stavlja istraživanje glikoma u vodeću poziciju za razvitak prediktivnih biomarkera.

4.2. Vremenska stabilnost N-glikana IgG u razdoblju od deset godina

Uzorci koji su uzimani u razdoblju od deset godina uzeti su otprilike svaka tri tjedna. Tako da je bilo 174 točke uzimanja, a kako bi pojednostavnili prikazivanje na grafu podijelili smo ih ravnomjerno kroz 10 godina. Također, poznato nam je da je osoba u desetogodišnjem periodu izvršila dvije intervencije kako bi si smanjila biološku dob, međutim, kako je to napravila nije nam poznato.



Slika 15a. – Ovisnost normalizirane promjene deriviranih svojstava u vremenu od 10 godina (crvena središnja linija pokazuje regresijsku liniju, a sivo osjenčani dio interval pouzdanosti)



Slika 15b.– Ovisnost nenormalizirane promjene deriviranih svojstava u vremenu od 10 godina

Trend se na oba grafa (**15a.** i **15b.**) jasno uočava. G0 derivirano svojstvo, odnosno, degalaktozilacija je u rastućem trendu s pozitivnim nagibom pravca regresije od $1,42 \times 10^{-5}$, dok je S derivirano svojstvo u padajućem trendu (nagib pravca regresije je $-2,62 \times 10^{-5}$) što je očekivano i normalno za starenje. G1 i F derivirana svojstva, u razdoblju od deset godina, ostaju nepromijenjena što se lijepo primjećuje na normaliziranom grafu (**Slika 15a.**). G2, odnosno, digalaktozilacija se postepeno smanjuje, tj. opada u razdoblju od deset godina.

Također, kao što je već spomenuto osoba je izvršila dvije intervencije koje su najbolje vidljive na nenormaliziranim grafovima (**Slika 15b.**) negdje krajem 2013. i početkom 2022. godine. Naime, nije poznato o kakvim se intervencijama radi, međutim, poznato je da promjene u načinu života uvelike utječu na našu glikansku dob. Prestanak pušenja, gubitak težine, redukcija stresa, poboljšana ishrana, veća kvaliteta sna značajno doprinose smanjenju glikanske dobi (Greto i sur., 2021; Knežević i sur., 2010). Zbog nekih se od navedenih intervencija vide drastične promjene na grafovima poput smanjenja degalaktozilacije (smanjenje G0) i povećanja sijalinizacije (povećanje S), međutim, trend ostaje isti kao i u petogodišnjem praćenju. Vidljiva su i malo veća odstupanja u povećanju G0 i smanjenju S deriviranih svojstava u periodu između 2019. i 2021. što je vjerojatno posljedica preboljenja i zaraza COVID-19 kao i kod

petogodišnjeg praćenja. B derivirano svojstvo je u blagom porastu što je očekivano i normalno za starenje jer je poznato kako osoba starenjem ima više račvajućih N-acetilglukoamina (Ruhaak i sur., 2010).

Trend se u petogodišnjem kao i u desetogodišnjem periodu nije promijenio te je povezan za normalnim procesom starenja dok su određeni periodi praćeni smanjenjem ili povećanjem određenog deriviranog svojstva, a koja su pak rezultat intervencija ili samog načina života osobe. Kao što je već spomenuto, drastične se promjene vide nakon intervencija što samo još dodatno potvrđuje koliko je naš N-glikom responsivan i koliko brzo može odgovoriti na određene promjene u organizmu i okolišu u kojem se isti nalazi.

5. Zaključci

U ovom su istraživačkom radu prikazane vremenske stabilnosti N-glikoma IgG izoliranog iz krvne plazme automatiziranom metodom kroz pet, odnosno, deset godina za dvojicu zdravih muškaraca. Na temelju se dobivenih rezultata može zaključiti sljedeće:

- 1) N-glikom IgG je, unatoč velikoj responsivnosti na male promjene u načinu života osobe ili stanju organizma, izrazito stabilan tijekom petogodišnjeg, odnosno, desetogodišnjeg razdoblja. Očekivano je da će se s godinama dogoditi normalne promjene u deriviranim svojstvima poput, smanjenja sijalinizacije (S) i povećanja degalaktozilacije (G0). Međutim, G1 i F derivirana svojstva tijekom deset godina ostaju nepromijenjena što ukazuje na izrazitu stabilnost N-glikoma IgG tijekom dužeg vremenskog perioda pohrane. Za B derivirano svojstvo je poznato da je ono starenjem normalno u porastu, a što smo i mi pokazali našim istraživanjem.
- 2) N-glikom IgG pokazuje izrazitu stabilnost i otpornost u vremenskom periodu od deset godina što znači da se uzorci plazme stari toliko dugo pouzdano mogu koristiti za daljnja biološka istraživanja jer smo i mi radili s takvim uzorcima i dobili očekivane rezultate.
- 3) Uočena stabilnost N-glikoma IgG upućuje na preciznu i konstantnu genetsku kontrolu procesa glikozilacije, dok su moguće promjene u glikozilaciji odraz okolišnih faktora i patofizioloških procesa koji se događaju u pozadini u organizmu.
- 4) Zbog velike adaptibilnosti N-glikoma IgG na procese u organizmu i oko njega, njihova analiza može igrati veliku ulogu u prediktivnoj i personaliziranoj medicini te mogu poslužiti kao prognostički i dijagnostički biomarkeri jer je ovim radom pokazano kako se uzorci mogu zamrznuti i čuvati i do deset godina te na njima opetovano raditi ispitivanja. To omogućuje retroaktivni uvid u promjene glikana tijekom vremena kako glikomika bude dalje napredovala.

6. Literatura

- 3500 Genetic Analyzer for Human, 2022., <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4406017> (pristupljeno 11.4.2023).
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai. Stanična i molekularna imunologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 65-68
- Aebi, M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833, 2430–2437
- Anderson, C.E., Huynh, T., Gasperino, D.J., Alonzo, L.F., Cantera, J.L., Harston, S.P., Hsieh, H. V., Marzan, R., McGuire, S.K., Williford, J.R., Oncina, C.I., Glukhova, V.A., Bishop, J.D., Cate, D.M., Grant, B.D., Nichols, K.P., Weigl, B.H. Automated liquid handling robot for rapid lateral flow assay development. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414, 2607–2618.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1, 845–867.
- Anumula, K.R. Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J Immunol Methods*, 2012, 382.
- Bigge, J.C., Patel, T.P., Bruce, J.A., Goulding, P.N., Charles, S.M., Parekh, R.B. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem*, 1995, 230, 229–238.
- Björck, L., Kronvall, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology*, 1984, 133.
- Bondt, A., Rombouts, Y., Selman, M.H.J., Hensbergen, P.J., Reiding, K.R., Hazes, J.M.W., Dolhain, R.J.E.M., Wuhrer, M. Immunoglobulin G (IgG) fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2014, 13.
- Clerc, F., Reiding, K.R., Jansen, B.C., Kammeijer, G.S.M., Bondt, A., Wuhrer, M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*, 2016, 33, 309–343.
- Cooper GM, Hausman RE. Stanica - Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 324-328.
- Cox TM, Sinclair J. Molekularna biologija u medicini. Zagreb, Medicinska naklada, 2000, str. 68-72.
- Cummings, R.D., Etzler, M.E. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. *Essentials of Glycobiology*, 2009.
- Gebrehiwot, A.G., Melka, D.S., Kassaye, Y.M., Gemechu, T., Lako, W., Hinou, H., Nishimura, S.I. Exploring serum and immunoglobulin G N-glycome as diagnostic biomarkers for early detection of breast cancer in Ethiopian women. *BMC Cancer*, 2019, 19, 1–18.
- Glycan Labeling, 2020., <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-labeling-and-modification/glycan-labeling> (pristupljeno 15.4.2023).
- Goetz, L.H., Schork, N.J. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertility and Sterility*, 2018.
- Gornik, O., Pavić, T., Lauc, G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins — Implications on evolution and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, 1820

- Greto, V.L., Cvetko, A., Štambuk, T., Dempster, N.J., Domagoj Kifer, Deriš, H., Cindrić, A., Vučković, F., Falchi, M., Richard, Gillies, S., Tomlinson, J.W., Gornik, O., Sgromo, B., Spector, T.D., Menni, C., Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C. V, Lauc, Gordan, Lauc, G., Hr, G. Bariatric Surgery Extensive weight loss reduces glycan age by altering IgG N-glycosylation. *International Journal of Obesity*, 2021, 45, 1521–1531.
- Groth, P., Cox, J. Indicators for the use of robotic labs in basic biomedical research: A literature analysis. *Peer Journal*, 2017, e3997.
- Gudelj, I., Lauc, G., Pezer, M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology*, 2018, 333, 65–79.
- Gudixsen, K.L., Gitlin, I., Whitesides, G.M. Differentiation of proteins based on characteristic patterns of association and denaturation in solutions of SDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103.
- Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek R. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240, 210–226.
- Hanić, M., Lauc, G., Trbojević-Akmačić, I. N-Glycan Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gel Electrophoresis with Fluorescent Labeling. *Current Protocols in Protein Science* 97, 2019, e95.
- Hendel, J.L., Gardner, R.A., Spencer, D.I.R. Automation of Immunoglobulin Glycosylation Analysis. *Exp Suppl*, 2021, 112, 173–204.
- Higai, K., Aoki, Y., Azuma, Y., Matsumoto, K. Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2005, 1725.
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., Friess, W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 414, 2607–2618.
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., Friess, W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 100, 94–100.
- Huhn, C., Selman, M.H.J., Ruhaak, L.R., Deelder, A.M., Wuhrer, M. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 2009, 9, 882–913.
- IUPAC - glycans (G02645), 2021., <https://goldbook.iupac.org/terms/view/G02645> (pristupljeno 7.3.2023).
- Jefferis, R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog*, 2005, 21, 11–16.
- Justiz Vaillant AA, Jamal Z, Ramphul K. Immunoglobulin. *StatPearls Publishing*, 2021, 6, 1–14.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., Ravetch, J. V., 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 2006, 313.
- Karsten, C.M., Pandey, M.K., Figge, J., Kilchenstein, R., Taylor, P.R., Rosas, M., McDonald, J.U., Orr, S.J., Berger, M., Petzold, D., Blanchard, V., Winkler, A., Hess, C., Reid, D.M., Majoul, I. V., Strait, R.T., Harris, N.L., Köhl, G., Wex, E., Ludwig, R., Zillikens, D., Nimmerjahn, F., Finkelman, F.D., Brown, G.D., Ehlers, M., Köhl, J. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc γ RIIB and dectin-1. *Nature Medicine*, 2012, 18.

- Khoury, G.A., Baliban, R.C., Floudas, C.A. Proteome-wide post-translational modification statistics: Frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep*, 2011, 1, 1–14.
- Khoury, G.A., Baliban, R.C., Floudas, C.A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*, 2011, 1, 1–5.
- Knežević, A., Gornik, O., Polašek, O., Pučić, M., Redžić, I., Novokmet, M., Rudd, P.M., Wright, A.F., Campbell, H., Rudan, I., Lauc, G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology* 2010, 26, 684–692.
- Knežević, A., Gornik, O., Polašek, O., Pučić, M., Redžić, I., Novokmet, M., Rudd, P.M., Wright, A.F., Campbell, H., Rudan, I., Lauc, G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*, 2010, 959–969.
- Lauc, G., Essafi, A., Huffman, J.E., Hayward, C., Knežević, A., Kattla, J.J., Polašek, O., Gornik, O., Vitart, V., Abrahams, J.L., Pučić, M., Novokmet, M., Redžić, I., Campbell, S., Wild, S.H., Borovečki, F., Wang, W., Kolčić, I., Zgaga, L., Gyllensten, U., Wilson, J.F., Wright, A.F., Hastie, N.D., Campbell, H., Rudd, P.M., Rudan, I. Genomics Meets Glycomics—The First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1 α as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation. *PLoS Genet*, 2010, 6, 1–14.
- Lauc, G., Krištić, J., Zoldoš, V. Glycans - the third revolution in evolution. *Front Genet*, 2014, 5.
- Lauc, G., Pezer, M., Rudan, I., Campbell, H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860, 1574–1582.
- Lin, C.W., Tsai, M.H., Li, S.T., Tsai, T.I., Chu, K.C., Liu, Y.C., Lai, M.Y., Wu, Chia Yu, Tseng, Y.C., Shivatare, S.S., Wang, C.H., Chao, P., Wang, S.Y., Shih, H.W., Zeng, Y.F., You, T.H., Liao, J.Y., Tu, Y.C., Lin, Y.S., Chuang, H.Y., Chen, C.L., Tsai, C.S., Huang, C.C., Lin, N.H., Ma, C., Wu, Chung Yi, Wong, C.H. A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112.
- Liu, L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci*, 2015, 346–366.
- Marek, K.W., Vijay, I.K., Marth, J.D. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*, 1999, 9.
- Mehta, A., Norton, P., Liang, H., Comunale, M.A., Wang, M., Rodemich-Betesh, L., Koszycki, A., Noda, K., Miyoshi, E., Block, T. Increased levels of tetra-antennary N-linked glycan but not core fucosylation are associated with hepatocellular carcinoma tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21, 925–933.
- O’Flaherty, R., Muniyappa, M., Walsh, I., Stöckmann, H., Hilliard, M., Hutson, R., Saldova, R., Rudd, P.M. A robust and versatile automated glycoanalytical technology for serum antibodies and acute phase proteins: Ovarian cancer case study. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2019, 18, 2191–2206.
- Park, S.H., Hong, H., Han, Y.M., Kangwan, N., Kim, S.J., Kim, E.H., Hahm, K.B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) sparing effects of glucosamine hydrochloride through n-glycosylation inhibition; Strategy to rescue stomach from nsaid damage. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2013, 64.
- PNGase F - Creative Enzymes, 2019., https://www.creative-enzymes.com/similar/pngase-f_583.html (pristupljeno 9.4.2023).

- Pučić, M., Mužinić, A., Novokmet, M., Škledar, M., Pivac, N., Lauc, G., Gornik, O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology*, 2012, 22.
- Reed, C.E., Fournier, J., Vamvoukas, N., Koza, S.M., 2018. Automated Preparation of MS-Sensitive Fluorescently Labeled N-Glycans with a Commercial Pipetting Robot. *SLAS Technol*, 2018, 23, 550–559.
- Reily, C., Stewart, T.J., Renfrow, M.B., Novak, J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15, 346–366.
- Ruhaak, L. Renee, Hennig, R., Huhn, C., Borowiak, M., Dolhain, R.J.E.M., Deelder, A.M., Rapp, E., Wuhrer, M. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF. *J Proteome Res*, 2010, 9.
- Ruhaak, L. R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A.M., Wuhrer, M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 3457–3481.
- Sadikovic, B., Al-Romaih, K., Squire, J., Zielenska, M. Cause and Consequences of Genetic and Epigenetic Alterations in Human Cancer. *Curr Genomics*, 2008, 9, 394.
- Saldova, R., Asadi Shehni, A., Haakensen, V.D., Steinfeld, I., Hilliard, M., Kifer, I., Helland, Å., Yakhini, Z., Børresen-Dale, A.L., Rudd, P.M. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res*, 2014, 13.
- Saldova, R., Fan, Y., Fitzpatrick, J.M., Watson, R.W.G., Rudd, P.M. Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. *Glycobiology*, 2011, 21, 195–205.
- Saldova, R., Huffman, J.E., Adamczyk, B., Mužinić, A., Kattla, J.J., Pučić, M., Novokmet, M., Abrahams, J.L., Hayward, C., Rudan, I., Wild, S.H., Wright, A.F., Polašek, O., Lauc, G., Campbell, H., Wilson, J.F., Rudd, P.M. Association of medication with the human plasma N-glycome. *J Proteome Res*, 2012, 11, 1821–1831.
- Sanyal, S., Menon, A.K. Specific transbilayer translocation of dolichol-linked oligosaccharides by an endoplasmic reticulum flippase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 767–772.
- Shubhakar, A., Pang, P.C., Fernandes, D.L., Dell, A., Spencer, D.I.R., Haslam, S.M. Towards automation of glycomic profiling of complex biological materials. *Glycoconj J*, 2018, 35, 311–321.
- Smith, K.G.C., Clatworthy, M.R. FcγRIIB in autoimmunity and infection: Evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol*, 2010, 26, 684–692.
- Stöckmann, H., Adamczyk, B., Hayes, J., Rudd, P.M. Automated, high-throughput IgG-antibody glycoprofiling platform. *Anal Chem*, 2013, 85, 8841–8849.
- Szabo, Z., Guttman, A., Rejtar, T., Karger, B.L. Improved sample preparation method for glycan analysis of glycoproteins by CE-LIF and CE-MS. *Electrophoresis*, 2010, 31.
- Szeeci, P.B., Ødum, L. Error tracking in a clinical biochemistry laboratory. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47, 1253–1257.
- Szigeti, M., Lew, C., Roby, K., Guttman, A. Fully Automated Sample Preparation for Ultrafast N-Glycosylation Analysis of Antibody Therapeutics. *J Lab Autom*, 2016, 21, 281–286.
- Trbojević-Akmačić, I., Ugrina, I., Lauc, G. Comparative Analysis and Validation of Different Steps in Glycomics Studies. *Methods Enzymol*, 2017, 586, 37–55.

- Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 1993, 3, 97–130.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022, str. 85-100, 520-586
- Wang, T., Cai, Z.P., Gu, X.Q., Ma, H.Y., Du, Y.M., Huang, K., Voglmeir, J., Liu, L. Discovery and characterization of a novel extremely acidic bacterial N-glycanase with combined advantages of PNGase F and A. *Biosci Rep*, 2014, 34.
- Wilson IB, Zeleny R, Kolarich D. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core alpha1,3-linked fucose and xylose substitutions. *Glycobiology*, 2001, 261–274.
- Zauner G, Selman MH, Deelder AM, Wuhrer M. Protein glycosylation analysis by HILIC-LC-MS of Proteinase K-generated N-and O-glycopeptides. *J Sep Sci*, 2010, 26, 684–692.
- Zhang, S., Shang, S., Li, W., Qin, X., Liu, Y. Insights on N-glycosylation of human haptoglobin and its association with cancers. *Glycobiology*, 2016, 26, 684–692.

7. Sažetak

Glikan je kompleksan spoj sastavljen od velikog broja monosaharida povezanih glikozidnim vezama, a koji biomolekule dobivaju procesom glikozilacije. Termin se glikan često koristi za opisivanje ugljikohidratnog dijela glikokonjugata. Najčešći monosaharidi u glikokonjugatima su Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc, Man, Fuc, Xyl i Sia. Glikom se odnosi na cjelokupan repertoar glikanskih struktura unutar organizma, stanice ili tkiva u određenom vremenu i uvjetima. Stoga, N-glikom IgG podrazumijeva cijeloukupni spektar glikana koji se mogu pronaći na IgG. Glikani su specifično vezani za pojedinca te nisu zapisani u genomu i podliježu utjecaju epigenetike, prehrane i trenutnog stanja pojedinca. Analiza glikoma može pružiti uvid u trenutno zdravstveno stanje i personalizirati terapiju zbog čega su glikani vrijedni prediktivni biomarkeri. Kako bi mogli poslužiti za takvo što moramo biti sigurni da je N-glikom IgG stabilan u određenom vremenskom periodu, a pošto su strukture glikana jako osjetljive na male promjene korisno je i praktično stvoriti automatizirani pristup prilikom izolacije glikana, što su i ciljevi ovog istraživačkog rada.

U ispitivanju su prisustvovali dvojica zdravih muškaraca kojima su uzimani uzorci krvi u periodu od pet, odnosno, deset godina. Uzorci u razdoblju od pet godina uzimani su svaka tri mjeseca, dok su uzorci u razdoblju od deset godina uzimani svaka tri tjedna. Krv je uzeta na antikoagulans (EDTA) i centrifugirana čime je odvojena plazma iz koje je, uz pomoć pločice monolita s proteinom G automatiziranom metodom koristeći Tecan Freedom EVO sustav i robotiku, izoliran IgG. N-glikani oslobođeni su PNGaza F i fluorescentno obilježeni APTS nakon čega su analizirani xCGE-LIF metodom. Izračunata su četiri derivirana svojstva (S, G1, G2 i G0) jer je pokazano kako upravo ona igraju ključnu ulogu u starenju. Također, izračunata su i dva derivirana svojstva F i B koja doprinose uvidu u stabilnost glikana tijekom godina.

Analizom je podataka uočeno kako N-glikom IgG pokazuje vrlo dobru stabilnost u vremenskom periodu od deset godina što znači da se uzorci plazme stari do deset godina pouzdano mogu koristiti za daljnja biološka istraživanja. Trend starenja prati smanjenje sijalinizacije (S) i povećanje degalaktozilacije (G0), uz nepromijenjenu sržnu fukoziaciju (F) i monogalaktoziaciju (G1), a odstupanja ukazuju na trenutna stanja i promjene u organizmu i oko njega.

8. Summary

A glycan is a complex compound consisting of a large number of monosaccharides linked by glycosidic bonds that biomolecules obtain through the process of glycosylation. The term "glycan" is often used to describe the carbohydrate portion of glycoconjugates. The most common monosaccharides in glycoconjugates include Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc, Man, Fuc, Xyl, and Sia. Glycome refers to the total repertoire of glycan structures in an organism, cell, or tissue at a particular time and under particular conditions. Therefore, the N-glycome of IgG refers to the entire spectrum of glycans that can be found in IgG. Glycans are individually specific, not encoded in the genome, and are subject to the influence of epigenetics, diet, and the current state of the individual. Analysis of glycans can provide information about current health status and personalize therapy, making glycans valuable predictive biomarkers. To fulfill this purpose, it is essential to ensure that the N-glycome of IgG remains stable over a specific time period and understand how it changes with aging. Due to the sensitivity of glycan structures to minor changes, it is useful and practical to develop an automated approach for glycan isolation, which is the objective of this research study.

The study involved two healthy male participants from whom blood samples were collected over a period of five and ten years. During the five-year period, samples were collected every three months, while during the ten-year period, samples were collected every three weeks. Blood was collected using an anticoagulant (EDTA) and centrifuged to separate plasma. IgG was then isolated from the plasma using an automated method with a protein G monolith plate, utilizing the Tecan Freedom EVO system and robotics. N-glycans were released by PNGase F and fluorescently labeled with APTS before being analyzed using the xCGE-LIF method. Four derived traits (S, G1, G2, and G0) were calculated as they have been shown to play a crucial role in aging. Additionally, two derived traits, F and B, were calculated to provide insights into the stability of glycans over the years.

Data analysis revealed that the N-glycome of IgG exhibits excellent stability over a ten-year period, indicating that plasma samples aged up to ten years can reliably be used for further biological research. The aging trend is characterized by decreased sialylation (S) and increased degalactosylation (G0), with unchanged core fucosylation (F) and monogalactosylation (G1). At the same time, deviations indicate current states and changes in the organism and its environment.

9. Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Dugovječnost i glikozilacija IgG: Studija stabilnosti N-glikana tijekom desetljeća

Jakov Vuk

SAŽETAK

Glikan je kompleksan spoj sastavljen od velikog broja monosaharida povezanih glikozidnim vezama, a koji biomolekule dobivaju procesom glikozilacije. Termin se glikan često koristi za opisivanje ugljikohidratnog dijela glikokonjugata. Najčešći monosaharidi u glikokonjugatima su Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc, Man, Fuc, Xyl i Sia. Glikom se odnosi na cjelokupan repertoar glikanskih struktura unutar organizma, stanice ili tkiva u određenom vremenu i uvjetima. Stoga, N-glikom IgG podrazumijeva cijeloukupni spektar glikana koji se mogu pronaći na IgG. Glikani su specifično vezani za pojedinca te nisu zapisani u genomu i podliježu utjecaju epigenetike, prehrane i trenutnog stanja pojedinca. Analiza glikoma može pružiti uvid u trenutno zdravstveno stanje i personalizirati terapiju zbog čega su glikani vrijedni prediktivni biomarkeri. Kako bi mogli poslužiti za takvo što moramo biti sigurni da je N-glikom IgG stabilan u određenom vremenskom periodu, a pošto su strukture glikana jako osjetljive na male promjene korisno je i praktično stvoriti automatizirani pristup prilikom izolacije glikana, što su i ciljevi ovog istraživačkog rada.

U ispitivanju su prisustvovali dvojica zdravih muškaraca kojima su uzimani uzorci krvi u periodu od pet, odnosno, deset godina. Uzorci u razdoblju od pet godina uzimani su svaka tri mjeseca, dok su uzorci u razdoblju od deset godina uzimani svaka tri tjedna. Krv je uzeta na antikoagulans (EDTA) i centrifugirana čime je odvojena plazma iz koje je, uz pomoć pločice monolita s proteinom G automatiziranom metodom koristeći Tecan Freedom EVO sustav i robotiku, izoliran IgG. N-glikani oslobođeni su PNGaza F i fluorescentno obilježeni APTS nakon čega su analizirani xCGE-LIF metodom. Izračunata su četiri derivirana svojstva (S, G1, G2 i G0) jer je pokazano kako upravo ona igraju ključnu ulogu u starenju. Također, izračunata su i dva derivirana svojstva F i B koja doprinose uvidu u stabilnost glikana tijekom godina.

Analizom je podataka uočeno kako N-glikom IgG pokazuje vrlo dobru stabilnost u vremenskom periodu od deset godina što znači da se uzorci plazme stari do deset godina pouzdano mogu koristiti za daljnja biološka istraživanja. Trend starenja prati smanjenje sijalinizacije (S) i povećanje degalaktozilacije (G0), uz nepromijenjenu sržnu fukoizilaciju (F) i monogalaktozilaciju (G1), a odstupanja ukazuju na trenutna stanja i promjene u organizmu i oko njega.

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

- Rad sadrži: 60 stranica, 15 grafičkih prikaza, 9 tablice i 70 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: glikan, N-glikom IgG, derivirana svojstva, starenje
- Mentor: **Prof. dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
- Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Lidija Bach Rojceky, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: svibanj 2023.

10. Basic documentation card

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

Diploma thesis

Longevity and IgG glycosylation: A study of N-glycan stability over a decade

Jakov Vuk

SUMMARY

A glycan is a complex compound consisting of a large number of monosaccharides linked by glycosidic bonds that biomolecules obtain through the process of glycosylation. The term "glycan" is often used to describe the carbohydrate portion of glycoconjugates. The most common monosaccharides in glycoconjugates include Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc, Man, Fuc, Xyl, and Sia. Glycome refers to the total repertoire of glycan structures in an organism, cell, or tissue at a particular time and under particular conditions. Therefore, the N-glycome of IgG refers to the entire spectrum of glycans that can be found in IgG. Glycans are individually specific, not encoded in the genome, and are subject to the influence of epigenetics, diet, and the current state of the individual. Analysis of glycans can provide information about current health status and personalize therapy, making glycans valuable predictive biomarkers. To fulfill this purpose, it is essential to ensure that the N-glycome of IgG remains stable over a specific time period and understand how it changes with aging. Due to the sensitivity of glycan structures to minor changes, it is useful and practical to develop an automated approach for glycan isolation, which is the objective of this research study.

The study involved two healthy male participants from whom blood samples were collected over a period of five and ten years. During the five-year period, samples were collected every three months, while during the ten-year period, samples were collected every three weeks. Blood was collected using an anticoagulant (EDTA) and centrifuged to separate plasma. IgG was then isolated from the plasma using an automated method with a protein G monolith plate, utilizing the Tecan Freedom EVO system and robotics. N-glycans were released by PNGase F and fluorescently labeled with APTS before being analyzed using the xCGE-LIF method. Four derived traits (S, G1, G2, and G0) were calculated as they have been shown to play a crucial role in aging. Additionally, two derived traits, F and B, were calculated to provide insights into the stability of glycans over the years.

Data analysis revealed that the N-glycome of IgG exhibits excellent stability over a ten-year period, indicating that plasma samples aged up to ten years can reliably be used for further biological research. The aging trend is characterized by decreased sialylation (S) and increased degalactosylation (G0), with unchanged core fucosylation (F) and monogalactosylation (G1). At the same time, deviations indicate current states and changes in the organism and its environment.

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

Thesis includes: 60 pages, 15 figures, 9 tables and 70 references. Original is in Croatian language.

Keywords: glycan, IgG N-glycome, derived traits, ageing

Mentor: **Gordan Lauc, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordan Lauc, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2023.