

# Utjecaj spola i dobi na C3 N-glikom

---

Žunić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:431318>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Lucija Žunić

# Utjecaj spola i dobi na C3 N-glikom

## DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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

## ZAHVALA

Zahvaljujem se dragoj mentorici na savjetima i podršci tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem i dr. sc. Dinku Šoiću na svim uputama i pomoći u pisanju rada.

Hvala mojoj obitelji koja mi uvijek pruža podršku i vjeruje u mene.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 GLIKANI KAO BILJEZI BOLESTI .....	1
1.1.1 Glikozilacija .....	1
1.1.2 Plazmatski N-glikom .....	4
1.1.3 Promjene glikozilacije u patološkim stanjima .....	5
1.1.4 N-glikozilacija plazmatskih proteina u populaciji .....	9
1.2 KOMPONENTA 3 KOMPLEMENTA (C3) KAO GLIKOPROTEIN .....	10
1.2.1 Glikanski profil C3 komponente komplementa .....	11
1.2.2 Promjene glikanskog profila C3 u patološkim stanjima .....	12
1.3 VISOKOPROTOČNA ANALIZA N-GLIKANA .....	13
1.3.1 Prednosti analize glikopeptida naspram oslobođenih glikana .....	14
1.3.2 Obogaćivanje glikoproteina iz bioloških uzoraka lektinima .....	14
1.3.3 Glikoprofiliranje spektrometrijom masa .....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	17
3. ISPITANICI, MATERIJALI, METODE .....	18
3.1 ISPITANICI .....	18
3.2 MATERIJALI .....	18
3.2.1 Kemikalije .....	18
3.2.2 Enzimi .....	19
3.2.3 Uređaji i oprema .....	19
3.2.4 Potrošni materijali .....	20
3.3 PROTOKOL PRIPREME UZORAKA .....	20
3.3.1 Obogaćivanje C3 glikoproteina .....	20
3.3.2 Denaturacija i proteoliza glikoproteina .....	21
3.3.3 Pročišćavanje glikopeptida ekstrakcijom na čvrstoj fazi .....	21
3.4 ANALIZA .....	22
3.4.1 LC-ESI-MS analiza obogaćenih glikopeptida .....	22
3.4.2 Ekstrakcija i obrada glikoproteomskih podataka .....	22
3.4.3 Statistička obrada podataka .....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1 Opis ispitivane populacije .....	24

4.2	Relativne zastupljenosti glikoformi na analiziranim glikozilacijskim mjestima.....	25
4.3	Utjecaj spola na zastupljenost ciljnih glikoformi .....	27
4.4	Utjecaj dobi na zastupljenost ciljnih glikoformi.....	30
4.5	Potencijal C3 komponente komplementa kao biljega patoloških stanja .....	31
5.	ZAKLJUČCI.....	34
6.	LITERATURA:.....	35
7.	SAŽETAK/SUMMARY .....	41
7.1	SAŽETAK.....	41
7.2	SUMMARY .....	41
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>		

## 1. UVOD

### 1.1 GLIKANI KAO BILJEZI BOLESTI

#### 1.1.1 Glikozilacija

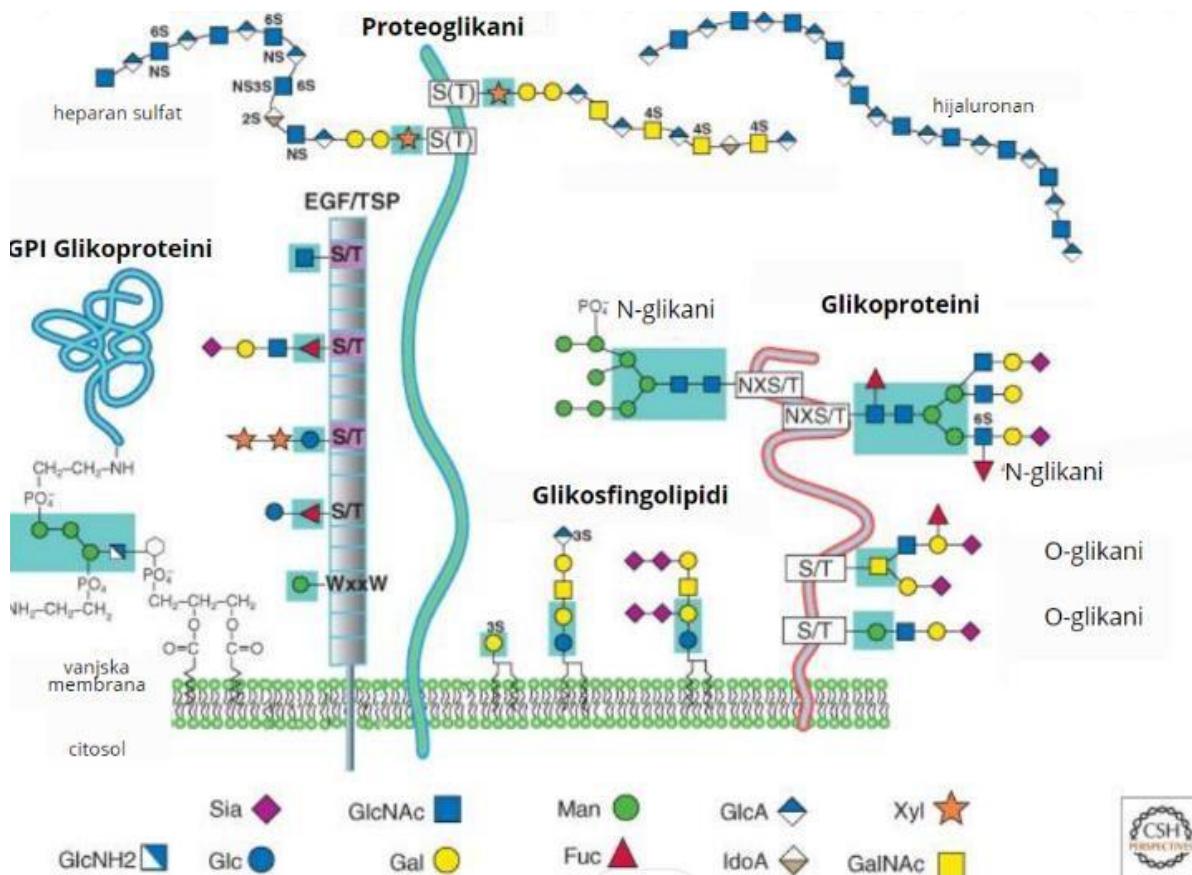
Glikozilacija je ko- i posttranslacijska modifikacija koja se odvija u endoplazmatskom retikulumu (ER) te Golgijevom aparatu (GA), a neophodna je za formaciju zrelih glikoproteina. Glikoproteini se sastoje od polipeptidnog lanca te oligosaharidnog kompleksa koji regulira smatanje, topljivost i strukturu samog proteinskog dijela (1). Glikoproteini su važan dio transmembranskog i vanstaničnog prostora jer sudjeluju u brojnim međustaničnim interakcijama, patološkim procesima te imunosnom odgovoru (2). Mnoge intrinzične i ekstrinzične strukture sadrže proteine koji vežu glikane (eng. glycan binding proteins, GBP) što omogućuje glikanima prenošenje informacija unutar stanice te čini podlogu za njihovu imunosnu ulogu (3).

Razlikujemo O- i N- tip glikozilacije. Primarna i temeljna razlika između ova dva tipa je vrsta veze između polipeptidnog lanca i glikanskog kompleksa. Kod O-glikozilacije u pitanju je O-glikozidna, esterska veza, dok je kod N-glikozilacije prisutna N-glikozidna odnosno pseudoamidna veza. Nadalje, O- i N- glikani razlikuju se i prema aminokiselini na koju je vezan oligosaharid. Kod O-glikana, C1 reducirajući kraj ugljikohidrata povezan je na hidroksiaminokiselinu serin ili treonin, dok su kod N-glikana ugljikohidrati povezani na asparagin u sekvenci Asn-X-Ser/Thr (4). Različitosti se nastavljaju i u pogledu samih oligosaharidnih kompleksa. Usporedno s proteomom, glikoproteom posjeduje mnogo veću bioraznolikost koju duguje slijedu monosaharida u glikanskom kompleksu, razgranatosti i pozicijama grananja, položajima glikozidne veze te njihovim konfiguracijama (5).

Za razliku od sinteze polipeptidnih lanaca, sinteza i slijed oligosaharidne komponente glikoproteina nije zapisana u genima. Drugim riječima, ne postoji niti jedan gen koji predodređuje finalan izgled glikana. Sinteza glikana je uvjetovana međudjelovanjem različitih proteina i polipeptida, a njihova ekspresija je pod direktnim utjecajem epigenetičkih faktora. Dakle, male promjene i mutacije u bilo kojem od proteina koji sudjeluju u sintezi oligosaharidnih lanaca čine razlike u glikoproteomu svakog pojedinca što također nazivamo glikofenotip (eng. glyco-phenotype) (6).

Glikozilacija se odvija kotranslacijski, dakle paralelno s translacijom RNA u polipeptidni lanac i to u ER-u, ali i posttranslacijski u GA-u. U samom procesu glikozilacije sudjeluju brojni enzimi

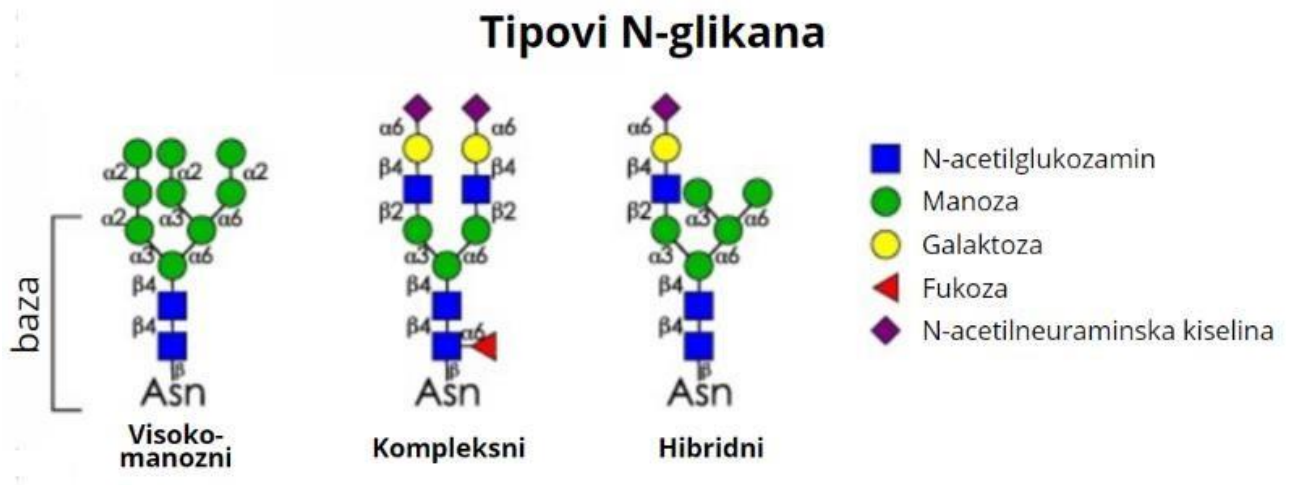
koji spadaju u skupine glikoziltransferaza i glikozidaza koje prekrajaju oligosaharidne jedinice reakcijama stvaranja glikozidnih veza te hidrolize istih, sve dok se ne oformi krajnji produkt. Proces koji se odvija u endoplazmatskom retikulumu jednak je za sve O- i N- glikane, dok prava diferencijacija započinje u Golgijevom aparatu (7).



Slika 1. Raznolikost N- i O- glikana na membranskim molekulama poput glikoproteina, proteoglikana, glikosfingolipida te usidrenih glikoproteina (glikozil-fosfatidil-inozitol, GPI). Saharidne regije u plavim pravokutnicima potječu iz endoplazmatskog retikuluma, dok je ostatak nadodan u Golgijevom aparatu. Kratice su: Man, manoz; Gal, galaktoza; Glc, glukoza; GlcNAc, N-acetilglukozamin, GlcNH<sub>2</sub> glukozamin; GlcA, glukuronska kiselina; IdoA, iduronska kiselina; GalNAc, N-acetilgalaktozamin; Xyl, ksiloza; Fuc, fukoza; Sia, sijalinska kiselina (N-acetilneuraminska kiselina); 3S, 3 O-sulfatirano; 6S, 6 O-sulfatirano; PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, fosfat. Preuzeto i prevedeno iz (8).

N-glikozilacija u endoplazmatskom retikulumu visoko je konzervirani proces koji uključuje prijenos prethodno načinjenog oligosaharida Glc3Man9GlcNAc2 s lipidnog nosača (dolikol pirofosfat) na asparaginski ostatak u polipeptidnom lancu. Ovakav oblik oligosaharida može ostati nepromijenjen te čini visokomanozni podtip N-glikana. Visokomanozni tip sadrži do 9 manoznih ostataka, te je zastupljen u vrlo niskim količinama. Daljnja prerada u Golgijevom aparatu započeta je djelovanjem  $\alpha$ -manozidaze 1 koja kida manozne ostatke te nastaje Man5GlcNAc2-Asn (7).

Visokomanozni glikan Man5GlcNAc2-Asn postaje supstrat u Golgijevom aparatu za daljnju preradu čime nastaju preostala dva tipa N-glikana, kompleksni i hibridni. Hibridni N-glikani sadrže dio manoznih ostataka, ali i supstituirani GlcNAc na koji se nadovezuju raznovrsni monosaharidni ostaci. Iz hibridnih N glikana, enzimskom reakcijom nastaju kompleksni N-glikani kod kojih je prekursorski oligosaharidni lanac izmijenjen na način da se  $\alpha$ -3 i  $\alpha$ -6 vezani manozni ostaci zamjenjuju sa GlcNAc ostacima. Većina ukupnih N-glikana pripada kompleksnom tipu (3).



Slika 2. Tri tipa N-glikana te se jasno vidi zajednička baza koja se sastoji od dva N-acetilglukozamina i tri manoze. Simboli  $\alpha$  i  $\beta$  označavaju konfiguraciju glikozidne veze. Slika je preuzeta i prevedena iz (9).

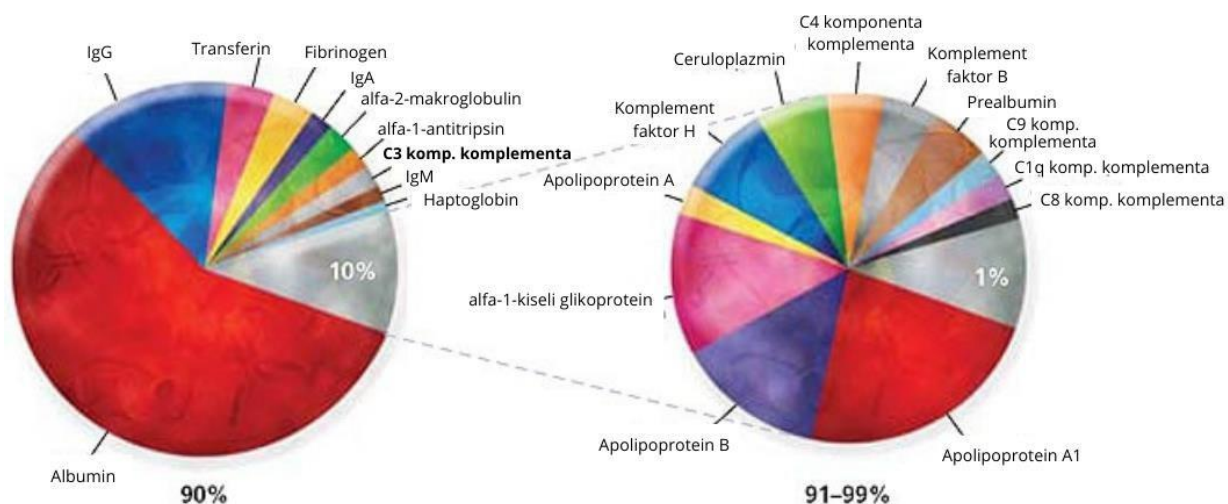
Finalni glikoproteini karakteristični su za određene biološke funkcije poput oplodnje, embrionalnog razvoja, kontrole imunskog sustava te razne patološke procese stoga bivaju eksprimirani u različitim tkivima i organima. N- glikoproteini imaju raznolike uloge u organizmu zahvaljujući upravo razlikama u strukturi podtipova (1)



### 1.1.2 Plazmatski N-glikom

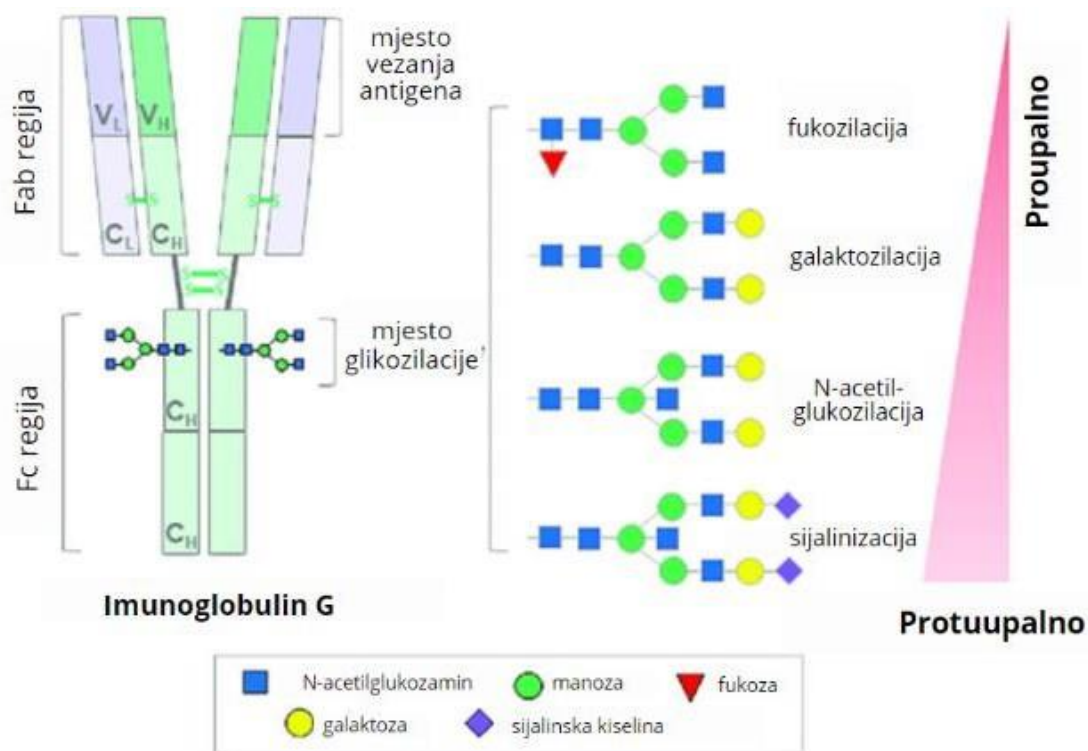
Prije same analize plazmatskog N-glikoma potrebno je razjasniti nekoliko pojmova koji će se ponavljati u ovom radu. N-glikom naziv je za skup svih N-vezanih glikana u nekom organizmu/tkivu/stanici ili čak pojedinom proteinu. Polipeptidni lanci koji sadrže N-vezane glikane su N-glikoproteini. Unutar takvih polipeptidnih lanaca postoji već spomenuti specifičan slijed aminokiselina Asn-X-Ser/Thr koji služi kao mjesto povezivanja proteinskog i glikanskog dijela. Svaki takav slijed unutar glikoproteina na koji je vezan glikanski slijed naziva se glikozilacijskim mjestom. Svako glikozilacijsko mjesto može sadržavati više različitih kombinacija monosaharida koje nazivamo njegovim glikoforomama. Svaki glikoprotein može imati na desetke različitih glikoformi čija zastupljenost ovisi o fiziološkim i patološkim stanjima. Skup svih N-glikoproteina naziva se N-glikoproteom (10).

Mnogi serumski i plazmatski proteini su N-glikozilirani. Obzirom da su istraživanja pokazala značajne promjene u N-glikomu u zdravlju i bolesti, N-glikoproteini postali su vrlo atraktivne molekule u potrazi za novim i efikasnim biljezima patoloških stanja (1).



Slika 3. Prikaz zastupljenosti pojedinih proteina u plazmi. Svi su plazmatski proteini N-glikozilirani, s najvećom prisutnošću kompleksnih i hibridnih podtipova N-glikana. Slika je preuzeta i prevedena iz (11).

Dosad, najispitivaniji N-glikoprotein bio je imunoglobulin G (IgG) upravo zbog njegove zastupljenosti u plazmi i ekstremne važnosti u brojnim upalnim, autoimunim, infektivnim i malignim bolestima.



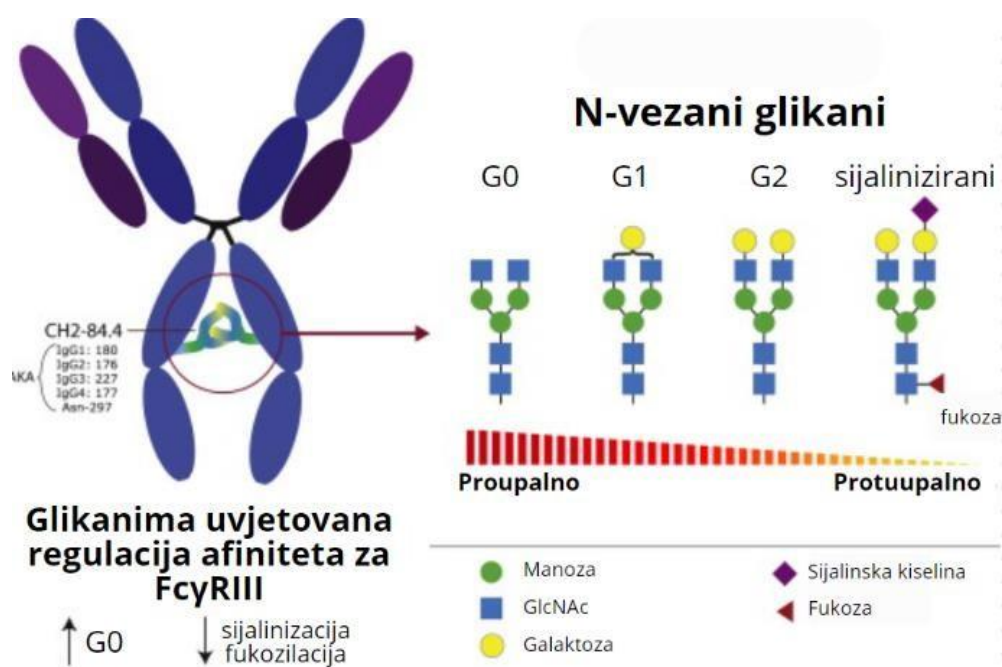
Slika 4. Prikaz glikozilacijskog mjesta na teškim lancima imunoglobulina G na koje je vezan bazni oligosaharid sastavljen od tri manoze i četiri N-acetilglukozamina. Prikazano je nekoliko mogućnosti modifikacije ovog oligosaharida, te utjecaj pojedinih glikanskih struktura na upalni proces. Slika je preuzeta i prevedena iz (12).

### 1.1.3 Promjene glikozilacije u patološkim stanjima

Mutacije gena koji kodiraju za enzime potrebne za glikozilaciju letalne su na embrionalnoj razini, stoga je patološki aspekt alterirane glikozilacije nepobitan (6). Mnogobrojne kongenitalne deficijencije, poremećaji glikozilacije, bolesti nakupljanja i mukopolisaharidoze ubrajaju se u stanja koja za uzrok imaju poremećenu glikozilaciju proteina. Međutim, u mnogim stanjima

alterirana glikozilacija nije uzrok, već posljedica drugih patoloških procesa u organizmu, te tada može biti korištena kao biljeg određenih bolesti.

Osnovni neizbježni patološki proces koji se događa u svim živim bićima, a da ima odraz na glikozilaciju je starenje. Zbog kontinuiranog cjeloživotnog izlaganja egzogenim i endogenim antigenima, molekularni glikani se mijenjaju te počinju sličiti na glikanski profil prisutan tijekom upale. Ova promjena ponajviše zahvaća glikoproteine koji sudjeluju u imunološkim procesima poput IgG-a, točnije njegovog teškog lanca. Najčešća je promjena manjak terminalne galaktoze na N-glikanima u sklopu teških lanaca IgG-a što se također označava kao IgG G0 (13). Gubitak terminalnih galaktoza te prelazak iz stanja IgG-G2 (digalaktosilirana struktura) u IgG-G1 (monogalaktosilirana struktura) pa IgG-G0 (agalaktosilirana struktura) reverzibilan je proces koji se opaža tijekom akutnih upala. Vjeruje se da agalaktosilirani oblik IgG-a djeluje proupalno i to alternativnim putem aktivacije komplekta te lektinskim putem preko vezanja na manozavezujući lektin (eng. mannose binding lectin, MBL (14).



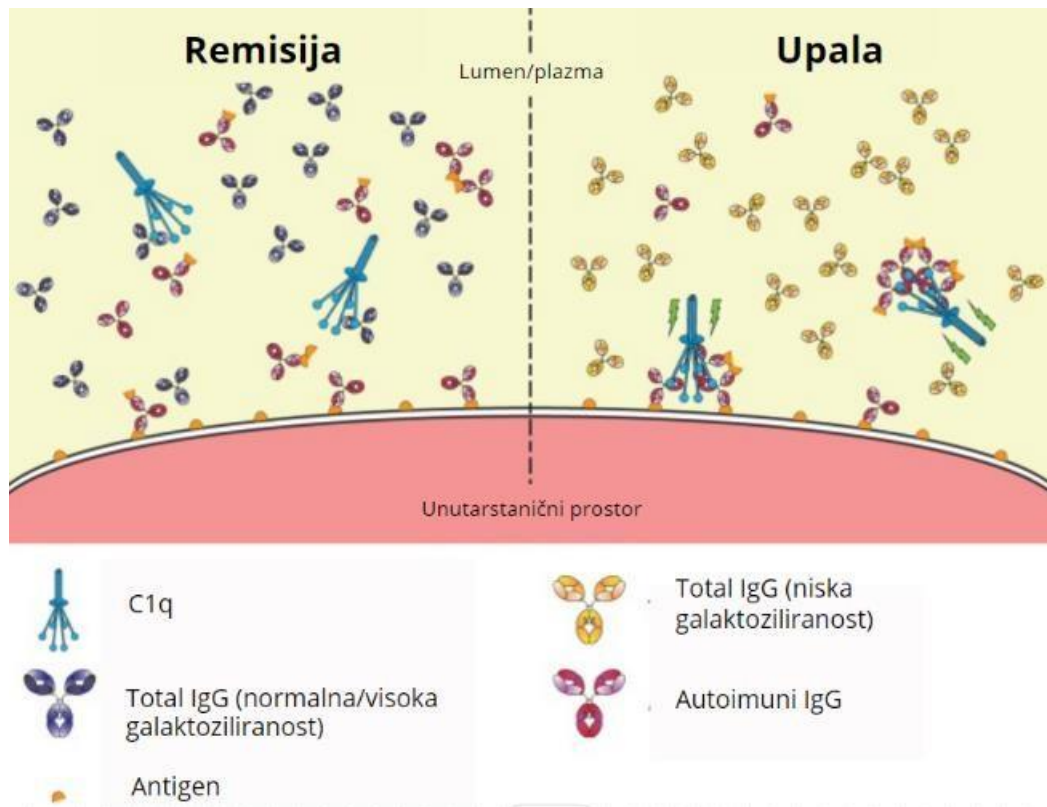
Slika 5. Prikazano je visoko-konzervirano glikozilacijsko mjesto na teškom lancu IgG-a; CH2-84.4. Glikani na tom mjestu mogu biti G0, G1 ili G2 ovisno o stupnju galaktozilacije. G0 glikoforma pokazuje povećan afinitet protutijela za imunoglobulinski receptor FcγRIII koji se nalazi na raznim stanicama imunskog sustava. Sijalinizirane i fukozilirane glikoforme smanjuju

afinitet protutijela za Fc $\gamma$ RIII te omogućavaju interakciju s endogenim lektinima te antigenprezentirajućim stanicama što odgovara protuupalnom odgovoru. Slika je preuzeta i prevedena iz (15).

Značajne promjene u glikozilaciji proteina također su opažene u raznim autoimunim bolestima poput sistemskog lupusa eritematozusa (SLE) i reumatoidnog artritisa (RA), inflamatornim bolestima crijeva te kod virusa humane imunodeficijencije (HIV). Obzirom da autoimuna stanja obuhvaćaju masovnu proizvodnju imunoglobulina u obliku autoantitijela, možemo zaključiti da u tim istim stanjima postoji široka lepeza glikanskih profila. Istraživajući glikanski profil pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisa, otkrivena je značajna korelacija između agalaktoziliranih oblika IgG-a i nekoliko klinički značajnih parametara poput izraženosti simptoma, progresije i stadija bolesti te odgovora na terapiju. Vjeruje se da izmijenjeni glikanski profil IgG-a u autoimunim bolestima mijenja aktivacijski prag efektorskih imunskih stanica. Istraživanja su pokazala da je abnormalna galaktozidacija IgG-a prisutna u asimptomatskih osoba sa povećanim rizikom od autoimunih bolesti što ukazuje na prediktivni potencijal glikana. Također, otkriveno je da je glikozilacija IgG-a regulirana na klonalnoj razini te da određeni glikanski profili igraju ulogu u patologiji autoimunih bolesti (14).

U stanjima infekcije povećava se broj antitijela zbog njihove protektivne funkcije. Istraživanja su pokazala značajan pad u galaktozilaciji kod određenih infektivnih bolesti, te normalizaciju glikanskog profila po liječenju s antiviralnim lijekovima. Kod infekcije HIV-om zabilježen je pad galaktozilacije, sijalinizacije i fukožilacije IgG-a koji je usmjeren na ovojnicu virusa (14).

Posljednja skupina bolesti na koju se možemo pouzdano osvrnuti jesu karcinomi. Kao i u prethodnim primjerima, pad glikoziliranih glikoforma, posebice u određenim tipovima karcinoma može se povezati s progresijom i prognozom bolesti te predviđanjem odgovora na terapiju. Agalaktoziliranost IgG-a sveprisutno je obilježje kod mnogih tipova karcinoma, međutim s druge strane postoji znatna varijabilnost u prisutnosti drugih glikoforma poput fukožilacije, N-acetilglikozilacije i sijalinizacije (14). Obzirom na utjecaj glikozilacije IgG-a na aktivaciju upale, kombinacije različitih glikoformi pogoduju boljoj ili lošijoj prognozi bolesti.



Slika 5. U autoimunim bolestima, težina simptoma u negativnoj je korelaciji sa stupnjem galaktoziliranosti imunoglobulina G. Viši stupanj galaktozilacije povećava afinitet za C1q komponente komplementa. U remisiji, nalazimo pregršt galaktoziliranih glikoformi IgG-a što sprečava interakciju autoimunih IgG-a i komplementa. S druge strane, u stanju upale nalazimo agalaktozilirane IgG-ove kojima je smanjen prag vezanja za komplement, što omogućava autoimunim imunoglobulinima da se vežu za C1q i pojačaju upalni proces. Slika je preuzeta i prevedena iz (16).

Zaključno, određeni glikanski profili neminovno su prisutni u upalnim stanjima te ih u patološkim stanjima poput starenja, autoimunih, infektivnih bolesti te karcinoma možemo povezati s progresijom bolesti. Obzirom da su glikani koji se nalaze pretežno na imunoglobulinu G uključeni u patološke mehanizme aktivacije imunološkog odgovora, otvaraju se vrata brojnim mogućnostima liječenja, ali i brojna pitanja o utjecaju glikozilacije ostalih proteina imunskog sustava na progresiju raznih bolesti.

#### 1.1.4 N-glikozilacija plazmatskih proteina u populaciji

Poznato je da N-glikom znatno varira ovisno o dobi i zdravstvenom statusu, međutim opažena je i varijabilnost unutar populacija s obzirom na genetičke i okolišne faktore. Kako bismo razvijali biljeg patoloških stanja na temelju glikanske molekule, potrebno je dobro poznavati varijabilnost iste molekule u fiziološkim uvjetima kod zdravih pojedinaca. Populacijske studije izrazito su važne za definiranje referentnih profila N-glikoma kod pripadnika određene populacije (17).

Analizom plazmatskog N-glikoma utvrđeno je da je nasljednost glikanskih oblika značajna tek kod pojedinih individualnih molekula, te da signifikantnost može biti vrlo niska ili pak veća od 50% za određene N-glikane. U većini analiziranih glikanskih skupina, dob i spol imaju statistički značajan, ali malen utjecaj na varijabilnost N-glikana u plazmi (18). Ponašanje N-glikoma u homeostazi poznato je tek za nekolicinu glikoproteina.

Imunoglobulin G jedan je od glikoproteina kod kojeg je pronađena značajna povezanost genetičkih značajki i glikozilacije. Genetičkim polimorfizmima može se objasniti varijabilnost sijalinizacije (preko 60%), te varijabilnost kor fukoze, bisekcijskog GlcNAc i galaktoze (između 25 i 45%). Također, utvrđeno je da spol nema skoro nikakav utjecaj na glikozilaciju IgG-a, dok je dob statistički značajna za galaktozilaciju, sijalinizaciju te zastupljenost varijante G0, što ide u prilog promjeni glikozilacije IgG-a tijekom procesa starenja (19).

Kod analize N-glikozilacije plazmatskog proteina transferina, utvrđene su spolno-ovisne razlike u bisekcijskom GlcNAc, sijalinizaciji te galaktozilaciji. Pronađene su i dobno-ovisne razlike, međutim njihova značajnost kod transferina nije usporediva sa značajnošću dobi kod IgG-a (20).

Također, analizom interindividualnih razlika u N-glikozilaciji na alfa-1-kiselom glikoproteinu, utvrđen je statistički značajan utjecaj dobi, spola, biokemijskog i fiziološkog stanja.

## 1.2 KOMPONENTA 3 KOMPLEMENTA (C3) KAO GLIKOPROTEIN

C3 glikoprotein centralna je komponenta komplementa koja sudjeluje u sva tri puta aktivacije te je posrednik u fagocitozi patogena i poticanju upalnog odgovora na lokalne antigene (21). C3 je najzastupljeniji protein komplementa s plazmatskom koncentracijom od 1.0 – 1.5 mg/ml, nastaje većinski u jetri u obliku pro-C3 prekursora te podliježe posttranslacijskoj N-glikozilaciji (22). Prema strukturi, C3 je glikoprotein velike molekularne mase (185 kDa) i sadrži 13 strukturnih domena. U nativnom obliku sastavljen je od dvije podjedinice – alfa i beta polipeptidnog lanca povezanih disulfidnim mostom (23).

Polimorfizam gena za C3 glikoprotein uzrokovan je dvjema alelnim varijantama – S (eng. slow) i F (eng. fast) koje su tako nazvane obzirom na brzinu putovanja po agaroznom gelu u elektroforezi. Ove dvije varijante s razlikom u supstituciji jedne aminokiseline čine tri moguća fenotipa koji su različito raspoređeni po rasnim skupinama (24).

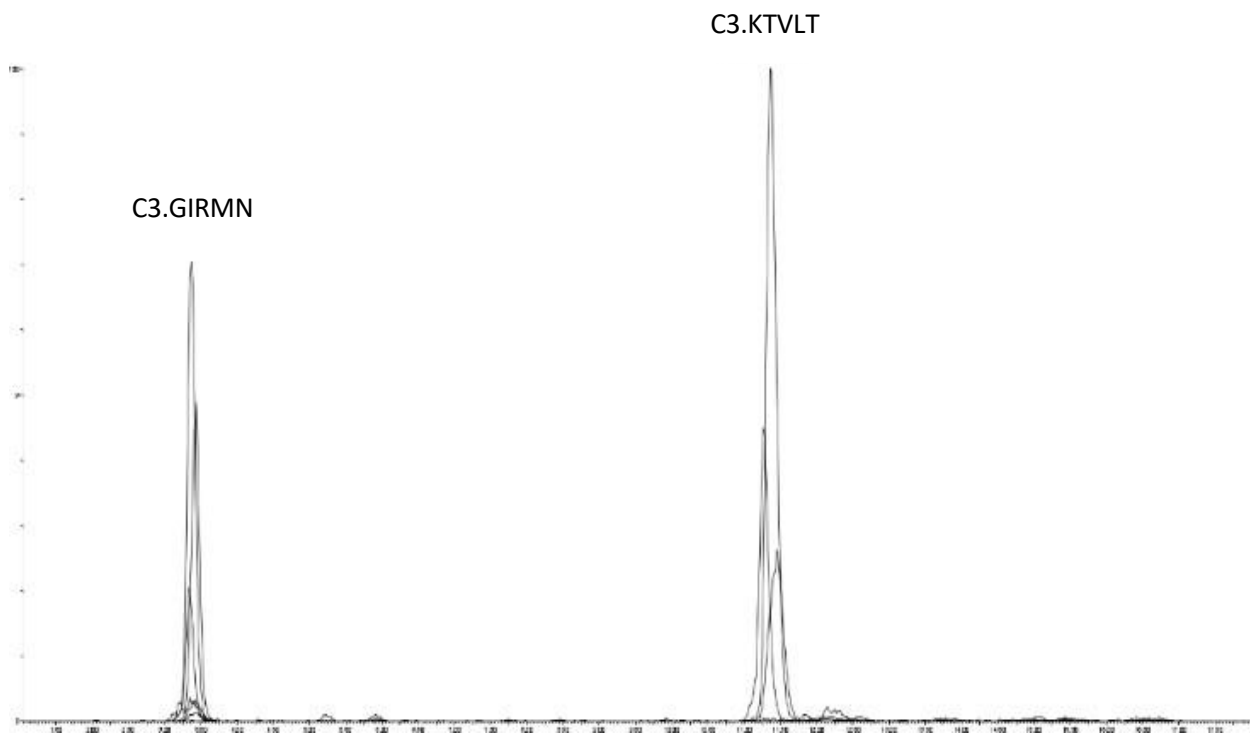
Tijekom kaskadne aktivacije komplementa proteolitičkim kidanjem uklanjaju se mali peptidni segmenti ili cijele strukturne domene sa C3 glikoproteina čime nastaju manje komponente koje se razlikuju u veličini i funkciji (23). Dvije komponente koje nastaju ovim kidanjem su mali fragment C3a i veliki fragment C3b. C3a je anafilatoksin, mala kemokinska molekula koja djeluje kao medijator upale pozivanjem fagocita na mjesto upale. C3b je opsonin; svojim labilnim tiolnim skupinama kovalentno se veže za površinu mikroorganizama i olakšava fagocitozu te uklanjanje imunskih kompleksa (25).

Kao što je već spomenuto, C3 glikoprotein je uključen u razvoj mikro- i makro-vaskularnih komplikacija šećerne bolesti, međutim njegova uloga u patološkim procesima je doista raznolika. Poremećaje funkcije C3 glikoproteina povezujemo s raznim bolestima, a potpuni nedostatak ove komponente komplementa manifestiraju se u obliku osjetljivosti na infekcije (26). C3 glikoprotein je prepoznat kao faktor rizika za razvoj kardiometaboličkih bolesti zbog svojeg utjecaja na dislipidemiju, inzulinsku rezistenciju te jetrenu disfunkciju. Nadalje, uvjetovano šećernom bolešću, C3 glikoprotein se može inkorporirati u fibrinske niti te interferirati s formiranjem krvnih ugrušaka. Sve ovo ukazuje na značajnu ulogu C3 glikoproteina u razvoju prokoagulantnog, hipofibrinolitičnog te protrombotičkog stanja (27). Nepobitna uloga C3 glikoproteina u progresiji ŠBT1 i drugih patoloških stanja ukazuje na potrebu daljnje analize ovog proteina te njegovih dijagnostičkih i terapijskih potencijala.

### 1.2.1 Glikanski profil C3 komponente komplementa

C3 glikoprotein u svom polipeptidnom slijedu sadrži dva glikozilacijska mjesta na kojima su vezani isključivo manozni glikani (28).

Metodom obogaćivanja visokomanoznih glikana u humanom serumu te kromatografskom i spektrometrijskom analizom pročišćenih glikana detektirano je devet glikoformi podijeljenih na dva glikozilacijska mjesta. Glikozilacijsko mjesto C3.KTVLT sadrži tri glikoforme, a glikozilacijsko mjesto C3.GIRMN sadrži 6 glikoformi što je prikazano na reprezentativnom kromatogramu i tablici ispod teksta.



Slika 6. Reprezentativni kromatogram dvaju glikozilacijskih mjesta na C3 komponenti komplementa. Glikoforme su identificirane prema omjeru mase i naboja ( $m/z$ ) izračunatom iz mase svakog peptida s N-glikozilacijskim mjestom te mase odgovarajućih glikana. Peptidi su dobiveni cijepanjem Glu-C proteazom. Glikoforme su potvrđene fragmentacijskim spektrom.



N-glikozilacijsko mjesto	Peptidna sekvenca	Kompozicija glikana	Abrevijacija glikoforme
C3.KTVLT	KTVLTPATNHMGN*VTFTIPANRE	Man5GlcNAc2	C3.KTVLT-N2H5
		Man6GlcNAc2	C3.KTVLT-N2H6
		Man7GlcNAc2	C3.KTVLT-N2H7
C3.GIRMN	GIRMN*KTVAVRTLDPPE	Man5GlcNAc2	C3.GIRMN-N2H5
		Man6GlcNAc2	C3.GIRMN-N2H6
		Man7GlcNAc2	C3.GIRMN-N2H7
		Man8GlcNAc2	C3.GIRMN-N2H8
		Man9GlcNAc2	C3.GIRMN-N2H9
		Glc1Man9GlcNAc2	C3.GIRMN-N2H10

Tablica 1. Peptidne sekvence na svakom glikozilacijskom mjestu, kompozicija glikana i abrevijacije glikoformi. (N označava N-acetilglukozamin, H označava heksozu). Tablica je preuzeta i prevedena iz (29).

Do sada, glikanski profil C3 glikoproteina nije bio analiziran na većoj, isključivo zdravoj populaciji s ciljem određivanja faktora koji utječu na C3 N-glikom.

### 1.2.2 Promjene glikanskog profila C3 u patološkim stanjima

Glikanski profil C3 glikoproteina prethodno je analiziran na djeci i odraslim osobama koje boluju od šećerne bolesti tipa 1.

Istraživanje promjena N-glikozilacije C3 komponente komplementa u odraslih osoba oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 učinjeno je na 189 pacijenata u hrvatskom bolničkom centru. Rezultati su pokazali značajne razlike u tri glikoforme (C3.KTVLT-N2H6, C3.GIRMN-N2H8, C3.GIRMN-N2H10) kod pacijenata s teškom albuminurijom te značajne razlike u glikoformi C3.GIRMN-N2H10 kod pacijenata s retinopatijom (29).

U sklopu drugog istraživanja, učinjeno je N-glikoprofiliranje C3 komponente komplementa u djece oboljele od šećerne bolesti tipa 1 i njihovih zdravih srodnika, a sve u svrhu otkrivanja potencijalnog dijagnostičkog biomarkera. Rezultati su pokazali povećane udjele neprerađenih

glikoformi koje sadrže više manoznih ostataka u oboljele djece u odnosu na zdrave srodnike. Pronađeni su povećani udjeli glikoformi C3.KTVLT-N2H7 i C3.GIRMN-N2H10 te smanjeni udjeli glikoformi C3.KTVLT-N2H5 i C3.GIRMN-N2H8 (28).

Rezultati ovih istraživanja potvrđuju biomarkerski potencijal N-glikoma C3 komponente komplemента, te se nalaže potreba analize varijabilnosti navedenih glikoformi u fiziološkim uvjetima kod zdrave populacije.

### 1.3 VISOKOPROTOČNA ANALIZA N-GLIKANA

U proizvodnji glikanskog slijeda svaka nova monosaharidna jedinica određena je prethodno nadodanim monosaharidom. Cijeli set kompetitivnih enzima odgovoran je za konačnu sintezu „gotovog“ lanca za koji ne postoji prototip. Svaki glikoprotein može izaći iz procesa glikozilacije u bilo kojem trenutku, što uzrokuje značajnu varijabilnost u nastalim glikanima. Upravo to je razlog zašto postoje izazovi u analizi glikoma i glikoproteoma (30).

Visokoprotokna analiza N-glikana (eng. High-throughput glycomics) naziv je za brzu i robusnu, te osjetljivu analizu glikana u tisućama uzoraka glikoproteina za potrebe istraživanja velikih razmjera. Ono što razlikuje visokoprotoknu analizu od srednje- ili nisko-protokne analize jest prvenstveno broj uzoraka te sama priprema i analiza podataka. Naime, kako bi upravo visokoprotokna analiza glikana bila primjenjiva u ne-specijaliziranim laboratorijima, određeni aspekti ove tehnologije poput pripreme uzoraka, analitičkog dijela te obrade podataka moraju biti standardizirani te podložni automatizaciji (31, 32).

N-glikani na glikoproteinima nalaze se na specifičnom slijedu aminokiselina (asparagin – X – serin ili treonin (Asn-Xxx-Ser/Thr)). Također, glikoproteini mogu imati više glikozilacijskih mjesta što nazivamo makroheterogenost, te mogu imati različite glikanske oblike na jednom glikozilacijskom mjestu što nazivamo mikroheterogenost. Broj glikanskih struktura na glikozilacijskom mjestu ovisi o konformaciji proteina, prostornoj i vremenskoj dostupnosti glikoziltransferaza, njihovoj aktivnosti, transkripcijskim faktorima te dostupnosti šećernih prekursora. Razina karakterizacije varira od analize pročišćenih glikoproteina do analize cijelog slobodnog glikoma kompleksnih bioloških matrica (31).

Obzirom na tipologiju uzorka i istraživačko pitanje, visokoprotlačna analiza N-glikana može uključivati različite analitičke tehnologije te je moguće analizirati oslobođene glikane, glikopeptide, i intaktne glikoproteine (32).

### 1.3.1 Prednosti analize glikopeptida naspram oslobođenih glikana

Glikani mogu biti oslobođeni i mjereni masenom spektrometrijom te profilirani prema masi. Ovom se analizom mogu identificirati heksoze poput glukoze, galaktoze i manoze, te N-acetilheksozamini poput GlcNAc i GalNAc, deoksiheksoze i sijalinska kiselina. Uzimajući u obzir mogućnosti analize i karakterizacije kompozicije glikana, ovi podaci su vrlo ograničavajući te se koriste u svrhe otkrivanja biomarkera praćenjem porasta ili pada određene strukture (30).

Analiza glikopeptida je specifična za protein i glikozilacijsko mjesto, visoko je osjetljiva te je moguća i za N- i za O- vezane glikane. Glikopeptid se odnosi na polipeptid koji sadrži glikozilacijsko mjesto, dobiven cijepanjem glikoproteina od interesa. Prije same analize potrebno je optimizirati uzorak. Kromatografskim razdvajanjem, te prethodnom izolacijom specifičnog proteina omogućavamo analizu glikanskog profila određenog proteina (32). Informacija o glikozilaciji povezana je s glikozilacijskim mjestom na kojem se određeni glikan nalazi. Analizom glikopeptida kompozicija glikana može se usporediti s mjestom vezanja s obzirom na porciju peptida (33).

### 1.3.2 Obogaćivanje glikoproteina iz bioloških uzoraka lektinima

Obogaćivanje glikoproteina izvodi se jer biološki uzorci sadrže pregršt glikoproteina te je potrebno izdvojiti one koji su u fokusu istraživanja. Nadalje, obogaćivanjem se uklanja izazov slabe učinkovitosti ionizacije prilikom ionizacije elektrosprejom prethodno MS analizi (34). Lektini su proteini koji vežu glikanske strukture s visokom specifičnošću te jedan lektin ili kombinacija nekoliko lektina ne može obogatiti sve glikoproteine (35). Između lektina i ugljikohidrata stvaraju se Van der Waalsove i hidrofobne veze što omogućava afinitetnu kromatografiju kojom se izvodi obogaćivanje. Concavalin A (ConA) jedan je od najkorištenijih lektina za obogaćivanje N-glikoproteina s obzirom da prepoznaje strukture poput terminalnog N-acetilglukozamina i  $\alpha$ -vezanih manoz koji se često nalaze u sklopu N-glikana (36). Također, Concavalin A ima vrlo

slab afinitet za biantenarne N-glikane, a višerazgranate strukture kompleksnog tipa ne uspijeva vezati (37).

Obzirom da C3 glikoprotein sadrži visokomanozni tip N-glikana, obogaćivanje uzorka ConA lektinom omogućava uklanjanje glikoproteina s kompleksnim i hibridnim tipom N-glikana koji su u vanstaničnom prostoru prisutni u znatno većoj količini.

### 1.3.3 Glikofiliranje spektrometrijom masa

Spektrometrija masa je osjetljiva i selektivna metoda kojom se mjeri omjer mase i naboja ( $m/z$ ) određene molekule u uzorku te se koristi kao metoda izbora kod analize glikozilacije proteina. Svaki maseni spektrometar sastoji se od izvora ionizacije, analizatora masa te sustava detekcije iona. Izvor ionizacije ponajprije prevodi molekule u ione plinovitog agregatnog stanja kako bi se lakše kretali u električnom i magnetskom polju. Na analizatoru masa ioni se razvrstavaju prema omjeru mase i naboja, a sustav detekcije iona mjerene ione prevodi u sustav podataka gdje se pojedini omjeri mase i naboja pohranjuju u ovisnosti o njihovoj količini.

Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI) i elektroraspršenje (ESI) su trenutno najkorištenije ionizacijske tehnike. Kod MALDI primjenjuje se kemijska matrica i LASER za desorpciju i ionizaciju molekularnih sastavnica, a kod ESI čestice se ioniziraju primjenom visokog napona na uzorak pri čemu nastaje aerosol. ESI se često spreže s tekućinskom kromatografijom (LC) kako bi se smjesa analita efikasno odvojila, a moguće je izvoditi i nano-ESI korištenjem malih protoka na nanolitarskoj razini kako bi se povećala osjetljivost i smanjila potrošnja uzorka (38).

MALDI i ESI pripadaju u tehnologije 'meke ionizacije' kojima se ne fragmentiraju prekursorski ioni što ih čini prikladnima za analizu kompleksnih uzoraka. Postoje dva pristupa u karakterizaciji glikana masenom spektrometrijom. Prvi pristup je analiza oslobođenih glikana. Glikani bivaju enzimatski ili kemijski odcijepljeni od glikoproteina te pročišćeni prije analize masenom spektrometrijom. U slučaju da postoji više od jednog glikozilacijskog mjesta na glikoproteinu ova je metoda ograničena. Drugi pristup je analiza glikopeptida umjesto oslobođenih glikana čime je omogućena analiza glikozilacije na specifičnom glikozilacijskom mjestu (33).

Kompletna karakterizacija glikopeptida obuhvaća identifikaciju peptida koji sadrži glikozilacijsko mjesto kao i kompoziciju glikana te se mora odrađivati u step-by-step pristupu. Priprema uzorka glikopeptida za analizu masenom spektrometrijom obuhvaća izolaciju glikoproteina od interesa lektinskom afinitetnom kromatografijom, redukciju i alkilaciju te pročišćavanje proteoliziranih fragmenata. Redukcija i alkilacija služe kako bi se proteini denaturirali prije djelovanja proteinaza poput tripsina i proteinaze K. Pročišćavanje omogućuje uklanjanje supresije signala glikopeptida u masenom spektrometru uzrokovane nemodificiranim proteinima (33).

Prvi korak jest identificirati glikopeptidne ione koji imaju nisku težinu uz pomoć markerskih iona. Zatim je potrebno identificirati peptidnu porciju te ju odvojiti od glikanske porcije. Identificiranjem glikanske kompozicije i poznavanjem mase prekursorskih iona računski se dolazi do mase peptida. Također, do mase peptida može se doći cijepanjem glikana u frakcijama koje su dobivene tijekom pročišćavanja uzorka. Cijepanje se vrši enzimatski, te se de-glikozilirani peptidni ioni mogu identificirati i sekvencirati masenom spektrometrijom. Ovom tehnikom može se odrediti okupiranost glikozilacijskog mjesta na glikopeptidu (33). Identifikacija i karakterizacija glikopeptida naziva se 'bottom-up' pristup.

Nakon identifikacije peptida, glikopeptidna kompozicija karakterizira se uz pomoć raznih baza podataka usporedbom pikova na masenom spektrometru.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Poznato je da N-glikozilacija plazmatskih proteina ovisi o dobi, spolu te o zdravstvenom stanju organizma te da su razlike glikozilacije unutar populacija pod utjecajem genskih, ali i različitih okolišnih čimbenika. Među vodećim čimbenicima koji unutar populacije utječu na glikozilaciju proteina možemo izdvojiti spolne hormone, životnu dob, debljinu te životne navike poput pušenja i prehrane.

Razlika u glikozilaciji plazmatskih proteina među spolovima pripisuje se razlikama u razini spolnih hormona, posebice estradiola tijekom trudnoće, menopauze i hormonske terapije, dok su promjene glikozilacije ovisne o dobi povezane s fiziološkim osobinama starenja. Dosadašnja istraživanja utjecaja dobi i spola na glikozilaciju plazmatskih proteina provedena su tek na nekoliko glikoproteina poput IgG-a, transferina i alfa-1-kiselog glikoproteina. Kako su nedavna istraživanja predložila C3 glikoprotein kao potencijalni dijagnostički biljeg u nekim patološkim stanjima, razvijen je postupak za visokoprotocnu analizu njegove N-glikozilacije koji je pokazao da ovaj protein okupiraju visokomanozne glikanske strukture.

Navedeni potencijal dijagnostičkog biljega te činjenica da C3 komponenta komplemента sudjeluje u razvoju prokoagulantnog, hipofibrinolitickog i protrombotickog stanja u brojnim bolestima stvorili su potrebu za analizom fiziološke varijabilnosti glikozilacije ovog glikoproteina u populaciji. Kako bi se mogla provoditi daljnja istraživanja te procijeniti dijagnostički potencijal C3 glikoproteina, potrebno je poznavati njegovu referentnu fiziološku glikozilaciju u zdravoj populaciji. Stoga je u ovom diplomskom radu, primjenom visokoprotocne analize glikozilacije upotrebom spektrometrije masa, određen utjecaj spola i dobi na N-glikom C3 komponente komplemента u populaciji zdravih ispitanika.

### 3. ISPITANICI, MATERIJALI, METODE

#### 3.1 ISPITANICI

U ovo istraživanje je uključeno 162 ispitanika (od toga 56 muškog i 106 ženskog spola). Ispitanici su pripadnici svih dobnih skupina u rasponu od 20 do 85 godina.

#### 3.2 MATERIJALI

##### 3.2.1 Kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS)	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev klorid (NaCl)	CARLO ERBA Reagents, Njemačka
manganov klorid tetrahidrat ( $MnCl_2 \times 4H_2O$ )	Sigma-Aldrich, SAD
kalcijev klorid dihidrat ( $CaCl_2 \times 2H_2O$ )	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich, SAD
metil $\alpha$ -D-manopiranozid	Sigma-Aldrich, SAD
ledena octena kiselina ( $CH_3COOH$ )	Sigma-Aldrich, SAD
Con A-Sepharose 4B	Global Life Sciences Solutions
amonijev acetat ( $NH_4CH_3CO_2$ )	Acros Organics, Belgija
2-propanol	Merck, SAD
trifluorocetna kiselina ( $CF_3CO_2H$ )	Sigma-Aldrich, SAD
acetonitril LC-MS čistoće	VWR international, SAD
HILIC zrnca Chromabond	Macherey-Nagel, Njemačka
mravlja kiselina	Sigma-Aldrich, SAD

Tablica 2. Kemikalije

### 3.2.2 Enzimi

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

### 3.2.3 Uređaji i oprema

<b>UREĐAJI I OPREMA</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>
ACQUITY UPLC M class nano-LC sustav	Waters, SAD
analitička vaga AB54-S	Mettler Toledo, SAD
centrifuga	Eppendorf, Njemačka
inkubator	MRC, Izrael
magnetski mješač Magnetic Stirrer MSH 300	Biosan, Latvija
mikropipete	Rainin, SAD
nano-LC kolona Halo C18 (150 mm x 75 µm i.d., 2.7 µm)	Advanced Materials Technology, SAD
tehnička vaga Highland	Adam Equipment, UK
pH metar Seven Compact	Mettler Toledo, SAD
predkolona Acclaim PepMap C8 (5 mm x 300 µm i.d.)	Thermo Fischer Scientific, SAD
spektrometar masa Compact	Bruker Daltonics, SAD
treskalica	GFL, Njemačka
vakuumska centrifuga SpeedVac	Thermo Scientific, SAD
vakuumsko postolje	Millipore Corporation, SAD
vakuumska pumpa	Pall, SAD

Tablica 3. Uređaji i oprema



### 3.2.4 Potrošni materijali

MATERIJALI	PROIZVOĐAČ
ABgene PCR pločice s 96 jažica	Thermo Scientific, SAD
mikrotitarske pločice s 96 jažica za skupljanje uzoraka	Waters, SAD
nastavci za pipete	Rainin, SAD
polipropilenske filter pločice s 96 jažica	OrochemA, SAD

Tablica 4. Potrošni materijali

### 3.3 PROTOKOL PRIPREME UZORAKA

- Priprema pufera
  - ConA vezujući pufer. Za pripremu jedne litre (1 L) otopine što je dovoljno za osam pločica koristi se 11.688 g NaCl, 3.152 g Tris HCl, 147 mg CaCl<sub>2</sub> dihidrata, 198 mg MnCl<sub>2</sub> tetrahidrata. U smjesu se dodaje 800 mL destilirane vode te se pH namješta na 7.4 uz pomoć 1M NaOH. U otopinu se dodaje destilirana voda do volumena od litre.
  - Elucijski pufer. Za pripremu 50 mL otopine što je dovoljno za dvije pločice uzima se 1941.75 mg manopiranozida u falkon epruvetu od 50 mL te se dodaje 50 mL destilirane vode. Smjesa se vorteksira nakon čega se dodaje 287 µL octene kiseline. Smjesa se vorteksira, te pH otopine mora biti oko 3.
- Priprema aktivirane ConA sefaroze

Za jednu pločicu koristi se 2 mL ConA sefarnog medija u falkon epruvetu od 15 mL. Dodaje se ConA vezujućeg pufera do oznake od 10 mL te se smjesa vorteksira i stavlja na centrifugu 1 minutu na 100g. Odbacuje se supernatant te se isti korak ponavlja dva puta. Omjer sefarnog medija i vezujućeg pufera treba biti 50:50.

#### 3.3.1 Obogaćivanje C3 glikoproteina

10 µL Con A-sefarnog medija stavlja se u polipropilensku pločicu s 96 jažica te se tri puta predkondicionira s ConA vezujućim puferom. Uzorci plazme volumena 10 µL razrijeđeni su s 90 µL ConA vezujućim puferom, nanoseni na kondicionirani lektinski medij na Orochem filter

pločici, centrifugirani i inkubirani preko noći na 4 °C uz lagano miješanje. Nakon inkubacije pločica se tri puta ispiru s 250 µL ConA vezujućim puferom. Nakon centrifuge Orochem pločica postavlja se na vakuumski kolektor te se glikoproteini eluiraju sa 200 µL elucijskog pufera u svaku jažicu. Eluiranje se provodi petominutnim centrifugiranjem, a eluati se osuše u SpeedVac vakuumskom koncentratoru preko noći.

### 3.3.2 Denaturacija i proteoliza glikoproteina

- Priprema denaturacijskog pufera

Za jednu pločicu izvaže se 65.52 mg amonijevog acetata u falkon epruvetu te doda 8.5 mL pročišćene vode. Dodaje se 1.5 mL 2-propanola i vorteksira.

Denaturacijski pufer se dodaje u svaku jažicu u volumenu od 48 µL te se pločica inkubira na 60 °C na 10 minuta nakon čega se hladi 10 minuta.

U 1 mL pročišćene vode otopi se 500U GluC Sigma enzim te se 30 µL otopine alikvotira u PCR pločicu. Konačno, dodaje se 2 µL 0.5U/µL GluC u svaki uzorak. Pločica se zapečati te inkubira 18-22 sata na 37 °C.

### 3.3.3 Pročišćavanje glikopeptida ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Za pročišćavanje glikopeptida ekstrakcijom na čvrstoj fazi koristi se tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (eng. Hydrophilic interaction liquid chromatography – solid phase extraction, HILIC-SPE). Ponajprije se izvaže 1000 mg HILIC Chromabond zrnaca te se pripremi suspenzija zrnaca koncentracije 50 mg/mL u pročišćenoj vodi i stavi na magnetsku mješalicu. Zatim se 100 µL suspenzije dodaje u svaku jažicu polipropilenske filter pločice. Nakon centrifugiranja, pločica se dva puta ispiru sa 250 µL 0.1% TFA te dva puta sa 0.1% TFA u 250 µL 85% acetonitrilu (ACN).

Uzorci se zatim razrjeđuju sa 275 µL 0.12% TFA u 100% ACN te se nanose na Orochem pločicu i inkubiraju 5 minuta. Potom slijedi dvostruko ispiranje sa 250 µL 0.1% TFA u 85% ACN. Nakon centrifugiranja Orochem pločica se postavlja na PCR pločicu te se u svaku jažicu dodaje 190 µL 0.1% TFA i slijedi petominutna inkubacija. Na kraju se obogaćeni glikopeptidi eluiraju

centrifugiranjem 6 minuta na podizanjem brzine sa 300 do 800 rpm (svaku minutu brzina se podiže za 100 rpm). Glikopeptidi se osuše u koncentratoru SpeedVac preko noći.

### 3.4 ANALIZA

#### 3.4.1 LC-ESI-MS analiza obogaćenih glikopeptida

Analiza glikopeptida provedena je na sistemu Acquity H-class tekućinskoj kromatografiji visoke učinkovitosti (eng. ultra-performance liquid chromatography, UPLC) (Waters) spregnutim sa masenim spektrometrom Synapt G2-Si ESI-QTOF (Waters). Instrumenti su pod kontrolom informatičkog sustava MassLynx v.4.1 (Waters).

Osušeni glikopeptidi otopljeni su u 50  $\mu$ L ultračiste vode te injektirani u ACQUITY UPLC BEH C18 kolonu (130 Å, 1.7  $\mu$ m, 1 mm X 150 mm, Waters). Temperatura kolone održavana je na 30 °C, te je brzina protoka postavljena na 0.4 mL/min. Kao otopina A korišten je 0.1% FA (v/v) (Sigma-Aldrich), a kao otopina B korišten je 0.1% FA u ACN-u (v/v). Separacijska metoda koristila je linearni gradijent od 12-19% otopine B u 16-minutnom protoku, nakon čega je uslijedilo 3-minutno pranje sa 80% otopine B. Zatim je uslijedio 6-minutni korak uspostavljanja ravnoteže uz 12% otopine B. Ukupno vrijeme protoka bilo je 25 minuta.

Maseni spektrometar korišten je u pozitivnom načinu rada sa sljedećim uvjetima: napon kapilare od 3 Kv, napon konusa za uzorkovanje od 40 V, temperatura izvora 120 °C, temperatura plina za isparavanje na 350 °C, protok plina za isparavanje 600 L/h. Maseni spektar je snimljen u rasponu od 500 do 2500 m/z na frekvenciji 1 Hz.

#### 3.4.2 Ekstrakcija i obrada glikoproteomskih podataka

Definirane su dvije grupacije kromatografskih pikova, jedan sa 3 glikoforme, a drugi sa 6 glikoformi što odgovara prethodnim saznanjima. Automatizirana relativna kvantifikacija podataka sa masenog spektrometra provedena je korištenjem LaCy Tools sustavom. Prethodno kvantifikaciji glikoproteomičkih podataka, originalni podaci prevedeni su u format mzXML uporabom ProteoWizard MSConvert alatom.

Kromatogrami su poravnati prema retencijskom vremenu koje odgovara pet najjačih signala glikopeptida. Integracija ciljanih pikova obuhvatila je dvostruko, trostruko, četverostruko i peterostruko nabijene čestice uz integraciju sumiranog spektra što osigurava pokriće 99% teoretskih izotopa. Parametri kontrole kvalitete poput točnosti masa, devijacije od obrazaca teoretskih izotopa i omjer signala i šuma automatski su uračunati za svaki analit u svakom uzorku. Procjena kvalitete podataka oslonila se na prosječne vrijednosti kontrole kvalitete izračunate u svim uzorcima uzimajući u obzir svaku glikoformu i naboj. Kriteriji su bili: točnost mase ispod 30 ppm, kvaliteta obrasca izotopa ispod 25%, te omjer signala i šuma iznad 15. Za svaku glikoformu sumirani su i kvantificirani jedino naboji koji odgovaraju svim navedenim kriterijima. Sumirani podaci normalizirani su prema glikozilacijskom mjestu te smo na taj način dobili relativnu zastupljenost svake glikoforme.

### 3.4.3 Statistička obrada podataka

Svi podaci su analizirani i vizualizirani koristeći R programski jezik. Prethodno statističkom modeliranju, varijable glikoformi su normalizirane za svako glikozilacijsko mjesto. Procjena asocijacije između C3 N-glikoma i spola provedena je uz linearno modeliranje gdje je područje glikoforme zavisna varijabla, a spol nezavisna varijabla uz korekciju na dob u vidu polinoma drugog stupnja.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Analiza N-glikozilacije C3 glikoproteina je provedena na 162 ispitanika, od toga 106 žena i 56 muškaraca. Raspon godina populacije je od 20 do 85 godina, a medijan godina je 54.

Kod svakog ispitanika analizirana su glikozilacijska mjesta C3.KTVLT i C3.GIRMN na kojima su prisutne visokomanozne glikoforme u različitim udjelima. Na glikozilacijskom mjestu C3.KTVLT nalaze se glikoforme C3.KTVLT-N2H5, C3.KTVLT-N2H6, C3.KTVLT-N2H7, a na glikozilacijskom mjestu C3.GIRMN nalaze se glikoforme C3.GIRMN-N2H5, C3.GIRMN-N2H6, C3.GIRMN-N2H7, C3.GIRMN-N2H8, C3.GIRMN-N2H9 i C3.GIRMN-N2H10. Analizom je utvrđena zastupljenost i raspodjela pojedine glikoforme po spolu i dobi.

##### 4.1 Opis ispitivane populacije

Srednja vrijednost godina svih ispitanika je 54 godine. U cijeloj populaciji, 50% ispitanika spada u dobnu skupinu od 39-63 godine. 50% muških ispitanika spada u dobnu skupinu od 38.5-64.5 godine, a 50% ženskih ispitanica spada u dobnu skupinu od 41-63 godine.

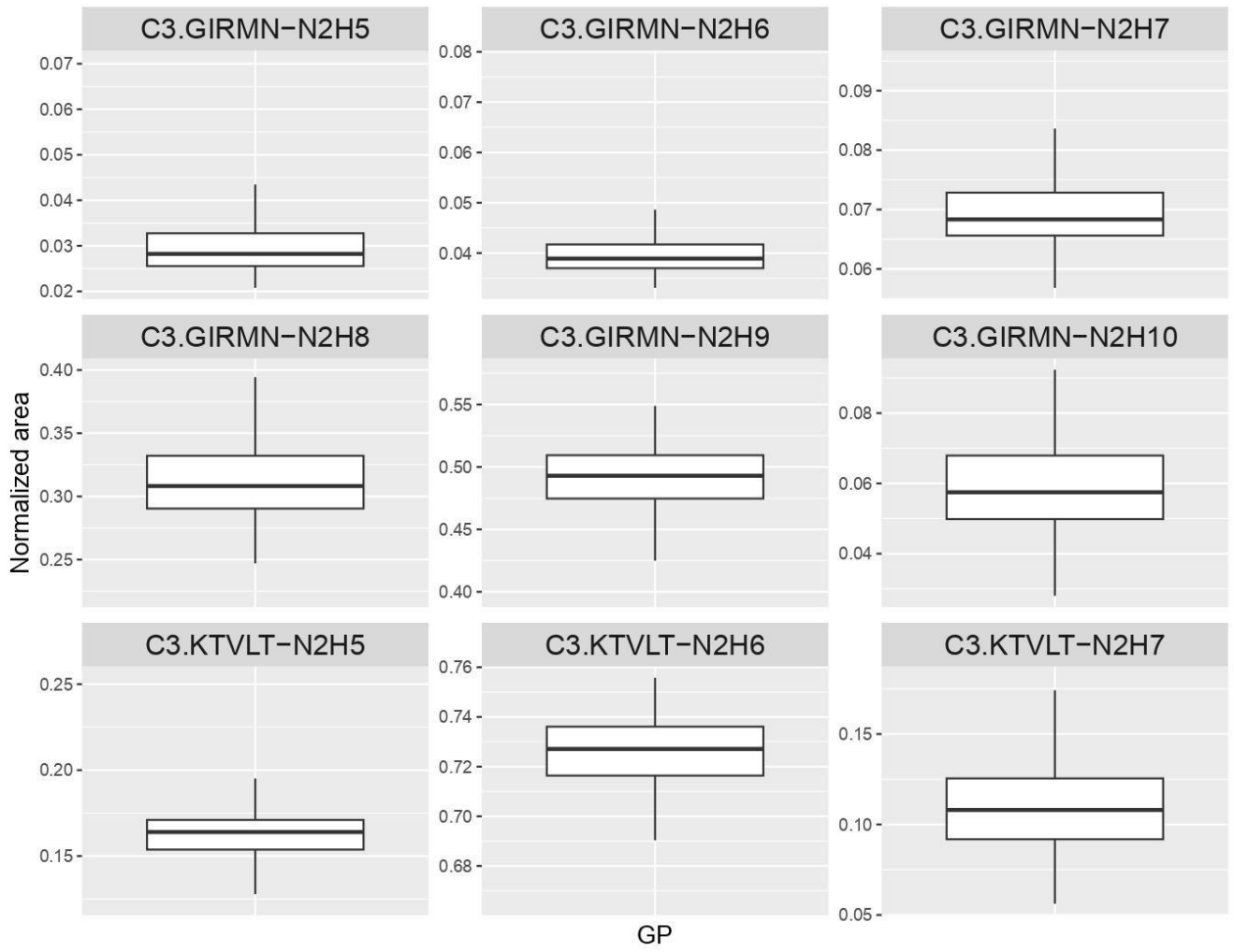
	<b>Populacija</b>	<b>M</b>	<b>Ž</b>
<b>N</b>	162	56	106
<b>M</b>	54	54	54
<b>Q1</b>	39	38.5	41
<b>Q3</b>	63	64.5	63
<b>IQR</b>	24	26	22
<b>Min</b>	20	23	20
<b>Max</b>	85	85	81
<b>R</b>	65	62	61

Tablica 5. prikazuje raspon godina muških i ženskih ispitanika. Kratice su: N, broj ispitanika; M, medijan; Q1, donji kvartil; Q3, gornji kvartil; IQR, interkvartilni raspon; Min, minimum; Max, maksimum; R, raspon.

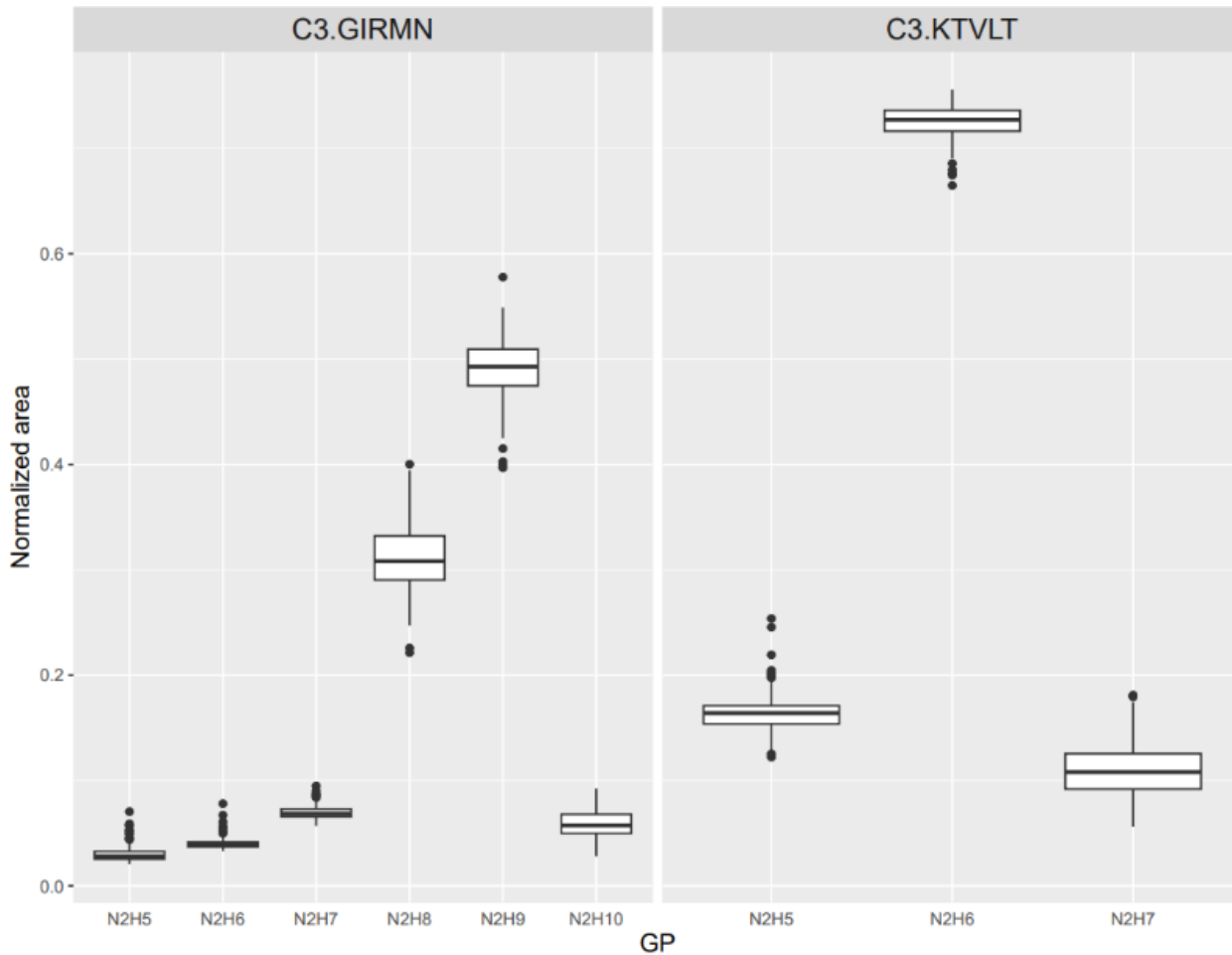
#### 4.2 Relativne zastupljenosti glikoformi na analiziranim glikozilacijskim mjestima

Iz navedenih grafičkih prikaza vidljivo je da je na glikozilacijskom mjestu C3.GIRMN najzastupljenija glikoforma C3.GIRMN-N2H7, a najmanje zastupljena glikoforma je C3.GIRMN-N2H5. Prethodno navedena glikoforma je ujedno najmanje zastupljena glikoforma sveukupno. Na glikozilacijskom mjestu C3.KTVLT, najzastupljenija glikoforma je C3.KTVLT-N2H6 koja je ujedno i najzastupljenija glikoforma sveukupno, dok je na istom glikozilacijskom mjestu najmanje zastupljena glikoforma C3.KTVLT-N2H7.

Relativna zastupljenost pojedine glikoforme na glikozilacijskom mjestu C3.GIRMN je sljedeća: glikoforma C3.GIRMN-N2H5 je prisutna sa 3%; glikoforma C3.GIRMN-N2H6 je prisutna sa 4%; glikoforma C3.GIRMN-N2H7 je prisutna sa 7%; glikoforma C3.GIRMN-N2H8 je prisutna sa 30%; glikoforma C3.GIRMN-N2H9 je prisutna sa 50%; glikoforma C3.GIRMN-N2H10 je prisutna sa 6%. Na glikozilacijskom mjestu C3.KTVLT, relativna zastupljenost je sljedeća: glikoforma C3.KTVLT-N2H5 je prisutna sa 16%; glikoforma C3.KTVLT-N2H6 je prisutna sa 73%; glikoforma C3.KTVLT-N2H7 je prisutna sa 11%. Vrijednosti su procijenjene iščitavanjem iz kutijastih dijagrama.



Grafički prikaz 1. Sveukupna raspodjela pojedine glikoforme na oba glikozilacijska mjesta.

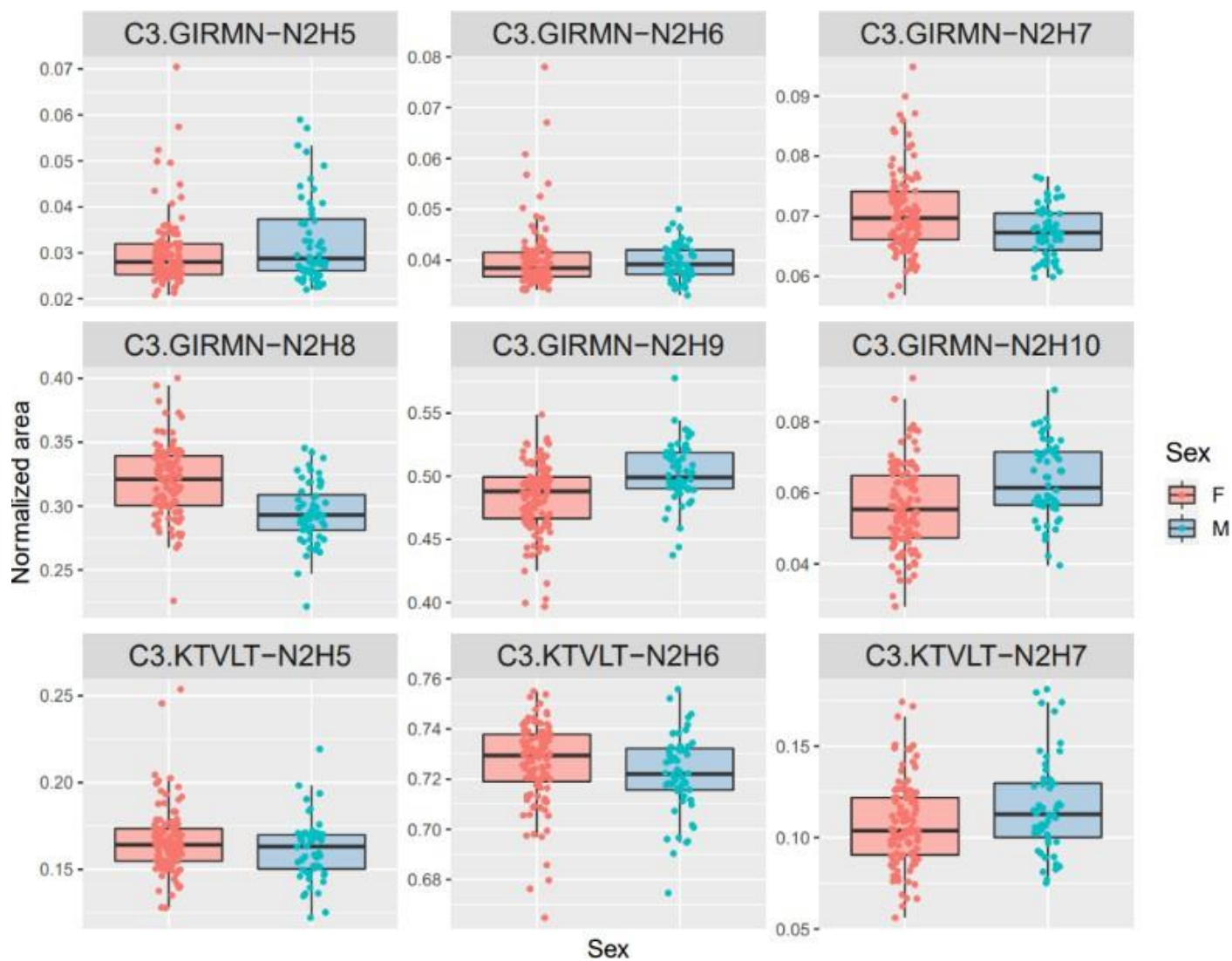


Grafički prikaz 2. Relativna zastupljenost glikoformi po glikozilacijskom mjestu.

#### 4.3 Utjecaj spola na zastupljenost ciljnih glikoformi

Iz navedenih podataka zaključujemo da je statistički značajna razlika u zastupljenosti glikoforme po spolovima prisutna u idućim glikoformama: C3.GIRMN-N2H7, C3.GIRMN-N2H8, C3.GIRMN-N2H9, C3.GIRMN-N2H10, te C3.KTVLT-N2H7. Glikoforma C3.GIRMN-N2H8 statistički je najznačajnija što pokazuje njezina iznimno niska p-vrijednost. Na kutijastom dijagramu vidljiv je povećan udio glikoformi C3.GIRMN-N2H7 i C3.GIRMN-N2H8 kod žena, dok su u muškaraca povećani udjeli glikoformi C3.GIRMN-N2H9, C3.GIRMN-N2H10 i C3.KTVLT-N2H7.



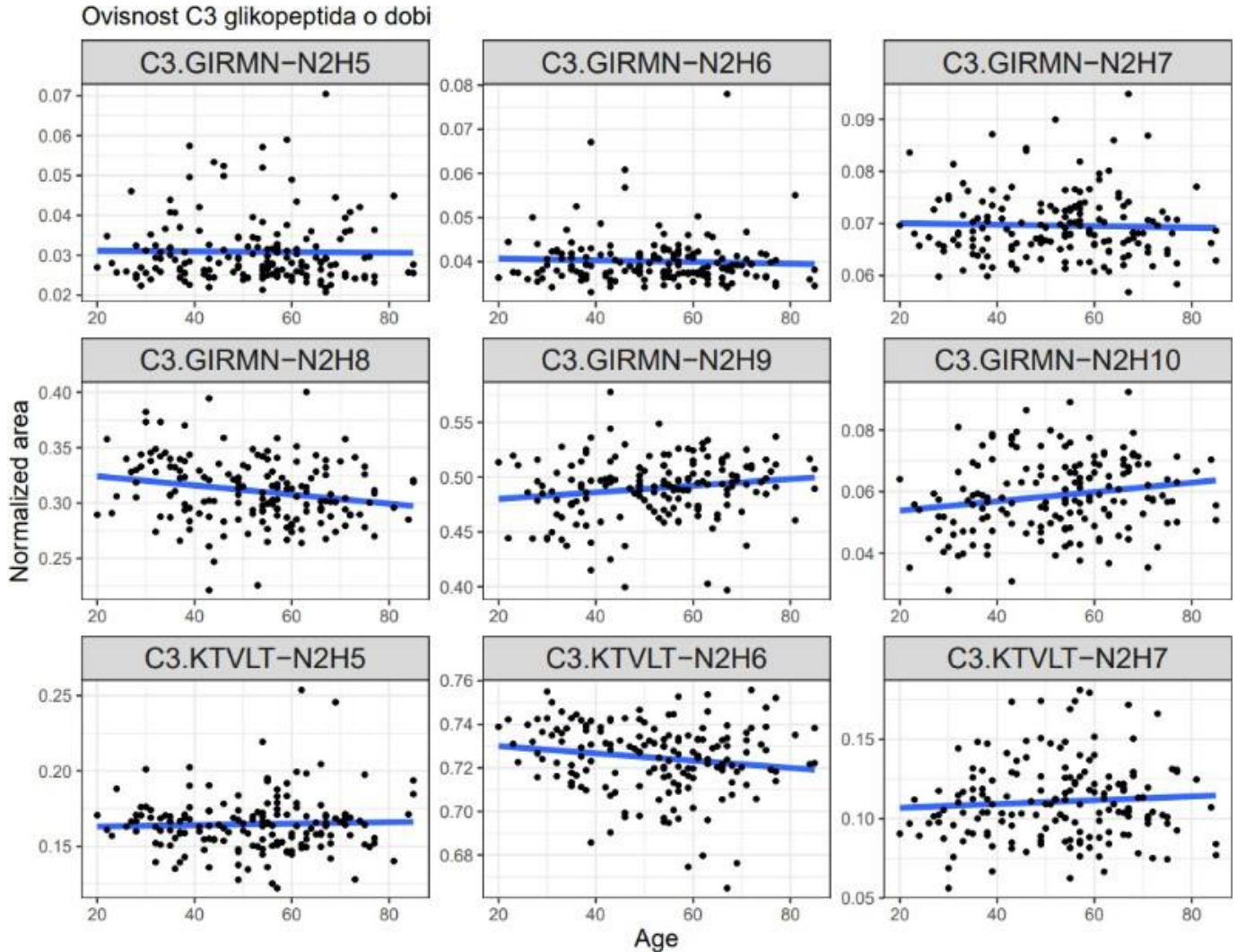


Grafički prikaz 3. Kutijasti dijagram raspodjele pojedinih glikoformi po spolu. Medijani raspodjele ispitanika razlikuju se tek u pojedinim glikoformama, stoga možemo zaključiti da spolno-ovisna razlika u zastupljenosti glikoforme nije prisutna kod svih glikoformi.

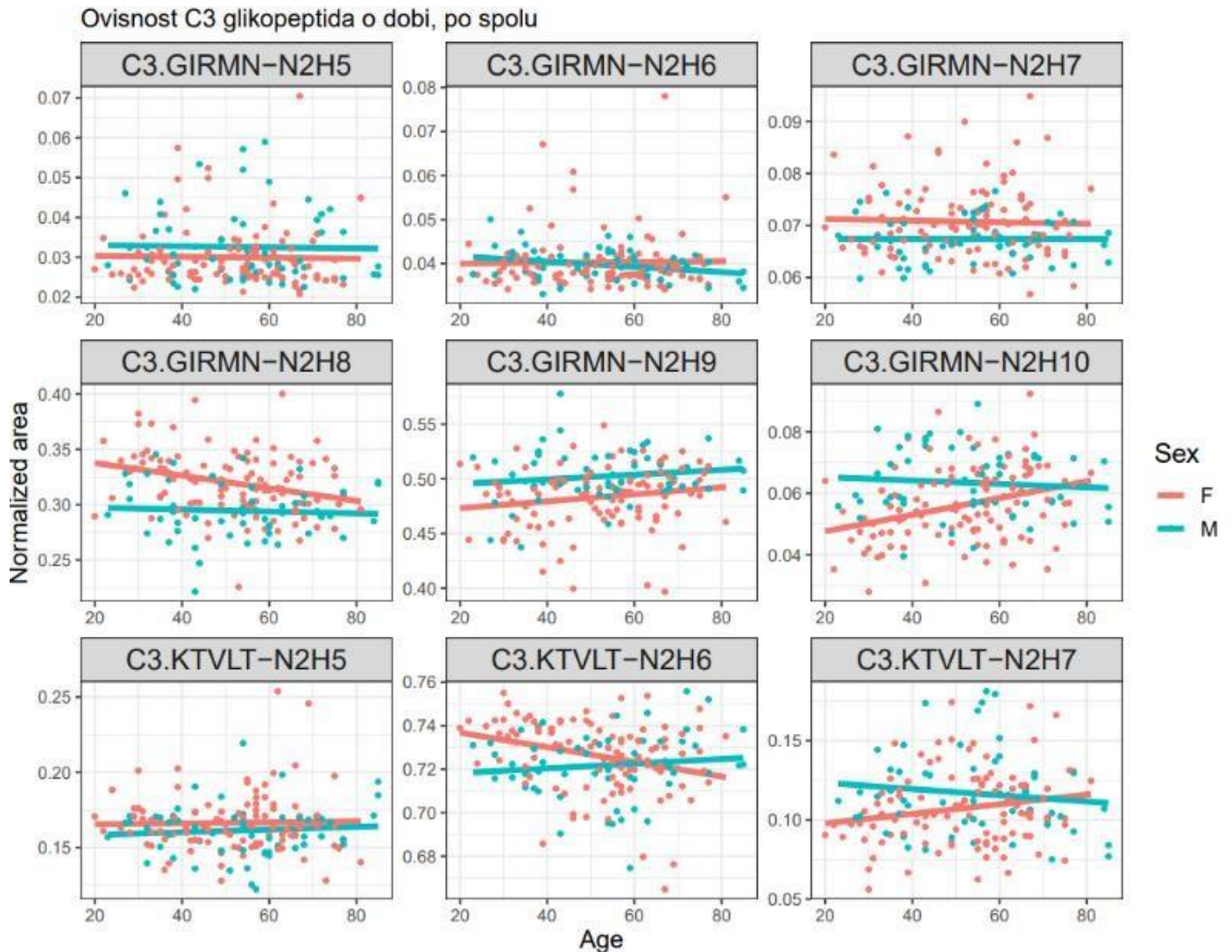
<b>Glikoforma</b>	<b>p_vrijednost</b>	<b>p adj.</b>	<b>signif</b>
C3.GIRMN-N2H5	0,044546558	0,06682	
C3.GIRMN-N2H6	0,749409778	0,74941	
C3.GIRMN-N2H7	0,001965494	0,004422	*
C3.GIRMN-N2H8	3,07379E-08	2,77E-07	*
C3.GIRMN-N2H9	4,35843E-05	0,000196	*
C3.GIRMN-N2H10	9,85302E-05	0,000296	*
C3.KTVLT-N2H5	0,062717465	0,074142	
C3.KTVLT-N2H6	0,065904306	0,074142	
C3.KTVLT-N2H7	0,009959044	0,017926	*

Tablica 6. Prikaz značajnosti utjecaja spola na udio pojedinih glikoformi po glikozilacijskom mjestu.

#### 4.4 Utjecaj dobi na zastupljenost ciljnih glikoformi



Grafički prikaz 4. Linearna regresija udjela pojedine glikoforme na svakom glikozilacijskom mjestu u ovisnosti o dobi. U ovom prikazu, nagib pravca indikator je značajnosti razlike u raspodjeli ispitanika po dobnim skupinama. U pojedinim glikoformama, poput C3.GIRMN-N2H8, C3.GIRMN-N2H9, C3.GIRMN-N2H10 te C3.KTVLT-N2H6 postoji trend opadanja ili porasta glikoforme s porastom godina, te je utvrđen iznimno nizak utjecaj dobi na prisutnost određene glikoforme.



Grafički prikaz 5. Linearna regresija udjela pojedine glikoforme u ovisnosti o dobi po spolu. Iz ovog prikaza vidljive su spolne razlike u glikoformama za koje je statistički utvrđena značajna razlika u raspodjeli.

#### 4.5 Potencijal C3 komponente komplementa kao biljega patoloških stanja

C3 komponenta komplementa u prethodnim je istraživanjima pokazala dobar biomarkerski potencijal s obzirom na promjenu zastupljenosti visokomanoznih glikoformi na dva glikozilacijska mjesta u različitim patološkim stanjima. Ovim istraživanjem analizirali smo interindividualne razlike u varijabilnosti poznatih glikoformi u ovisnosti o spolu i dobi u zdravih ispitanika. Rezultati istraživanja pokazuju visoku konzistenciju N-glikozilacijskih obrazaca u fiziološkim uvjetima s

minimalnim interindividualnim razlikama. Stabilnost i konzistencija N-glikozilacije C3 glikoproteina ključna je za razvoj njegovog biomarkerskog potencijala, obzirom da optimalan biomarker mora pokazivati značajne promjene isključivo u patološkim stanjima.

Utvrđene interindividualne razlike u pojedinim glikoformama:

1. C3.GIRMN-N2H5 kompozicije Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>

Sveukupno najmanje zastupljena glikoforma na oba glikozilacijska mjesta u zdrave populacije, ne pokazuje statistički značajnu razliku u udjelu kod muškaraca i žena, ni razliku po dobnim skupinama.

2. C3.GIRMN-N2H6 kompozicije Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>

Pokazuje blago povišeni udio kod zdravih muškaraca, ali bez statističke značajnosti. Nije prisutna razlika u zastupljenosti ovisno o dobi.

3. C3.GIRMN-N2H7 kompozicije Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>

Najzastupljenija glikoforma na glikozilacijskom mjestu C3.GIRMN. Pokazuje statistički značajan povećani udio kod žena koja s rastom dobi blago opada. Kod muškaraca udio ostaje isti u svim dobnim skupinama.

4. C3.GIRMN-N2H8 kompozicije Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>

Prisutan je statistički značajan povećan udio kod žena, koja s godinama opada, dok u muškaraca udio glikoforme ostaje isti.

5. C3.GIRMN-N2H9 kompozicije Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>

Prisutna je statistički značajan povećani udio kod muškaraca. Zastupljenost ove glikoforme s godinama se povećava i kod muškaraca i kod žena.

6. C3.GIRMN-N2H10 kompozicije Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>

Prisutan je statistički značajan povećani udio kod muškaraca. S godinama, udio ove glikoforme značajno raste u žena, a opada kod muškaraca.

7. C3.KTVLT-N2H5 kompozicije Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>

Nema statistički značajne spolne razlike u zastupljenosti ove glikoforme, te se primjećuje blagi rast u zastupljenosti s porastom godina.

8. C3.KTVLT-N2H6 kompozicije Man6GlcNAc2

Postoji blago povišen udio kod žena koji statistički nema značajnosti. S godinama udio ove glikoforme značajno opada kod žena, dok blago raste kod muškaraca.

9. C3.KTVLT-N2H7 kompozicije Man7GlcNAc2

Prisutan je statistički značajan udio kod muškaraca. S porastom godina zastupljenost ove glikoforme raste kod žena, dok opada muškaraca.

## 5. ZAKLJUČCI

- C3 glikoprotein ima dva glikozilacijska mjesta okupirana visokomanoznim glikanima
- Man5GlcNAc2 je najmanje zastupljena struktura na oba glikozilacijska mjesta kod zdravih osoba
- Man7GlcNAc2 je najzastupljenija struktura na glikozilacijskom mjestu C3.GIRMN kod zdravih osoba
- Man6GlcNAc2 je najzastupljenija struktura na glikozilacijskom mjestu C3.KTVLT-N2H6 kod zdravih osoba
- Dob ima iznimno nizak utjecaj na N-glikozilaciju C3 glikoproteina što ga čini različitim od drugih do sada ispitivanih proteina
- Postoje razlike u razini N-glikana na C3 glikoproteinu između muškaraca i žena
- Promatrano odvojeno po spolu, pojedine glikanske strukture pokazuju različite trendove u ovisnosti o dobi kod muškaraca i žena
- Iako ga ne treba zanemariti kod evaluacije dijagnostičkog potencijala, prilično nizak utjecaj dobi i spola na glikozilaciju C3 glikoproteina čine ga robusnijim potencijalnim dijagnostičkim biljgom od drugih, do sada ispitanih, glikoproteina



## 6. LITERATURA:

1. Varki A, Lowe JB. Biological Roles of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1897/>
2. Shabir, Osman. 2021. What is a Glycoprotein?. News-Medical, viewed 09 August 2024, <https://www.news-medical.net/health/What-is-a-Glycoprotein.aspx>.
3. Gagneux P, Hennet T, Varki A. Biological Functions of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579984/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.7
4. Prof. dr. sc. Jerka Dumić, Nastavni materijal kolegija Fizikalna biokemija, prezentacija Posttranslacijske modifikacije, ak. God. 2020/2021. Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
5. Prof. dr. sc. Gordan Lauc, Nastavni materijal kolegija Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom, prezentacija Posttranslacijske modifikacije u regulaciji staničnih procesa; Glikoproteini: struktura, funkcija i biosinteza, ak. God. 2020/2021. Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
6. Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation – an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol. BioSyst.*, 2010,6, 2373-2379.
7. Schoberer J, Shin YJ, Vavra U, Veit C, Strasser R. Analysis of Protein Glycosylation in the ER. *Methods Mol Biol.* 2018;1691:205-222. doi: 10.1007/978-1-4939-7389-7\_16. PMID: 29043680; PMCID: PMC7039702.



8. Varki A, Sharon N 2009. Historical Background. In Essentials of glycobiology (ed. Varki A, et al. ), pp. 1–22 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
9. Higel, Fabian & Seidl, Andreas & Sörgel, Fritz & Friess, Wolfgang. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 100. 10.1016/j.ejpb.2016.01.005.
10. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Volume 1860, Issue 8, 2016, Pages 1574-1582, ISSN 0304-4165, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.016>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416515002883>)
11. Porter JJ, Wildsmith J, Melm CD, Schuchard MD, et al. Absolute Quantification of the Lower Abundance Proteome Through Immunoaffinity Depletion of the Twenty Most Abundant Proteins in Human Serum. *Sigma-Aldrich Biotechnology*. P.O. Bo 14508. St. Louis, MO 63178. 2006.
12. Crossland, Rachel & Perutelli, Francesca & Bogunia-Kubik, Katarzyna & Mooney, Nuala & Gašperov, Nina & Pucic Bakovic, Maja & Greinix, Hildegard & Weber, Daniela & Holler, Ernst & Pulanić, Dražen & Wolff, Daniel & Dickinson, Anne & Inngjerdigen, Marit & Grce, Magdalena. (2020). Potential Novel Biomarkers in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Frontiers in Immunology*. 11. 10.3389/fimmu.2020.602547.
13. Dall'Olio F. *Glycobiology of Aging*. *Subcell Biochem*. 2018;90:505-526. doi: 10.1007/978-981-13-2835-0\_17. PMID: 30779020.
14. Ivan Gudelj, Gordan Lauc, Marija Pezer, Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases, *Cellular Immunology*, Volume 333, 2018, Pages 65-79, ISSN 0008-8749,

<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.009>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874918303253>)

15. Maverakis, Emanuel & Kim, Kyoungmi & Shimoda, Michiko & Gershwin, M. & Patel, Forum & Wilken, Reason & Raychaudhuri, Siba & Ruhaak, Lucia & Lebrilla, Carlito. (2015). Glycans In The Immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A Critical Review. *Journal of Autoimmunity*. 316. 10.1016/j.jaut.2014.12.002.
16. Dekkers G, Rispens T, Vidarsson G. Novel Concepts of Altered Immunoglobulin G Galactosylation in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018 Mar 19;9:553. doi: 10.3389/fimmu.2018.00553. PMID: 29616041; PMCID: PMC5867308.
17. Štambuk J, Nakić N, Vučković F, Pučić-Baković M, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, Novokmet M, Keser T, Vilaj M, Štambuk T, Gudelj I, Šimurina M, et al., Global variability of the human IgG glycome. *Aging (Albany NY)*. 2020 Aug 12;12(15):15222-15259. doi: 10.18632/aging.103884. Epub 2020 Aug 12. PMID: 32788422; PMCID: PMC7467356.
18. Knezević A, Polasek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wright A, Kolcic I, O'Donoghue N, Bones J, Rudd PM, Lauc G. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res*. 2009 Feb;8(2):694-701. doi: 10.1021/pr800737u. PMID: 19035662.
19. Pucić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, Gornik O, Supraha-Goreta S, Wormald MR, Redzić I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, Wilson JF, Rudan I, Wuhner M, Rudd PM, Josić D, Lauc G. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Oct;10(10):M111.010090. doi: 10.1074/mcp.M111.010090. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21653738; PMCID: PMC3205872.

20. Trbojević-Akmačić, I., Vučković, F., Pribić, T. *et al.* Comparative analysis of transferrin and IgG N-glycosylation in two human populations. *Commun Biol* **6**, 312 (2023). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04685-6>
21. Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2001 Apr;180:35-48. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1800103.x. PMID: 11414361.
22. Max Crispin MD, Ritchie GE, Critchley AJ, Paul Morgan B, Wilson IA, Dwek RA, et al. Monoglucosylated glycans in the secreted human complement component C3: implications for protein biosynthesis and structure. *FEBS Letters.* 2004 May 21;566(1– 3):270–4.
23. Brian V. Geisbrecht, John D. Lambris, Piet Gros, Complement component C3: A structural perspective and potential therapeutic implications, *Seminars in Immunology*, Volume 59, 2022, 101627, ISSN 1044-5323, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2022.101627>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532322000446>)
24. Joris R. Delanghe, Marijn M. Speeckaert, Chapter Two - Host polymorphisms and COVID-19 infection, Editor(s): Gregory S. Makowski, *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier, Volume 107, 2022, Pages 41-77, ISSN 0065-2423, ISBN 9780323988476, <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2021.07.002>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006524232100055X>)
25. Prof. dr. sc. Jerka Dumić, Nastavni materijal kolegija Imunologija, prezentacija Imunobiologija – komplement citokini i kemokini, ak. God. 2020/2021. Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
26. Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, Lambris JD. Complement component C3 - The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev.* 2016 Nov;274(1):33–58.

27. Hertle E, van Greevenbroek MM, Stehouwer CD. Complement C3: an emerging risk factor in cardiometabolic disease. *Diabetologia*. 2012 Apr;55(4):881-4. doi: 10.1007/s00125-012-2462-z. Epub 2012 Jan 27. PMID: 22282163; PMCID: PMC3295998.
28. Šoić D, Keser T, Štambuk J, Kifer D, Pociot F, Lauc G, Morahan G, Novokmet M, Gornik O. High-Throughput Human Complement C3 N- Glycoprofiling Identifies Markers of Early Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children // *Molecular & cellular proteomics*, 21 (2022), 10; 100407, 13. doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100407
29. Šoić D, Štambuk J, Tijardović M, Keser T, Lauc G, Bulum T, Lovrenčić MV, Rebrina SV, Tomić M, Novokmet M, Smirčić-Duvnjak L, Gornik O. Human complement component C3 N-glycome changes in type 1 diabetes complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 May 24;14:1101154. doi: 10.3389/fendo.2023.1101154. PMID: 37293493; PMCID: PMC10244649.
30. Ruhaak LR, Xu G, Li Q, Goonatilleke E, Lebrilla CB. Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. *Chem Rev*. 2018 Sep 12;118(17):7886-7930. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00732. Epub 2018 Mar 19. PMID: 29553244; PMCID: PMC7757723.
31. Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, Petrović T, Deriš H, Wuhrer M, Lauc G. *Chemical Reviews* 2022 122 (20), 15865-15913, DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c01031
32. de Haan N, Pučić-Baković M, Novokmet M, Falck D, Lageveen-Kammeijer G, Razdorov G, Vučković F, Trbojević-Akmačić I, Gornik O, Hanić M, Wuhrer M, Lauc G; The Human Glycome Project. Developments and perspectives in high-throughput protein glycomics: enabling the analysis of thousands of samples. *Glycobiology*. 2022 Jul 13;32(8):651-663. doi: 10.1093/glycob/cwac026. PMID: 35452121; PMCID: PMC9280525.

33. Dalpathado DS, Desaire H. Glycopeptide analysis by mass spectrometry. *Analyst*. 2008 Jun;133(6):731-8. doi: 10.1039/b713816d. Epub 2008 Mar 19. PMID: 18493671.
34. R. Zhu, L. Zacharias, K.M. Wooding, W. Peng, Y. Mechref, Chapter Twenty-One - Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages, Editor(s): Arun K. Shukla, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 585, 2017, Pages 397-429, ISSN 0076-6879, ISBN 9780128097427, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.11.009>.  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687916304281>)
35. Xiao, H., Chen, W., Smekens, J.M. et al. An enrichment method based on synergistic and reversible covalent interactions for large-scale analysis of glycoproteins. *Nat Commun* 9, 1692 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04081-3>
36. Gab-Allah, Mohamed & Kim, Jeongkwon. (2024). A Comprehensive Review of Recent Advances in the Enrichment and Mass Spectrometric Analysis of Glycoproteins and Glycopeptides in Complex Biological Matrices. *Mass Spectrometry Letters*. 15. 1-25. 10.5478/MSL.2024.15.1.1.
37. Nonis SG, Haywood J, Schmidberger JW, Mackie ERR, Soares da Costa TP, Bond CS, Mylne JS. Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase. *Plant Cell*. 2021 Aug 31;33(8):2794-2811. doi: 10.1093/plcell/koab130. PMID: 34235541; PMCID: PMC8408470.
38. Liu H, Zhang N, Wan D, Cui M, Liu Z, Liu S. Mass spectrometry-based analysis of glycoproteins and its clinical applications in cancer biomarker discovery. *Clinical Proteomics*. 2014 Apr 10;11(1):14

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1 SAŽETAK

Glikozilacija je ko- i posttranslacijska modifikacija koja utječe na smatanje, topljivost, strukturu te samu funkciju proteina. N-glikozilacijom nastaju kompleksni i hibridni podtipovi N-glikana koji su prisutni na većini glikoproteina, dok je visokomanozni podtip rjeđe prisutan. Istraživanja su pokazala da promjene u glikozilaciji proteina prate patološka stanja poput karcinoma, šećerne bolesti, starenja i drugih, što im daje potencijal dijagnostičkih biljega.

C3 komponenta komplekta je glikoprotein koji sadrži dva glikozilacijska mjesta s visokomanoznim glikanima. Nepobitna je uloga ovog proteina u imunološkim procesima koji su podloga za razvoj mnogih bolesti. Prethodna istraživanja utvrdila su razlike u zastupljenosti pojedinih visokomanoznih glikoformi u bolesnih ispitanika. U ovom istraživanju, po prvi puta, analizirane su interindividualne razlike glikozilacije C3 proteina kod zdravih ispitanika kako bi se postavila podloga za daljnja istraživanja njegovog dijagnostičkog potencijala. Pretpostavka istraživanja je da je glikozilacija C3 glikoproteina ovisna o dobi i spolu ispitanika, kao što je pokazano za neke druge ispitivane proteine.

Provedena je LC-ESI-MS analiza obogaćenih glikopeptida kako bi se utvrdila zastupljenost 9 visoko-manoznih glikoformi u 162 ispitanika oba spola u rasponu godina od 20 do 85. Rezultati analize pokazali su statistički značajne, iako ne izražene, interindividualne razlike u 5 glikoformi s obzirom na spol ispitanika. Dob gotovo da i nije imala utjecaj na glikozilaciju C3 glikoproteina kod ispitivane populacije, iako nakon podjele ispitanika po spolu taj utjecaj je malo povećan. Iako ga ne treba zanemariti kod evaluacije dijagnostičkog potencijala, prilično nizak utjecaj dobi i spola na glikozilaciju C3 glikoproteina čine ga robusnijim potencijalnim dijagnostičkim biljegom od drugih, do sada ispitanih, glikoproteina.

### 7.2 SUMMARY

Glycosylation is a co- and post-translational modification that affects the folding, solubility, structure, and function of proteins. N-glycosylation produces complex and hybrid subtypes of N-glycans that are present on most glycoproteins, while the high-mannose subtype is less common. Research has shown that changes in protein glycosylation accompany pathological conditions such as cancer, diabetes, aging, and others, giving them potential as diagnostic markers.

The C3 component of complement is a glycoprotein that contains two glycosylation sites with high-mannose glycans. The role of this protein in immune processes, which underlie the development of many diseases, is indisputable. Previous studies have identified differences in the prevalence of certain high-mannose glycoforms in diseased subjects. In this study, for the first time, interindividual differences in the glycosylation of the C3 protein in healthy subjects were analyzed to establish a basis for further research into its diagnostic potential. The hypothesis of the study is that the glycosylation of the C3 glycoprotein depends on the age and sex of the subjects, as has been shown for some other proteins studied.

An LC-ESI-MS analysis of enriched glycopeptides was conducted to determine the prevalence of 9 high-mannose glycoforms in 162 subjects of both sexes, ranging in age from 20 to 85. The results of the analysis showed statistically significant, though not pronounced, interindividual differences in 5 glycoforms with respect to the sex of the subjects. Age had almost no influence on the glycosylation of the C3 glycoprotein in the studied population, although this influence slightly increased when the subjects were divided by sex. Although it should not be overlooked in the evaluation of diagnostic potential, the relatively low influence of age and sex on the glycosylation of the C3 glycoprotein makes it a more robust potential diagnostic marker compared to other glycoproteins studied so far.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## UTJECAJ SPOLA I DOBI NA C3 N-GLIKOM

Lucija Žunić

### SAŽETAK

Glikozilacija je ko- i posttranslacijska modifikacija koja utječe na smatanje, topljivost, strukturu te samu funkciju proteina. N-glikozilacijom nastaju kompleksni i hibridni podtipovi N-glikana koji su prisutni na većini glikoproteina, dok je visokomanozni podtip rjeđe prisutan. Istraživanja su pokazala da promjene u glikozilaciji proteina prate patološka stanja poput karcinoma, šećerne bolesti, starenja i drugih, što im daje potencijal dijagnostičkih biljega.

C3 komponenta komplemента je glikoprotein koji sadrži dva glikozilacijska mjesta s visokomanoznim glikanima. Nepobitna je uloga ovog proteina u imunološkim procesima koji su podloga za razvoj mnogih bolesti. Prethodna istraživanja utvrdila su razlike u zastupljenosti pojedinih visokomanoznih glikoformi u bolesnih ispitanika. U ovom istraživanju, po prvi puta, analizirane su interindividualne razlike glikozilacije C3 proteina kod zdravih ispitanika kako bi se postavila podloga za daljnja istraživanja njegovog dijagnostičkog potencijala. Pretpostavka istraživanja je da je glikozilacija C3 glikoproteina ovisna o dobi i spolu ispitanika, kao što je pokazano za neke druge ispitivane proteine.

Provedena je LC-ESI-MS analiza obogaćenih glikopeptida kako bi se utvrdila zastupljenost 9 visoko-manoznih glikoformi u 162 ispitanika oba spola u rasponu godina od 20 do 85. Rezultati analize pokazali su statistički značajne, iako ne izražene, interindividualne razlike u 5 glikoformi s obzirom na spol ispitanika. Dob gotovo da i nije imala utjecaj na glikozilaciju C3 glikoproteina kod ispitivane populacije, iako nakon podjele ispitanika po spolu taj utjecaj je malo povećan. Iako ga ne treba zanemariti kod evaluacije dijagnostičkog potencijala, prilično nizak utjecaj dobi i spola na glikozilaciju C3 glikoproteina čine ga robusnijim potencijalnim dijagnostičkim biljegom od drugih, do sada ispitanih, glikoproteina.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 11 grafičkih prikaza, 66 tablica i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikozilacija, glikoprotein, glikoforma, LC-ESI-MS



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

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

**Dr. sc. Branimir Plavša**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Andrea Čeri**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### THE INFLUENCE OF GENDER AND AGE ON C3 N-GLYCOME

Lucija Žunić

#### SUMMARY

Glycosylation is a co- and post-translational modification that affects the folding, solubility, structure, and function of proteins. N-glycosylation produces complex and hybrid subtypes of N-glycans that are present on most glycoproteins, while the high-mannose subtype is less common. Research has shown that changes in protein glycosylation accompany pathological conditions such as cancer, diabetes, aging, and others, giving them potential as diagnostic markers.

The C3 component of complement is a glycoprotein that contains two glycosylation sites with high-mannose glycans. The role of this protein in immune processes, which underlie the development of many diseases, is indisputable. Previous studies have identified differences in the prevalence of certain high-mannose glycoforms in diseased subjects. In this study, for the first time, interindividual differences in the glycosylation of the C3 protein in healthy subjects were analyzed to establish a basis for further research into its diagnostic potential. The hypothesis of the study is that the glycosylation of the C3 glycoprotein depends on the age and sex of the subjects, as has been shown for some other proteins studied.

An LC-ESI-MS analysis of enriched glycopeptides was conducted to determine the prevalence of 9 high-mannose glycoforms in 162 subjects of both sexes, ranging in age from 20 to 85. The results of the analysis showed statistically significant, though not pronounced, interindividual differences in 5 glycoforms with respect to the sex of the subjects. Age had almost no influence on the glycosylation of the C3 glycoprotein in the studied population, although this influence slightly increased when the subjects were divided by sex. Although it should not be overlooked in the evaluation of diagnostic potential, the relatively low influence of age and sex on the glycosylation of the C3 glycoprotein makes it a more robust potential diagnostic marker compared to other glycoproteins studied so far.

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

Thesis includes: 42 pages, 11 figures, 6 tables and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycosylation, glycoprotein, glycoform, LC-ESI-MS

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

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

**Branimir Plavša, Ph.D.** *Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

**Andrea Čeri, Ph.D.** *Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: August 2024.