

Strukturalna analiza N-glikoma krvne plazme dugoživućeg golokrtičastoga štakora (*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842)

Habazin, Siniša

Doctoral thesis / Doktorski rad

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:564336>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Siniša Habazin

**Strukturalna analiza N-glikoma
krvne plazme dugoživućeg
golokrtičastoga štakora
(*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Siniša Habazin

**Strukturalna analiza N-glikoma
krvne plazme dugoživućeg
golokrtičastoga štakora
(*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842)**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Dr. sc. Mislav Novokmet, znanstveni suradnik

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Siniša Habazin

**Structural analysis of blood plasma
N-glycome from a long-lived
naked mole-rat
(*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842)**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Dr. Mislav Novokmet, research associate

Zagreb, 2025.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. u Zagrebu, pod vodstvom znanstvenog suradnika dr. sc. Mislava Novokmeta, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORU

Dr. sc. Mislav Novokmet diplomirao je 2006. godine molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2006. do 2007. bio je zaposlen kao asistent u Grupi za molekularnu mikrobiologiju na Botaničkom zavodu istog fakulteta, nakon čega prelazi u Odjel istraživanja i razvoja farmaceutske tvrtke PLIVA d.d. gdje radi na razvoju biološki sličnih lijekova. U privatnu tvrtku Genos d.o.o. prelazi 2009. godine gdje tijekom 15 godina rada u području najprije analize DNA i zatim glikobiologije uvodi nove proizvode i analitičke metode, a od 2019. voditelj je Laboratorija za spektrometriju masa. Doktorirao je 2013. godine na poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom studiju Molekularne bioznanosti koji se izvodi pri Sveučilištu u Osijeku uz suradnju Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković. Tijekom 2014. boravio je kao gostujući znanstvenik na Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems u Magdeburgu u grupi za bioprocenu analitiku. Autor je ili koautor ukupno 55 izvornih znanstvenih radova (H-indeks: 29; i10-indeks: 38; ukupno citata: 4145) te niza priopćenja na znanstvenim skupovima. U znanstveno zvanje znanstvenog suradnika u području prirodnih znanosti, znanstveno polje biologija, izabran je 2019. godine.

ZAHVALE

Ova doktorska disertacija pripada u danas sve malobrojnija istraživanja koja su potaknuta isključivo maštom i znatiželjom. Zato i ne može biti proizvod sanjarećeg istraživača samog, već i onih koji su mu to omogućili, znajući da su rezultati i otkrića koje nitko prije njega nije držao u rukama, znanstveniku najveća nagrada. Zahvaljujem se stoga ponajprije mentoru dr. sc. Mislavu Novokmetu na ukazanom povjerenju, savjetima te potpunoj slobodi da ovo istraživanje osmislim i provedem samostalno. Također, hvala prof. dr. sc. Gordanu Lauču na financiranju dokorskog studija, vrhunskim materijalnim uvjetima, instrumentima i opremi u Genosu kao prilično jedinstvenom mjestu za rad.

Mojim MS-ovcima Mislavu, Genadiju, Jerku, Jeleni i Natali na druženju svih ovih godina i svemu što ste me naučili, a možda i ja vas ponešto.

Posebno hvala Juliji na beskonačnim ručkovima, kavama i burgerima, raspravama, životnim mudrostima i uzajamnoj podršci.

Prof. dr. sc. Ewanu St. John Smithu sa Sveučilišta u Cambridgeu koji mi je ustupio uzorke za istraživanje.

Prijateljima i kolegama Nikoli, Petru, Luki, Mladenki, Lidiji, Domagoju, Sonji, Mateji od kojih me neki prate još od osnovne i srednje škole, faksa i prvih poslova, trpe moje hireve i slušaju priče o neobičnim stvorenjima, neizvedivim metodama i čudesnim zakutcima znanosti. Velika hvala mojim profesorima i mentorima Sonji Rupčić Petelinc, dr. sc. Zoranu Weihnachtu, prof. dr. sc. Renati Matoničkin Kepčija i dr. sc. Vesni Svetličić što su vjerovali u mene te na znanju, usmjeravanju i životnom iskustvu koje su mi prenijeli.

Roditeljima Igoru i Tamari na bezuvjetnoj podršci, odricanju i slobodi da odaberem znanost kao najljepši životni poziv.

Wer Großes will, muß sich zusammenraffen;
In der Beschränkung zeigt sich erst der Meister,
Und das Gesetz nur kann uns Freiheit geben.

J. W. von Goethe, *Natur und Kunst*

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

**Strukturna analiza N-glikoma krvne plazme dugoživućeg golokrtičastoga štakora
(*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842)**

Siniša Habazin

Genos d.o.o., Borongajska cesta 83h, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Golokrtičasti štakor (GŠ) (*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842) je eusocijalni fosorijalni glodavac čiji je prirodni areal Istočna Afrika, a zbog životnog vijeka koji prelazi 30 godina je atraktivan modelni organizam u biologiji starenja. Molekularni mehanizmi otpornosti na kancerogenezu, neurodegeneraciju, hipoksiju i neke vrste boli povezani su sa održavanjem proteostaze u čemu sudjeluju i posttranslacijske modifikacije proteina. Dinamika i raznolikost glikozilacije proteina u GŠ do sada nije istraživana. U ovom je radu pomoću tekućinske kromatografije i spektrometrije masa provedena strukturna analiza N-glikoma krvne plazme GŠ. Određene su strukture i udjeli 160 različitih N-glikana među kojima se ističe strukturni motiv 4-*O*-acetilacije sijalinskih kiselina. Glikoproteomskom analizom otkriveno je da takvi sijaloglikani potječu s inhibitora proteaza u krvnoj plazmi te je pretpostavljen njihov zaštitni i stabilizirajući utjecaj na proteine.

173 stranice, 58 slika, 5 tablica, 236 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: glikozilacija, proteomika, spektrometrija masa, ugljikohidrati, starenje

Mentor: dr. sc. Mislav Novokmet, znanstveni suradnik

Ocjenjivači:

doc. dr. sc. Toma Keser

prof. dr. sc. Biljana Balen

prof. dr. sc. Göran Klobučar

Rad prihvaćen: 15. siječnja 2025.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

**Structural analysis of blood plasma N-glycome from a long-lived naked mole-rat
(*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842)**

Siniša Habazin

Genos Ltd., Borongajska cesta 83h, 10 000 Zagreb, Croatia

The naked mole-rat (NMR) (*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842) is an eusocial fossorial rodent native to East Africa. Its exceptionally long lifespan of over 30 years makes it a popular non-conventional model organism in the biology of ageing and longevity. Molecular mechanisms underlying resistance to cancerogenesis, neurodegeneration, hypoxia and certain types of pain are related to the maintenance of proteostasis where key players are protein post-translational modifications. The dynamics and diversity of protein glycosylation in NMR are completely unexplored. In this study, a structural analysis of NMR blood plasma N-glycome was performed using liquid chromatography and mass spectrometry. A total of 160 different N-glycans were annotated and quantified. The core structural motif in the N-glycome of NMR was the presence of 4-*O*-acetylated sialic acids. Employing a glycoproteomic analysis, 4-*O*-acetylated sialo-N-glycans were pinpointed to plasma protease inhibitors and their protective and stabilizing effect on the proteins was inferred.

173 pages, 58 figures, 5 tables, 236 references, original in: Croatian

Keywords: glycosylation, proteomics, mass spectrometry, carbohydrates, aging

Supervisor: Mislav Novokmet, PhD, research associate

Reviewers:

Toma Keser, PhD, assistant professor

Biljana Balen, PhD, full professor

Göran Klobučar, PhD, full professor

Thesis accepted: January 15th, 2025

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Hipoteza	8
1.2 Ciljevi istraživanja	8
2. LITERATURNI PREGLED	9
2.1 Biosinteza i tipovi N-glikana	10
2.2.1 Prva faza – biosinteza prekursora N-glikana	11
2.2.2 Druga faza – obrada N-glikana	13
2.2.3 Dozrijevanje N-glikana	16
2.2 Sijalinske kiseline	17
2.2.1 Biosinteza sijalinskih kiselina	19
2.2.1 O-acetilacija sijalinskih kiselina	22
2.3 N-glikozilacija proteina krvne plazme	23
2.4 Biologija i ekologija golokrtičastoga štakora	26
2.5. Golokrtičasti štakor kao modelni organizam	30
2.6 Molekularni aspekti usporenog starenja i dugovječnosti golokrtičastoga štakora	32
2.6.1 Proteomika golokrtičastoga štakora	34
3. MATERIJALI I METODE	38
3.1 Kemikalije i enzimi	39
3.2 Laboratorijski uređaji i pribor	40
3.3 Kromatografi i vezani analitički sustavi LC-MS	41
3.4 Pokusne životinje i uzorak krvne plazme	42
3.5 Eksperimentalni dizajn	42
3.6 Priprema pufera i pokretnih faza za tekućinsku kromatografiju	43
3.7 Enzimaska deglikozilacija proteina krvne plazme	45
3.8 Derivatizacija oslobođenih N-glikana prokainamidom	45
3.8.1 Pročišćavanje derivatiziranih N-glikana ekstrakcijom na čvrstu fazu	45
3.9 Hidroliza dekstrana i derivatizacija izomaltooligosaharida za određivanje glukoznih jedinica N-glikana	46
3.10 Pristup LC-MS analizi N-glikoma krvne plazme	47
3.11 Frakcionacija N-glikana prema naboju	49
3.11.1 Odsoljavanje frakcija ekstrakcijom na čvrstu fazu	50
3.12 HILIC-UPLC-FLD-MS/MS analiza N-glikana	50
3.13 Analiza oslobođenih sijalinskih kiselina	52

3.13.1 RP-UPLC-FLD-MS/MS analiza oslobođenih sijalinskih kiselina	53
3.13.2 De- <i>O</i> -acetilacija sijaliniziranih N-glikana i oslobođenih sijalinskih kiselina	54
3.14 Priprema uzoraka krvne plazme za glikoproteomske analize	55
3.14.1 Pročišćavanje peptida ekstrakcijom na čvrstu fazu	56
3.14.2 Afinitetno pročišćavanje sijaloglikopeptida na titanijevom(IV) oksidu.....	56
3.15 Neciljana glikoproteomska analiza sijaloglikopeptida.....	57
3.15.1 Deglikozilacija sijaloglikopeptida i enzimsko obilježavanje N-glikozilacijskih mjestu izotopom ¹⁸ O	59
3.15.1.1 Pročišćavanje peptida ekstrakcijom na čvrstu fazu.....	59
3.15.2 nanoLC-MS analiza.....	59
3.16 Ciljana (strukturna) glikoproteomska analiza O-acetiliranih sijaloglikopeptida.....	61
3.16.1 nanoLC-MS analiza.....	61
3.17 Analiza podataka	63
3.17.1 Interpretacija fragmentacijskih spektara masa oslobođenih derivatiziranih N-glikana	63
3.17.2 Izračunavanje glukoznih jedinica N-glikana.....	64
3.17.3 Relativna kvantifikacija oslobođenih derivatiziranih N-glikana.....	64
3.17.4 Izračunavanje izvedenih N-glikanskih svojstava	65
3.17.5 Interpretacija fragmentacijskih spektara masa derivatiziranih sijalinskih kiselina ..	66
3.17.6 Analiza podataka neciljane glikoproteomske analize.....	66
3.17.6.1 Analiza obogaćivanja genske ontologije.....	67
3.17.7 Analiza podataka ciljane (strukturne) glikoproteomske analize	67
3.17.8 Parametri N-glikanskog kemijskog prostora proteina krvne plazme GŠ	68
3.17.9 Vizualizacija i dostupnost podataka	69
4. REZULTATI	70
4.1 Strukturna analiza N-glikoma krvne plazme.....	71
4.1.1 Frakcionacija N-glikana prema naboju	71
4.1.2 Neutralni N-glikani	73
4.1.3 Monoanionski N-glikani	80
4.1.4 Dianionski N-glikani	85
4.1.5 Trianionski N-glikani	91
4.1.6 Tetraanionski N-glikani.....	96
4.1.7 Izvedena N-glikanska svojstva ukupnog N-glikoma.....	100
4.2 Određivanje položaja <i>O</i> -acetilne skupine u <i>O</i> -acetiliranim sijalinskim kiselinama na N- glikanima krvne plazme	103

4.3	Analiza ishodišnih proteina s <i>O</i> -acetiliranim sijaloglikanima.....	109
4.3.1	Rezultati neciljane glikoproteomske analize	109
4.3.2	Rezultati ciljane glikoproteomske analize.....	112
4.4	N-glikanski kemijski prostor proteina krvne plazme	115
5.	RASPRAVA.....	118
5.1	Sastav i strukturna obilježja N-glikoma krvne plazme	119
5.1.1	N-glikomi krvne plazme štakora, miša i golokrtičastog štakora se razlikuju.....	120
5.1.1.1	Brojnost i grananje N-glikana	120
5.1.1.2	Rasijecanje N-glikana	121
5.1.1.3	Fukozilacija N-glikana.....	121
5.1.1.4	Sulfatacija N-glikana.....	122
5.1.1.5	Galaktozilacija i α -Gal epitop N-glikana	123
5.1.1.6	Sijalinizacija N-glikana	123
5.2	Sijalinske kiseline na N-glikanima su 4- <i>O</i> -acetilirane	124
5.3	Inhibitori proteaza su glavni ishodišni proteini N-glikana s 4- <i>O</i> -Ac Sia	126
5.3.1	N-glikozilacija inhibitora proteaza.....	127
5.3.3	Potencijalna uloga <i>O</i> -Ac-Sia u N-glikomu krvne plazme golokrtičastog štakora....	129
5.4	Svojstva N-glikanskog kemijskog prostora proteina krvne plazme kao temelj funkcionalnih istraživanja	131
5.5	Glikobiološki aspekt golokrtičastog štakora kao modelnog organizma.....	133
5.5.1	Nedostaci provedenog istraživanja.....	133
6.	ZAKLJUČAK.....	134
7.	POPIS LITERATURE.....	137
8.	PRILOZI.....	154
9.	ŽIVOTOPIS.....	172

POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

$^1D/^2D$	prva i druga kromatografska dimenzija u 2D-LC
2D-LC	dvodimenzijska tekućinska kromatografija
4- <i>O</i> -Ac	4- <i>O</i> -acetilacija
Ac	acetilna skupina, acetilacija
ACN	acetonitril
CID	kolizijom inducirana disocijacija
CMAH	hidroksilaza citidin-monofosfo- <i>N</i> -acetilneuraminske kiseline
Da	Dalton
Dex	dekstran
DMBA	4,5-dimetilbenzen-1,2-diamin
DMSO	dimetil-sulfoksid
EIC	kromatogram odabranog iona (engl. <i>extracted ion chromatogram</i>)
ER	endoplazmatski retikulum
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>electrospray ionization</i>)
FLD	detektor fluorescencije
Fuc	fukoza
GA	Golgijev aparat
Gal	galaktoza
Glc	glukoza
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GO	genska ontologija
GP	N-glikanski pik
GŠ	golokrtičasti štakor
GU	glukozne jedinice
HA	hijaluronan, hijaluronska kiselina
HCD	kolizijom inducirana disocijacija povišene energije (engl. <i>higher-energy collision-induced dissociation</i>)
HILIC	tekućinska kromatografija utemeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HSP	protein toplinskog šoka (engl. <i>heat shock protein</i>)
IH_G	indeks hidrofobnosti N-glikana
K_a	asocijacijska konstanta

kDa	kilodalton
KI	kontaktna inhibicija
KP	krvna plazma
KS	krvni serum
LacNAc	<i>N</i> -acetillaktozamin
LC	tekućinska kromatografija (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LC-MS	tekućinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa
log P	koeficijent raspodjele oktanol-voda
m	molekulska masa
m/z	omjer mase i naboja
Man	manoza
MS/MS	tandemna spektrometrija masa
nanoLC	nano-tekućinska kromatografija (engl. <i>nano-liquid chromatography</i>)
Neu4,5Ac ₂	5- <i>N</i> -acetil-4- <i>O</i> -acetilneuraminska kiselina
Neu4Ac5Gc	4- <i>O</i> -acetil-5- <i>N</i> -glikolilneuraminska kiselina
Neu5Ac	<i>N</i> -acetilneuraminska kiselina
Neu5Ac ₂	mono- <i>O</i> -acetilirana Neu5Ac
Neu5Gc	<i>N</i> -glikolilneuraminska kiselina
Neu5GcAc	mono- <i>O</i> -acetilirana Neu5Gc
N_{mono}	ukupan broj monosaharida u N-glikanu
NulO	nonulosonska kiselina
<i>O</i> -Ac-Sia	<i>O</i> -acetilirana sijalinska kiselina
PGC	porozni grafitizirani ugljik (engl. <i>porous graphitized carbon</i>)
p K_a	konstanta disocijacije kiseline
PNGaza F	peptid: N-glikozidaza F
ProA	prokainamid
PTM	posttranslacijske modifikacije
Qq-TOF-MS	hibridna tandemna spektrometrija masa s detektorom vremena preleta iona
Sia	sijalinska kiselina
SIAE	sijalat- <i>O</i> -acetilesteraza
SNFG	simbolička nomenklatura za glikane (engl. <i>symbolic nomenclature for glycans</i>)
SOAT	sijalat- <i>O</i> -acetiltransferaza
SPE	ekstrakcija na čvrstu fazu (engl. <i>solid phase extraction</i>)
ST	sijaliltransferaza

Sulf	sulfatna skupina
TFA	trifluoroctena kiselina
TIC	kromatogram ukupne ionske struje (engl. <i>total ion chromatogram</i>)
t_r	vrijeme zadržavanja, retencijsko vrijeme
U	jedinica katalitičke aktivnosti enzima
UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. <i>ultra-performance liquid chromatography</i>)
WAX	slabi anionski izmjenjivač (engl. <i>weak anion exchange resin</i>)
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	pobudna i emisijska valna duljina

1. UVOD

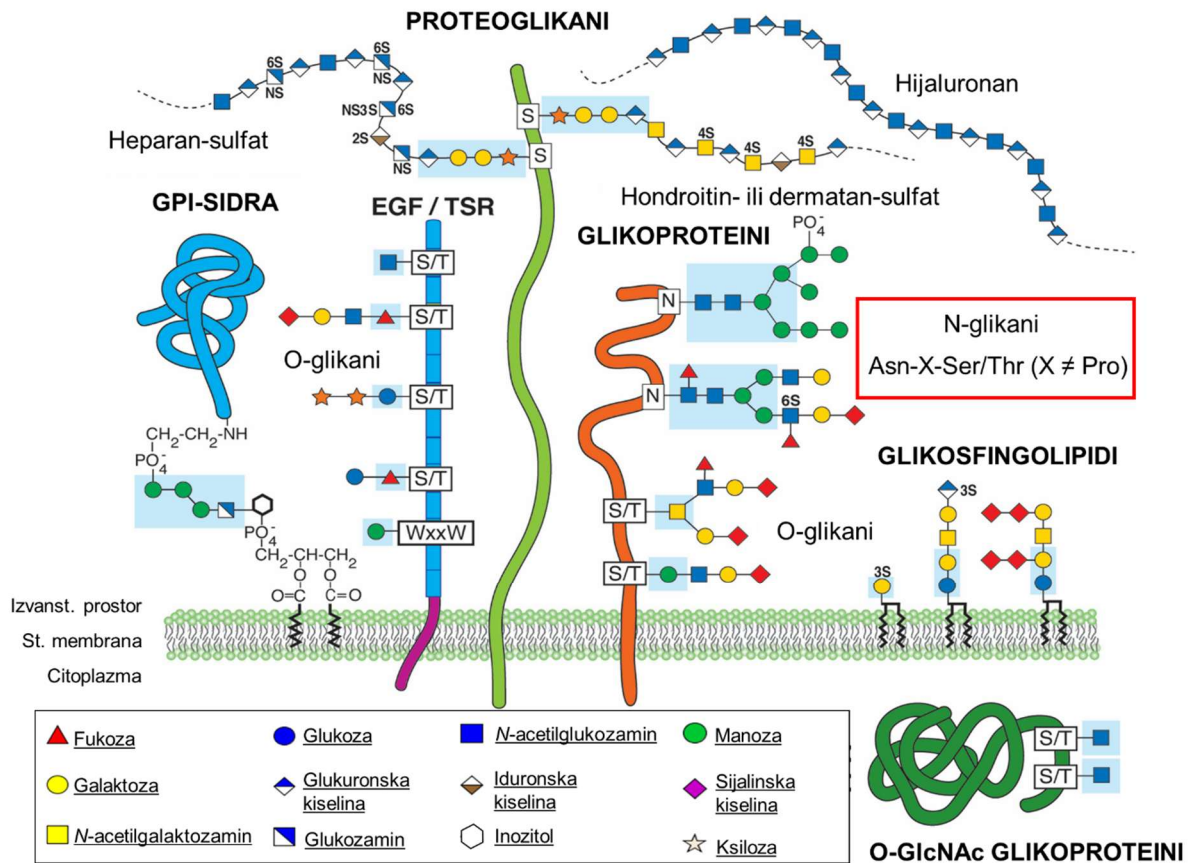
Iako se nukleinske kiseline, lipidi, ugljikohidrati i proteini mogu smatrati tek kemijski strogo definiranim, predvidljivim sekvencama monomera koji ih tvore, ove četiri ključne skupine biomolekula imaju samo naizgled jednostavnu strukturu i dinamiku u organizacijskim razinama živoga svijeta. Evolucijskim su procesima biomolekule oblikovane različitim kemijskim modifikacijama kao odgovor na pojavu sve složenijih metaboličkih procesa, potrebu regulacije biokemijskih puteva, promjene u okolišu ili interakciju s drugim vrstama. Postupnim uvođenjem proteinskih supstrata u još evoluirajuću enzimsku katalizu, naglo je rasla i učestalost raznih, tada vjerojatno još spontanih, kemijskih modifikacija. One su proteinima osiguravale potpuno nove uloge ili prenamijenile neke postojeće, pa su stoga u ovoj skupini i najbrojnije. Svaka modifikacija svojim fizikalno-kemijskim svojstvima utječe na protein na koji je vezana i modulira njegovu pravu funkciju, lokalizaciju, stabilnost i vrijeme poluživota u proteomu na znatno finijoj razini od same primarne strukture (Lee i sur., 2023.).

Posttranslacijske modifikacije proteina (PTM) nastaju reverzibilnim ili ireverzibilnim kovalentnim vezanjem različitih molekula na bočne lance aminokiselina, odnosno C- ili N-kraj proteina nakon njihove biosinteze na ribosomima. Enzimski katalizirano vezanje PTM u obliku malih funkcionalnih skupina najčešće je i pojavljuje se, primjerice, kao fosforilacija, alkilacija, acilacija ili hidroksilacija proteina. Neenzimske PTM *in vivo* poput glikacije i karbamilacije proteina su malobrojnije. Poseban tip PTM predstavlja konjugacija s drugim proteinima ili peptidima kao SUMOilacija, ubikvitinacija i pupilacija. Njima slične modifikacije veće molekulske mase obuhvaćaju lipidacije i vezanja kofaktora. Do danas je opisano preko 500 različitih PTM, od kojih je najzastupljenija fosforilacija, a najčešće modificirane aminokiseline su Ser, Cys, Lys i Thr. U širem se smislu pod PTM proteina mogu smatrati i cijepanje polipeptidnih lanaca proteazama (proteoliza), stvaranje disulfidnih mostova, izomerizacija i racemizacija aminokiselina te razne *in vitro* kemijske modifikacije (Keenan i sur., 2021.).

Posttranslacijska enzimski katalizirana kovalentna modifikacija proteina monosaharidima i oligosaharidima, tj. glikanima, naziva se glikozilacija. Glikoproteini zajedno s glikolipidima, lipopolisaharidima, glikozidima i peptidoglikanima spadaju u glikokonjugate (**Slika 1.1**). Glikozilacija se odvija posredstvom enzima – glikoziltransferaza i glikozidaza – nizom biosintetskih koraka u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevu aparatu, jezgri i citoplazmi te je vrlo česta i strukturno najraznolikija PTM proteina. Zajednička je organizmima iz svih domena života, a uzima se da je više od polovine eukariotskih proteina glikozilirano (Schjoldager i sur., 2020.).

Dijeli se prema atomu iz aminokiseline polipeptidne okosnice na koji je glikan vezan, te su N- i O-glikozilacija proteina najčešće, a C- i S-glikozilacija rijetke (Hofsteenge i sur., 1994.; Olsen i sur., 1998.). Strukturna heterogenost glikozilacije posljedica je postojanja različitih monosaharida, glikozidnih veza, anomernih konfiguracija, izomera, grananja većih struktura te same zauzetosti potencijalnog glikozilacijskog mjesta. Uz to su moguće i različite modifikacije monosaharida poput acetilacije, sulfatacije ili fosforilacije koje im mijenjaju naboj i hidrofobnost. Time se uobičajeno poimanje proteoma proširuje na niz glikoproteoformi, a ukupnost glikana koji modificiraju protein čini njegov glikom. Glikani se ne sintetiziraju prema određenom obrascu niti su kodirani u genomu pa im je raznolikost veća i pružaju mogućnost za brzu biološku inovaciju (Varki, 2017.). Iako kombinatorne mogućnosti kemijskog vezanja desetak monosaharida daju naizgled neizmjeran broj mogućih teoretskih glikanskih struktura, on je ipak konačan jer često biosinteza zbog steričkih efekata, nedostatka odgovarajućih enzima, malih brzina reakcija ili nestabilnih produkata nije moguća. Novosintetizirane strukture također ne smiju biti imunogene, akumulirati se bez svrhe ili interferirati s prepoznavanjem stranih biomolekula. Iako samo oko 2 % genoma sisavaca kodira za glikoziltransferaze, glikozidaze i glikosintetske transportne proteine, glikanski je fenotip ipak indirektno podložan evolucijskim ograničenjima uzrokovanim mutacijama i selekcijom tih proteina-enzima. Tako, s molekularno-evolucijskog stajališta, neki glikani postupno gube svoju funkciju ili dobivaju novu te se u tom procesu izdvajaju strukture i biosintetski koraci koji filogenetski ostaju očuvani (Springer i Gagneux, 2013.).

Uloge glikana su nebrojene i gotovo da nema biološkog procesa u koji nisu uključeni. Glikani su odgovorni za pravilnu funkciju, smatanje, transport, naboj i stabilnost proteina. Međustanične interakcije intrinzičnog prepoznavanja modulirane su glikanima kao ligandima glikan-vezujućih proteina, a isto tako i one ekstrinzične, između domaćina i mikrobnih patogena koji i sami mogu iskoristiti glikane za molekularnu mimikriju kako bi zaobišli imunosni odgovor (Varki i Kornfeld, 2022.). Za to su posebno važni terminalni monosaharidi glikana poput sijalinskih kiselina i njihovih modifikacija. Imunosni odgovor, upala, metastaziranje tumora i apoptoza također u pozadini uvelike ovise o glikanima. Glikozilacija proteina mijenja se u patološkim stanjima i tijekom starenja, ovisna je o spolu ili okolišnim faktorima, kao i o prirođenim poremećajima glikozilacije (Reily i sur., 2019.).



Slika 1.1. Pregled najčešćih tipova glikokonjugata i glikozilacije ljudskih proteina. Glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-usidreni proteini tipični su za membranske proteine prazivotinja, gljiva i eubakterija. U čovjeka je poznato oko 150 GPI-usidrenih proteina koji služe kao receptori, inhibitori proteaza, adhezijske molekule i transcitotski receptori. Ponavljajući motivi (engl. *repeats*) u tipu epidermalnog faktora rasta (EGF) ili trombospondina 1 (TSR) lokalizirani u izvanstaničnom matriksu sudjeluju u Notch signalnom putu odnosno protein-protein interakcijama. Oba proteinska motiva su O-glikozilirana. Proteoglikane čine proteini modificirani dugačkim lancima glikozaminoglikana (GAG) (mukopolisaharida); vezanima tetrasaharidnim mostovima na serinski ostatak u aminokiselinskom sekvonu Ser-Gly-X-Gly ($X \neq \text{Pro}$). Svi GAG su linearni polisaharidi s ponavljajućim disaharidnim jedinicama uronskih kiselina i aminošećera, a mogu biti i sulfatirani (3S, 6S). U izvanstaničnom matriksu tvore makromolekularne komplekse bilo sami ili s hijaluronanom (hijaluronskom kiselinom) i kolagenom te su ključna komponenta vezivnog tkiva. N- i O-glikoproteine razlikuje vezanje N-acetilglukoza iz glikana na dušikov atom amidne skupine asparagina (Asn), odnosno, najčešće, N-acetilgalaktozamina na kisikov atom hidroksilne skupine serina (Ser) ili treonina (Thr). Poseban tip O-glikoziliranih proteina su oni O-GlcNAc tipa; karakteristični za proteine stanične jezgre i citoplazme. Glikosfingolipidi su najčešći tip amfifilnih glikolipida u staničnim membranama, a sadrže sfingoid ili ceramid s vezanim glikanom. Važni su za održavanje integriteta stanične membrane, biološko prepoznavanje i adheziju. Monosaharidi su prikazani simboličkom nomenklaturom za glikane (engl. *Symbolic Nomenclature For Glycans*, SNFG). Preuzeto iz Fuster i Esko (2005.) i prilagođeno.

Općenito najbolje istražen i u sisavaca najsloženiji tip glikozilacije proteina je N-glikozilacija koja je predmet ovog istraživanja pa će biti detaljnije razmatrana. Definirana je enzimskim kovalentnim vezanjem oligosaharida – N-glikana – na asparaginski ostatak aminokiselinskog sekvona Asn-X-Ser/Thr ($X \neq \text{Pro}$) proteina kao aglikona (**Slika 1.1**). Ukupnost struktura i svojstava N-glikana proteina, stanica, tkiva ili organa naziva se N-glikom (Stanley i sur., 2017.). N-glikoproteom je N-glikom opisan na razini pojedinog proteina i N-glikozilacijskih mjesta ili proteoma čitavog biološkog sustava. Frustrirajuća raznolikost N-glikozilacije kao PTM proteina danas je zahvaljujući razvoju instrumentnih analitičkih metoda većinom razriješena, što interes glikobiologije premješta na praktičnu primjenu glikana kao biomarkera bolesti i starenja, modifikatora terapijskih peptida i proteina te potencijalnih meta za nove lijekove (Reily i sur., 2019.).

Razvojem visokoprotočnih standardiziranih analiza glikana, kvalitativna i kvantitativna glikomika danas je postala ravnopravna nadopuna drugih „omics“ metoda, poglavito proteomike, lipidomike, genomike i epigenomike (Zoldoš i sur., 2013.). Time glikani postaju interesom kliničkih istraživanja, a promjene N-glikozilacije najčešće se analiziraju na proteinima ljudskih tkiva, krvne plazme ili seruma, urina i mlijeka kao najčešćih uzoraka (Peng i sur., 2018.). Različiti tradicionalni animalni modeli poput glodavaca, pasa, svinja i primata nedvojbeno doprinose translaciji prekliničkih istraživanja, no interspecijske razlike kao što su drugačiji životni vijek, metabolizam, imunološki sustav te anatomska građa i fiziologija organskih sustava često su izvor neuspjeha već u ranim fazama istraživanja (Mukherjee i sur., 2022.). Potencijalni problem je svakako i zanemarivanje razlika u PTM proteina ovih organizama u odnosu na čovjeka, što obuhvaća i sveprisutnu N-glikozilaciju. Najsuvremeniji pristupi sistemske biologije primjenom strojnog učenja i umjetne inteligencije teže ka računalnoj integraciji „omics“ podataka za stvaranje „humaniziranih“ *in silico* animalnih modela koji bi zamijenili one žive (Brubaker i Lauffenburger, 2020.). Međutim, takvi modeli koji na velikoj skali ujedinjuju molekularne aspekte s fenotipom (engl. *molecular-to-phenotype model*), moraju u svojoj podlozi imati opsežne i kvalitetne eksperimentalne podatke, prikupljene uključivo i analizom N-glikoma organizama ili stanica od interesa. To se odnosi i na *in vitro* modele utemeljene na staničnim kulturama, organima na čipu, organoidima ili 3D-isprintanim mikrofiziološkim platformama (Loewa i sur., 2023.). Ti modeli za neke aspekte bolesti koju oponašaju mogu biti relevantni, odnosno imati visok stupanj tzv. kliničke biomimikrije, tek ako se poznaje glikozilacija njihovih proteina.

Glikobiologija najčešće korištenih animalnih modela – miša (*Mus musculus*) i štakora (*Rattus norvegicus*) – prepoznaje se kao važna i sve se češće istražuje. Tako je primjerice za miša već dostupan atlas N-glikozilacije proteina u 16 različitih tkiva (Otaki i sur., 2022.) sličan nedavno objavljenom ljudskom, s profilima N-glikoma tkiva dobivenima oslikavajućom spektrometrijom masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging*, MALDI-MSI) (Wallace i sur., 2024.). Osim toga, takve analize provedene su i na mišjem mozgu i otkrile su veliku strukturnu raznolikost i prostorni raspored N-glikana iz različitih moždanih regija (Lee i sur., 2020.; Noel i sur., 2023.). N-glikom mišje krvne plazme također je dobro istražen (Reiding i sur., 2016.) i upotpunjen analizama N-glikozilacije najvažnijih plazmatskih proteina poput antitijela imunoglobulina G (IgG) (de Haan i sur., 2017.; Maresch i Altmann, 2016.; Zaytseva i sur., 2018.), imunoglobulina M (IgM) (Kumagai i sur., 2019.) i transferina (Mancera-Arteu i sur., 2020.). Dostupni podaci o N-glikozilaciji proteina u štakora skromniji su, a uglavnom obuhvaćaju analize N-glikoma krvnog seruma (Gao i sur., 2015.), antitijela IgG (Habazin i sur., 2021.; Raju i sur., 2000.) i mozga (Chen i sur., 1998.).

Među manje poznate, netradicionalne animalne modele spada i golokrtičasti štakor (*Heterocephalus glaber*) (GŠ); eusocijalni fosorijalni sisavac iz porodice afričkih krtičastih štakora (Bathyergidae) (engl. *blesmols*, njem. *die Sandgräber*) čiji je prirodni areal Istočna Afrika (Jarvis, 1981.). Niz senzornih i ekofizioloških prilagodbi na podzemni kolonijalni život u uvjetima suše i hipoksije, gotovo nepostojeća karcinogeneza, neosjetljivost na neke tipove boli, a ponajviše dugi životni vijek koji prelazi 30 godina, potaknuli su u biologiji starenja interes za GŠ (Buffenstein i sur., 2022.). U posljednjih desetak godina intenzivno se istražuju molekularni mehanizmi u podlozi takvog otpornog i dugovječnog fenotipa. U kontekstu ovog doktorskog rada ključna su proteomska istraživanja GŠ kojih ima nekoliko (Azpurua i sur., 2013.; Heinze i sur., 2018.; Pérez i sur., 2009.; Rodriguez i sur., 2012.). Nažalost, u svima su PTM proteina zanemarene izuzev fosforilacije i deiminacije (citrulinacije) proteina (Al-attar i sur., 2020.; Pamenter i sur., 2019.).

Glikobiologija GŠ potpuno je nepoznata i do sada nije istraživana. Tek jedno istraživanje potvrdilo je N-glikozilaciju α -2-makroglobulina; inhibitora proteaza iz krvne plazme GŠ, ali bez provedene strukturne analize N-glikana (Thieme i sur., 2015.). Nedvojbeno je da i N-glikozilacija kao i ostale PTM proteina opsežno modificiraju proteom GŠ i na još neotkrivene načine utječu na njegovu funkciju i stabilnost.

Tim nepoznanicama motivirano je i ovo istraživanje N-glikoma krvne plazme – lako dostupnog uzorka čiji proteini i njihove modifikacije reflektiraju biološke procese u čitavom organizmu.

Uz pretpostavku da su u GŠ kao i u svih drugih sisavaca proteini N-glikozilirani, glavna su pitanja kolika je strukturna raznolikost, brojnost i udio pojedinih N-glikana koji čine N-glikom krvne plazme? Na ta pitanja odgovorit će se u prvoj fazi istraživanja glikomskim pristupom koji uključuje analizu ukupnih N-glikana oslobođenih s proteina krvne plazme.

Preliminarnim pokusima koji su doveli do ovog doktorskog rada utvrđene su i naznake da N-glikani krvne plazme GŠ sadrže znatnu količinu *O*-acetiliranih sijalinskih kiselina. Taj zanimljiv strukturni motiv odredio je dodatnu, drugu fazu istraživanja u kojoj će se provesti analiza oslobođenih sijalinskih kiselina (sijalomika) i glikoproteomskom analizom otkriti s kojih glikoproteina ti sijalinizirani *O*-acetilirani N-glikani potječu te koja im je potencijalna uloga. U obje faze će za analizu N-glikoma odnosno sijaloma i glikoproteoma biti korištene napredne metode tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Suvremeno shvaćanje glikoma obuhvaća i fizikalno-kemijska svojstva N-glikana koji su u neprestanoj međusobnoj ili interakciji s proteinima, te uz same strukturne karakteristike i brojnost ili udio, omeđuju tzv. glikanski kemijski prostor (Alonso i sur., 2018.). Slijedeći taj koncept, za N-glikane određene strukturnom analizom bit će izračunati jednostavni konstitucijski i fizikalno-kemijski deskriptori: molekulska masa, broj monosaharida u N-glikanu i hidrofobnost N-glikana. Tako nadopunjen skup podataka o N-glikomu krvne plazme GŠ bit će publiciran i poslužit će u budućnosti kao polazište za komparativne i funkcionalne analize.

Čitavo predstavljeno istraživanje osmišljeno je i provedeno na samo jednom uzorku krvne plazme čime je po prvi puta opisan glikobiološki aspekt GŠ kao vrste te je izvorni znanstveni doprinos razvoju novog područja glikomike dugoživućih organizama. Uz to je za očekivati da će potaknuti interes za glikotipizaciju drugih vrsta ili sojeva glodavaca koji će kao modelni organizmi još duže vrijeme ostati nezamjenjivi u biološkim istraživanjima.

1.1 Hipoteza

U ovom istraživanju može se postaviti glavna deskriptivna hipoteza:

- 1) Proteini krvne plazme GŠ su N-glikozilirani, ali razlikuju se po sastavu, broju i kemijsko-fizikalnim svojstvima prisutnih N-glikana od onih u čovjeka i drugih glodavaca.

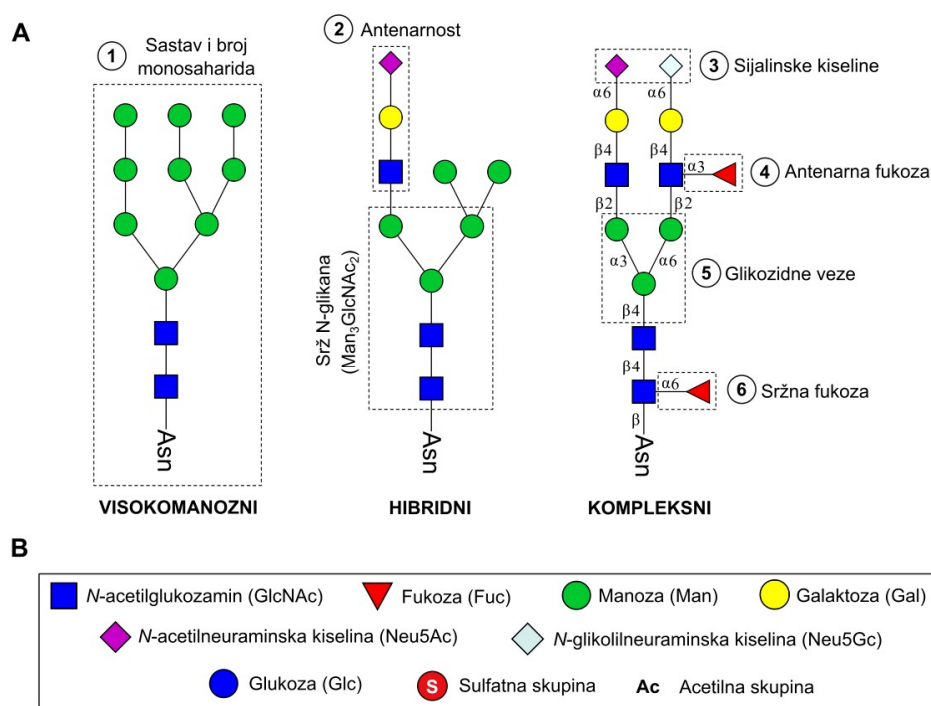
1.2 Ciljevi istraživanja

- 1) Pripremiti i pročistiti enzimski oslobođene derivatizirane N-glikane s proteina krvne plazme GŠ za strukturnu analizu metodama tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti s detekcijom fluorescencije spregnute sa tandemnom spektrometrijom masa (UPLC-FLD-MS/MS).
- 2) Interpretirati fragmentacijske spektre masa N-glikana te odrediti njihov sastav i strukturna obilježja.
- 3) Analizirati podatke o svojstvima i relativnim udjelima identificiranih N-glikana u N-glikomu.
- 4) Provesti strukturnu analizu sijalinskih kiselina oslobođenih s N-glikana, potvrditi njihovu *O*-acetilaciju i odrediti položaj *O*-acetilne skupine.
- 5) Glikoproteomskom analizom pokušati utvrditi izvorišne proteine *O*-acetiliranih sijaloglikana.
- 6) Usporediti rezultate s dostupnim podacima o N-glikozilaciji proteina krvne plazme u miša, štakora i čovjeka te procijeniti utjecaj sličnosti i razlika u ovim glikomima na ishod modelnih istraživanja.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Biosinteza i tipovi N-glikana

N-glikozilacija se evolucijski pojavljuje već u arheja čiji su flagelini i proteini S-sloja stanične stijenke N-glikozilirani te se smatra da je ishodišna za N-glikozilaciju proteina u eukariota. U eubakterija je N-glikozilacija rijetka i vjerojatno je rezultat horizontalnog prijenosa gena (Lombard, 2016.). Prokariotska N-glikozilacija uključuje vezanje različitih mono- i oligosaharida na Asn, ali u užem smislu se pod N-glikozilacijom misli na eukariotsku; čijim su N-glikanima zajednički: 1) β 1-vezan *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) na asparagin (GlcNAc β 1–Asn) i 2) sržna pentasaharidna struktura Man₃GlcNAc₂ (**Slika 2.1**). N-glikozilacija proteina u sisavaca u koje pripada i GŠ je najsloženija te će ovdje biti pobliže prikazana prema tri pregledna rada (Hirata i Kizuka, 2021.; Kornfeld i Kornfeld, 1985.; Stanley i sur., 2017.). N-glikozilacija se odvija u prvoj fazi na membranama endoplazmatskog retikuluma (ER) (**Slika 2.2A**), a u drugoj u odjeljcima (cisternama) Golgijevog aparata (GA) posredstvom niza enzima i lipidnog nosača poliizoprenolnog tipa. Kod eukariota je to dolikol-fosfat (Dol-P) koji se izvodi iz farnezil-pirofosfata; intermedijera u biosintezi kolesterola.



Slika 2.1. Razine raznolikosti tri tipa N-glikana – visokomanoznih, hibridnih i kompleksnih – opisane su prvenstveno sastavom i brojem monosaharida (1) vezanih različitim glikozidnim vezama (5) te antenarnosti (2), sijalinizacijom (3) i fukozilacijom (4, 6) koje kao najčešći strukturni motivi nadograđuju osnovnu srž glikana (Man₃GlcNAc₂) (A). Za sve prikaze N-glikana u ovom radu korištena je simbolička nomenklatura za N-glikane (SNFG) (B).

Svi N-glikani mogu se svrstati u tri tipa: 1) visokomanozni (oligomanozni), 2) kompleksni i 3) hibridni. Visokomanozni N-glikani imaju dodatnih dva do šest manoznih ostataka vezanih na pentasaharidnu srž. Kompleksni N-glikani modificirani su na sržnim α -manoznim ostatcima s GlcNAc-om koji čine početak tzv. antena N-glikana. Antene se mogu nadograđivati drugim monosaharidima (Gal, Sia, Fuc), a njihov se broj povećavati dodatkom novih GlcNAc-a na manozu čime nastaju di-, tri- i tetraantenarni N-glikani. Hibridni N-glikani dijele strukturne osobine prethodna dva tipa i u njima je sržna α 1,3-vezana Man produžena s GlcNAc, a α 1,6-vezana ponovno s Man (**Slika 2.1**). Na β 1,4-vezanu sržnu Man kompleksnih i hibridnih N-glikana može biti vezan tzv. rasijecajući ili račvajući GlcNAc (engl. *bisecting*). Poseban podtip N-glikana su paucimanozni N-glikani sastava $\text{Man}_{1-3}\text{GlcNAc}_2$ koji su u sisavaca rjeđi, a česti i strukturno vrlo raznoliki u beskralježnjaka (Schiller i sur., 2012.). Pojedini monosaharidi ponekad mogu biti dodatno modificirani acetilnom, sulfatnom ili fosfatnom skupinom.

2.2.1 Prva faza – biosinteza prekursora N-glikana

Pentasaharidna srž $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ zajednička je svim N-glikanima jer biosintetski potječe iz tetradekamernog oligosaharidnog prekursora N-glikozilacije vezanog na Dol-P (**Slika 2.2B**) kao lipidni nosač: $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (**Slika 2.2C**). Sinteza oligosaharidnog prekursora započinje na citoplazmatskoj strani ER prijenosom GlcNAc-1-P s nukleotidnog šećera uridin-difosfat-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) na Dol-P posredstvom enzima Dol-P-N-acetilglukozaminfosfotransferaze 1 (DPAGT1). Serijom od šest dodatnih koraka prekursor se nadograđuje do strukture sastava $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$; najprije transferom još jednog GlcNAc-a i zatim pet Man s njihovih aktiviranih formi UDP-GlcNAc i gvanozin-difosfat-manoze (GDP-Man) pomoću pet različitih ALG enzima (engl. *Asparagine-Linked Glycosylation*). Enzim flipaza (RFT1) zatim nepoznatim mehanizmom translocira prekursor na luminalnu stranu ER gdje se $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ nastavlja nadograđivati kroz dodatnih sedam koraka (**Slika 2.2A**). Donori monosaharida, četiri Man i tri Glc, sada su Dol-P-Man i Dol-P-Glc prethodno sintetizirani na citoplazmatskoj i translocirani na luminalnu stranu ER. Za taj proces odgovoran je membranski protein MPDU1 (engl. *Mannose-P-Dolichol Utilization*). Konačan produkt, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, u zadnjem se koraku prenosi na Asn N-glikozilacijskog mjesta nascentnog proteina posredstvom proteinskog kompleksa oligosahariltransferaze (OST) koji cijepa vezu GlcNAc-P.

Da bi peptidni akceptor mogao vezati N-glikan, nužna je vodikova veza između amidne skupine Asn kao donora i kisikova atoma OH-skupine hidroksi-aminokiseline (Ser, Thr, Tyr) kao akceptora. Prostorni preduvjet za nastanak te H-veze može se ostvariti približavanjem aminokiselina u β -zavoju (engl. *β -turn*) peptidnog lanca pa se u njima N-glikozilacijska mjesta često nalaze. Sekundarni amin u Pro ne dozvoljava peptidu da ostvari potrebnu konformaciju pa sekvon Asn-X-Ser/Thr-Z gdje je X ali i Z = Pro, nije pogodan akceptor N-glikana. Susjedne aminokiseline u blizini Asn prema tome dijelom određuju zauzetost N-glikozilacijskog mjesta (engl. *N-glycosylation site occupancy*) (Mellquist i sur., 1998.).

2.2.2 Druga faza – obrada N-glikana

Nakon transfera N-glikana, glikoproteini u lumenu ER najprije prolaze kontrolu kvalitete putem smatanja i razgradnju pogrešno smotanih glikoproteina. Obrada N-glikana započinje uklanjanjem Glc₂ s Glc₃Man₉GlcNAc₂-Asn pomoću α -glukozidaza I i II kako bi lektini kalnkesin i kalretikulín – šaperoni ER – mogli prepoznati produkt Glc₁Man₉GlcNAc₂-Asn i u kalneksinskom ciklusu smotati glikoprotein. Posljednji ostatak Glc također uklanja α -glukozidaza II, a konačan produkt Man₉GlcNAc₂-Asn, u slučaju pogrešnog smatanja, može biti reglukoziliran UDP-glukoza:glikoprotein-glukoziltransferazom (UGGT) i ponovno ući u kalneksinski ciklus (**Slika 2.3A**). Pogrešno smotani proteini se razgrađuju: prvo u lumenu ER procesom ERAD (engl. *ER-Associated Degradation*), a zatim u citosolu gdje se N-glikani uklanjaju s proteina i razgrađuju u lizosomima, a preostali deglikoproteini u proteasomima. Pravilno smotanim glikoproteinima α -manozidaza I uklanja jednu terminalnu α 1,2-Man dajući Man₈GlcNAc₂-Asn. Glikoproteini tada napuštaju ER i po vezikularnom transportu kroz ERGIC međuodjeljak (engl. *ER-Golgi Intermediate Compartment*) njihova se obrada nastavlja u Golgijevu aparatu.

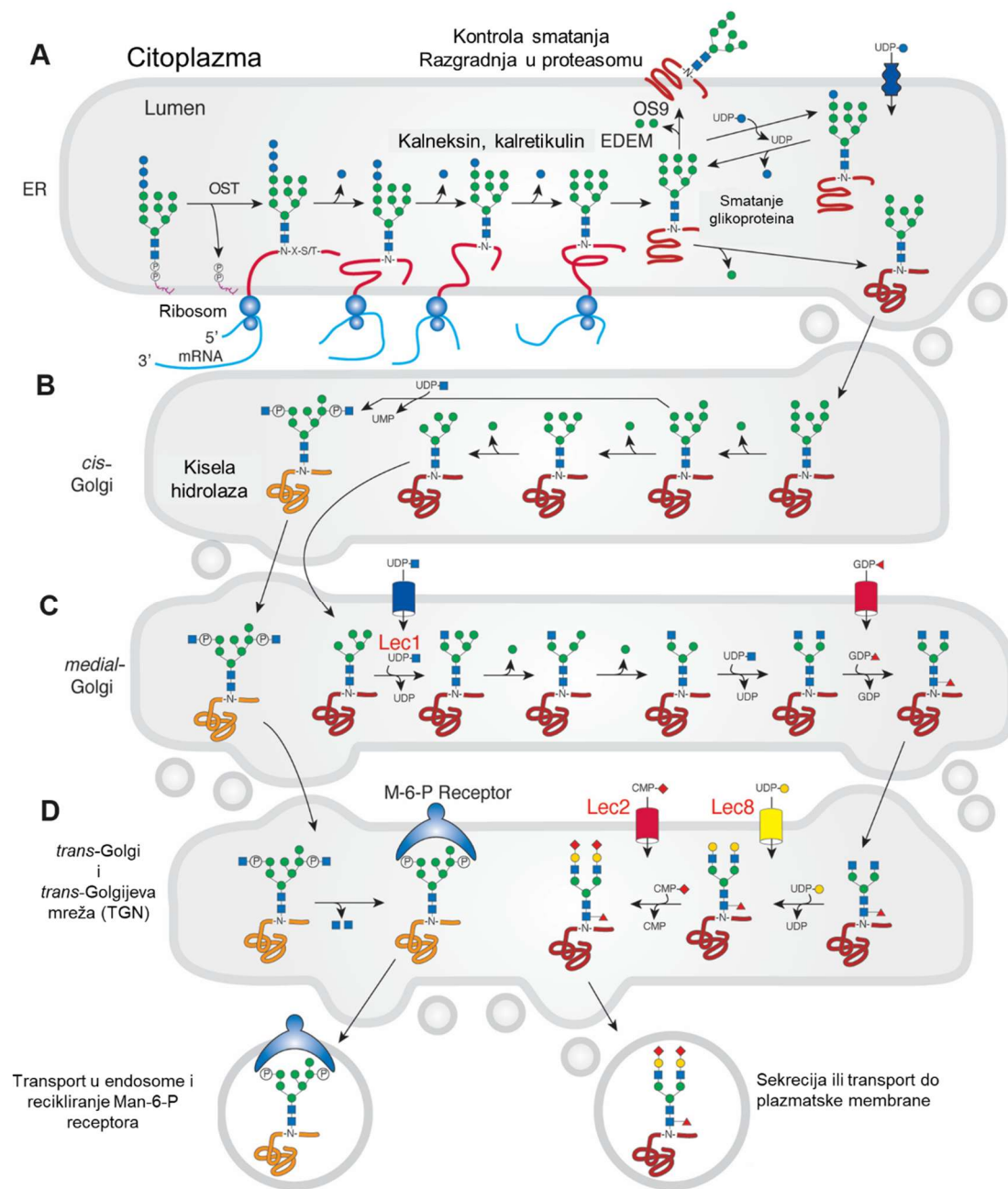
U *cis*-odjeljku GA α -1-2-manozidaze IA i IB (MAN1A1 i MAN1A2) skraćuju N-glikan uklanjajući α 1,2-Man ostatke sve do konačnog produkta Man₅GlcNAc₂ – intermedijera hibridnih i kompleksnih glikana (**Slika 2.3B**). Nepotpuna obrada visokomanoznih prekursora rezultira s Man₅₋₉GlcNAc₂ kao konačnim produktima, a postojanje izomera Man₆₋, Man₇₋ i Man₈GlcNAc₂ reflektira različitu specifičnost manozidaza prema supstratu. U sljedećem koraku započinje elongacija N-glikana prvim ogrankom, tj. antenom.

Nju čini GlcNAc iz UDP-GlcNAc vezan na C-2 α 1,3-Man sržnog supstrata Man₅GlcNAc₂. Ovu reakciju katalizira α -1,3-manozil-glikoprotein 2- β -*N*-acetilglukozaminiltransferaza (MGAT1, GlcNAc-TI).

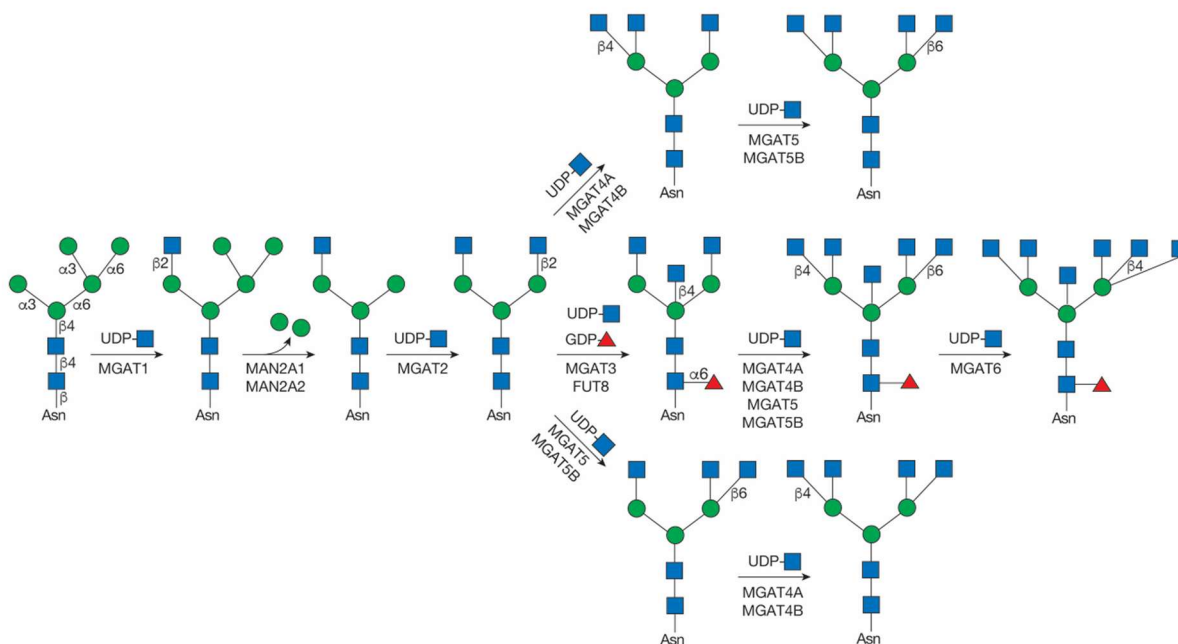
Zatim u medijalnom odjeljku GA α -manozidaze II MAN2A1 i MAN2A2 dalje uklanjaju α 1,3- i α 1,6-Man s GlcNAcMan₅GlcNAc₂, a preduvjet za ovu reakciju je prethodno djelovanje MGAT1. Tako nastali GlcNAcMan₃GlcNAc₂ supstrat je za MGAT2 koja veže drugi GlcNAc na C-2 α 1,6-Man sržnog supstrata. Konačni produkt prekursor je svih ostalih kompleksnih diantenarnih N-glikana. Ukoliko nakon djelovanja MGAT1 izostane djelovanje α -manozidaza II, nastaju hibridni N-glikani. Slično tome, paucimanozni N-glikani nastaju djelovanjem Golgi-heksozaminidaze koja uklanja GlcNAc nakon djelovanja α -manozidaza II. Još jedna ključna modifikacija u medijalnom odjeljku GA je sržna fukozilacija GlcNAc vezanog za Asn. Donor fukoze je gvanozin-difosfat-fukoza (GDP-Fuc), a enzim odgovoran za katalizu ove reakcije α 1,6-fukoziltransferaza (FUT8) (**Slika 2.3C**).

U *trans*-odjeljku GA na antene N-glikana se dalje mogu vezati galaktoza (Gal) i sijalinske kiseline (Sia) posredstvom galaktoziltransferaza (GalT) i sijaliltransferaza (SiaT) (**Slika 2.3D**). Nukleotidni šećeri kao donori monosaharida u ovim reakcijama su UDP-Gal i citidin-monofosfat-sijalinska kiselina (CMP-Sia). Ovakva lokalizacija glikoenzima – glikoziltransferaza i glikozidaza – u ER i GA jedinstvena je za N-glikozilaciju kao PTM jer omogućava kontrolu njihovog sekvencijskog djelovanja na novosintetizirane glikoproteine u prostoru i vremenu. Zato konačna struktura sintetiziranog N-glikana odražava redoslijed djelovanja i specifičnost glikoenzima prema supstratima, ali i njihovu promjenjivu ekspresiju. N-glikozilacija je usko vezana uz biosintetski put heksozamina u kojem se iz glukoze *de novo* sintetizira UDP-GlcNAc. Svi nukleotidni šećeri sintetiziraju se u citoplazmi osim CMP-Sia koja se sintetizira u staničnoj jezgri. Za njihovu translokaciju odgovorni su transporter i nukleotidnih šećera.

Svi opisani biosintetski koraci rezultiraju zapravo vrlo ograničenim repertoarom N-glikanskih struktura koje tek daljnim enzimskim reakcijama dozrijevaju putem: 1) dodavanja pojedinačnih monosaharida, 2) formiranja novih antena i njihovom elongacijom i/ili 3) dodavanja terminalnih monosaharida na antene (npr. Sia ili antenarna Fuc) (**Slika 2.4**).



Slika 2.3. Shematski prikaz druge faze biosinteze N-glikana, tj. obrade u Golgijevu aparatu. Biosinteza fosforiliranih visokomanoznih N-glikana u *cis*-odjeljku nužna je za transport kisele hidrolaze u lizosome putem Man-6-P receptora (M6PR) u TGN. **CMP** – citidin-monofosfat; **ER** – endoplazmatski retikulum; **EDEM** – engl. *ERAD-enhancing α -mannosidase-like protein* (ERAD – engl. *ER-associated degradation*); **GDP** – gvanozin-difosfat; **Lec1** – transferaza *N*-acetilglukozamina 1; **Lec2** – transporter CMP-Sia; **Lec8** – transporter UDP-Gal; **Man-6-P** – manozna-6-fosfat; **OS9** – protein OS9 (engl. *amplified in osteosarcoma* 9); **OST** – oligosahariltransferaza; **UDP** – uridin-difosfat. Preuzeto iz Stanley i sur. (2017.) i prilagođeno.



Slika 2.4. Shematski prikaz najvažnijih enzimskih reakcija u dozrijevanju N-glikana i nastanku višeantennarnih struktura (grananju). **MAN2A1** i **MAN2A2** – α -manozidaze II IA i IB; **MGAT** – *N*-acetilglukozaminiltransferaze; **FUT8** - α 1,6-fukoziltransferaza; **UDP** – uridin-difosfat, **Asn** – asparagin. Preuzeto iz Stanley i sur. (2017.) i prilagođeno.

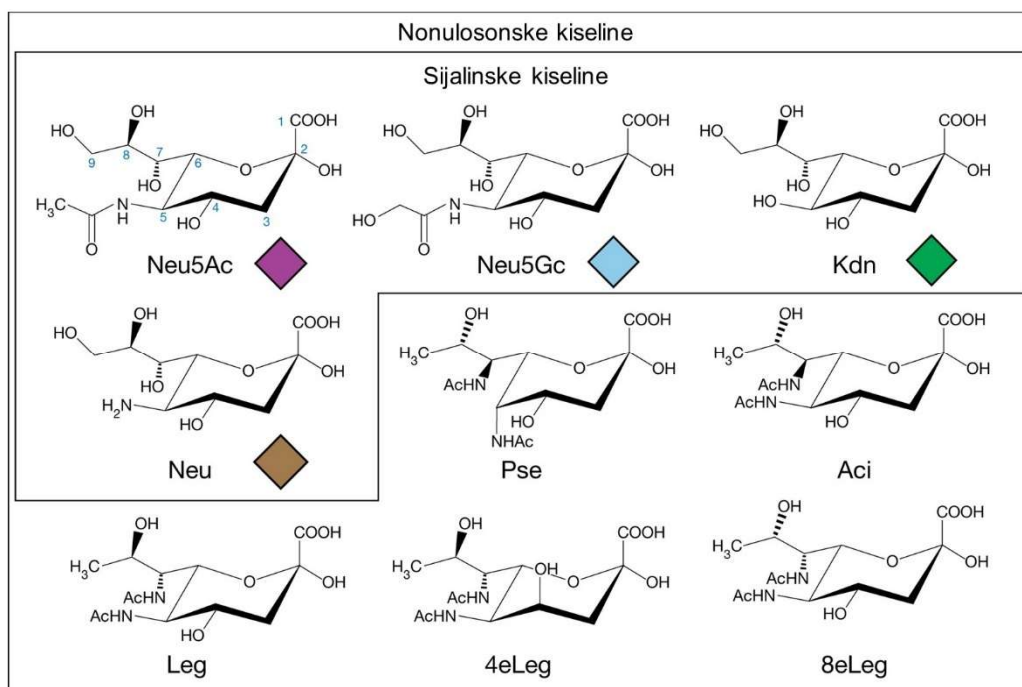
2.2.3 Dozrijevanje N-glikana

Dozrijevanje N-glikana odvija se prvenstveno kroz grananje pri čemu nastaju N-glikani s više antena. Proces započinje s diantennarnim glikanom kao supstratom. Na njegovu β -manozu se može vezati rasijecajući GlcNAc posredstvom MGAT3. Ova modifikacija u pravilu blokira daljnje grananje N-glikana i njegove terminalne modifikacije (Nakano i sur., 2019.) ali postoje i iznimke, primjerice na N-glikanima u ptica i riba (**Slika 2.4**). Triantennarni N-glikani nadalje nastaju elongacijom pomoću MGAT4A i MGAT4B koje dodaju β 4-GlcNAc, a zatim se katalizom uz MGAT5 i MGAT5B formira tetraantennarna struktura s dodatnim β 6-GlcNAc. Različite MGAT mogu se i natjecati za zajednički supstrat, pa će različiti redoslijed dodavanja pojedinih ostataka GlcNAc odrediti daljnju biosintezu. Slično vrijedi i za fukoziltransferazu koja zahtijeva GlcNAc β 1,2-Man α 1,3 kao supstrat pa su stoga visokomanozni sržno fukozilirani N-glikani vrlo rijetki. β 1,4-galaktoziltransferaza pokazuje pak antenarnu specifičnost; *in vivo* reakcija vezanja Gal na GlcNAc β 1,2-Man α 1,6 je preferirana nad Man α 1,3-antenom. Na Gal pojedinih antena u završnim koracima dozrijevanja vežu se sijalinske kiseline, a moguća je i α 1,3-galaktozilacija (α -Gal epitop) kroz dodavanje još jednog ostatka Gal.

Sintetizirani sekretorni ili membranski glikoproteini se u konačnici iz TGN transportiraju vezikulama čime proces N-glikozilacije proteina završava (Colley i sur., 2022.).

2.2 Sijalinske kiseline

U sisavaca N-glikane tvore gotovo isključivo heksoze i vrlo rijetko, pentoze, poput arabinoze i ksiloze (Tanaka-Okamoto i sur., 2022.; Wen i sur., 2014.). Iznimka su sijalinske kiseline koje pripadaju većoj skupini nonulosonskih kiselina (NuLO); C-9 α -ketokiselina evolucijski prisutnih već u nekih arheja i eubakterija, a najzastupljenijih u *Deuterostomia* (**Slika 2.5**). Kao terminalni monosaharidi, Sia na distalnim krajevima N-glikana neizbježno stupaju u molekulske interakcije s drugim stanicama, proteinima i glikanima pa su ključne u procesima biološkog prepoznavanja. Uz to, postoji oko 50 derivata Sia koji su produkti modifikacija s malim funkcionalnim skupinama (acetilna, sulfatna, metilna i dr.) na različitim mjestima u molekuli (Angata i Varki, 2002.). Ukupnost Sia u glikomu glikoproteina, stanice ili tkiva naziva se sijalom (engl. *sialome*, *sialiome*) i predmet je istraživanja sijalobiologije.



Slika 2.5. Sijalinske kiseline su podskupina nonulosonskih kiselina. **Neu5Ac** – *N*-acetilneuraminska kiselina; **Neu5Gc** – *N*-glikolilneuraminska kiselina; **Kdn** – ketodeksinonulosonska kiselina; **Neu** – neuraminska kiselina; **Pse*** – pseudaminska kiselina; **Leg*** – legionaminska kiselina; **Aci*** – acinetaminska kiselina; **4eLeg*** – 4-epi-legionaminska kiselina; **8eLeg*** – 8-epi-legionaminska kiselina. Zvezdicom (*) su označene mikrobne NuLO. Preuzeto iz Varki i sur. (2017.) i prilagođeno.

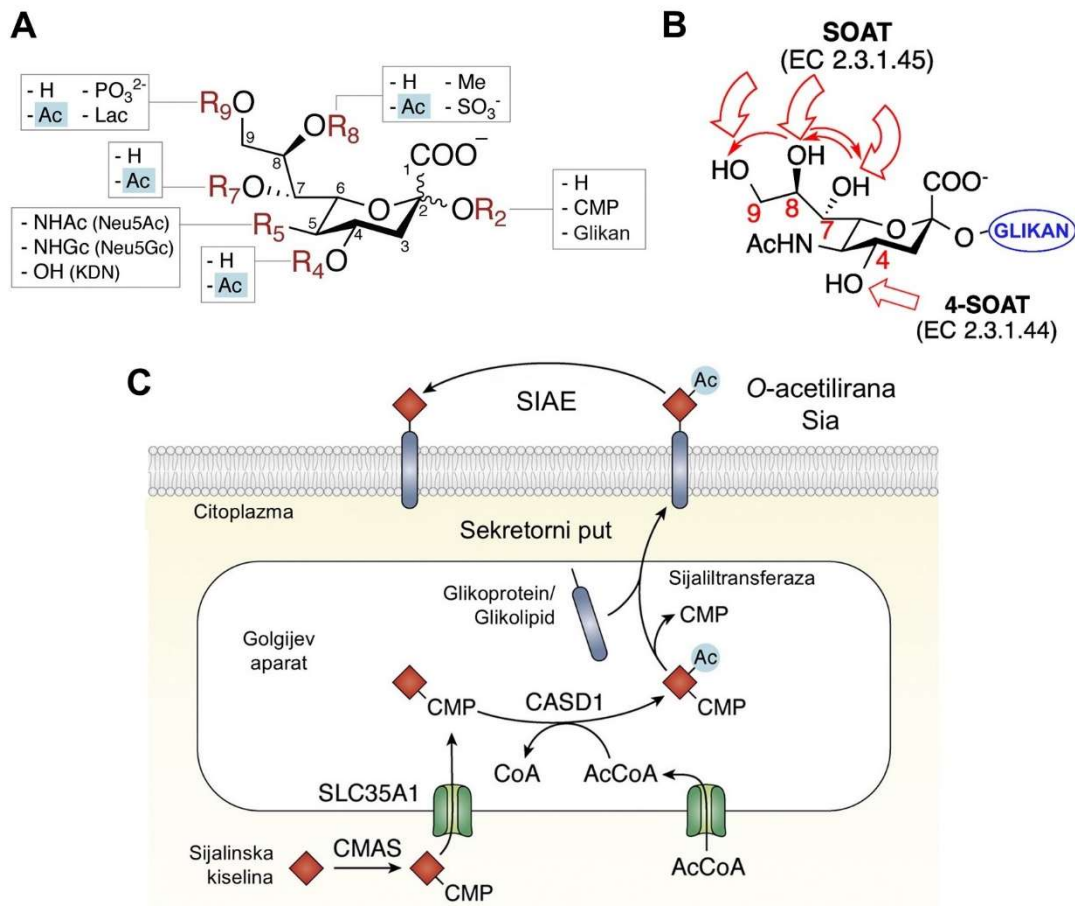
Zajednička odlika svih NuLO je karboksilna skupina (C-1) vezana na anomerni ugljikov atom (C-2) i tročlani egzociklički lanac (C-7 do C-9) koji se u Sia naziva „glicerolnim lancem“ jer je supstituiran s tri hidroksilne skupine. Kako je u Gram-negativnih bakterija prisutna strukturno vrlo slična keto-deoksiotulosonska kiselina (Kdo), smatra se da su se NuLO i Sia pojavile vrlo rano tijekom evolucije, ali su se zadržale samo u glikokonjugatima određenih skupina (Varki i sur., 2017.). Same Neu nema u prirodi u slobodnom obliku ili je u ranijim istraživanjima poistovjećena s Neu5Ac. Njezin C-5 amino-supstituiran derivat, Kdn, prisutna je u bakterija i nekih manje odvedenih kralježnjaka, a ponekad i u ljudskim tumorskim tkivima (Schauer i Kamerling, 2018.; Wang i sur., 2015.). U sisavaca su najzastupljenije Sia *N*-acetilneuraminska (Neu5Ac, NANA) i iz nje izvedena *N*-glikolikneuraminska (Neu5Gc, NGNA) kiselina koja na C-5 umjesto acetilne ima glikolilnu skupinu. Zanimljivo je da ljudski glikokonjugati gotovo uopće nemaju Neu5Gc što je posljedica gubitka gena *CMAH* (engl. *Cytidine Monophospho-N-Acetylneuraminic acid Hydroxylase*), čiji produkt je hidroksilaza odgovorna za konverziju Neu5Ac u Neu5Gc u citosolu (Shaw i Schauer, 1988.). Zato je Neu5Gc u ljudi ksenoantigen s patogenim potencijalom.

Zbog velike kemijske raznolikosti, Sia imaju niz bioloških uloga. Sama Neu5Ac je relativno jaka kiselina ($pK_a \sim 2.6$) i daje negativan naboj podležećem *N*-glikanu, dok *N*-acetilna skupina povećava hidrofobnost Sia, a *N*-glikolilna ju smanjuje. Navedeno ima direktan utjecaj na hidrofobne interakcije i stvaranje vodikovih veza s drugim molekulama. Opsežno sijalinizirani glikoproteini poput mucina imaju gust negativan površinski naboj i zadržavaju vodu pa imaju važnu zaštitnu ulogu. Bliske nakupine raznih sijaloglikoproteina mogu tvoriti čitave sijalinizirane mikrodomene („glikosinapse“) na površinama bioloških membrana. Sličan utjecaj Sia na fizikalno-kemijska svojstva vrijedi i za bilo koji sijalinizirani membranski glikoprotein ili glikolipid (Schauer i Kamerling, 2018.; Varki i sur., 2017.). Prisutnost Sia na površini stanice usko je vezana uz sposobnost mikrobnih patogena da ciljaju Sia kao ligand svojim Sia-vežućim proteinima u procesima egzogenog prepoznavanja. To su primjerice virusni hemaglutinini, bakterijski adhezini i toksini te lektini iz praživotinja. Kompleksnost i evolucija ove skupine monosaharida velikim je dijelom rezultat neprekidne interakcije domaćina i patogena u kojoj oba sudionika razvijaju nove modifikacije Sia. Domaćini, kako bi onemogućili interakciju ili infekciju, a patogeni kako bi svojim Sia-vežućim proteinima i enzimima zaobišli već postojeće modifikacije koje domaćinu služe kao molekularni mamci za odvratanje (Burzyńska i sur., 2021.).

2.2.1 Biosinteza sijalinskih kiselina

Prekursor Sia je UDP-GlcNAc izveden iz glukoze u biosintetskom putu heksozamina. Iz njega se u citosolu posredstvom bifunkcionalnog enzima UDP-GlcNAc 2-epimeraza/ManNAc kinaza (gen *GNE*) sintetizira *N*-acetilmanozamin (ManNAc) i zatim *N*-acetilmanozamin-6-fosfat (ManNAc-6-P). Reakcijom kondenzacije ManNAc-6-P s 2-fosfoenolpiruvatom (PEP) – kataliziranom s *N*-acetilneuraminat sintazom (NANS) – nastaje prvo Neu5Ac-9-P koji se potom defosforilira u prisutnosti *N*-acetilneuraminat-9-fosfataze (NANP) do Neu5Ac kao najčešće Sia (**Slika 2.6**). Egzogeni izvor supstrata za biosintezu mogu biti i reciklirane molekule Neu5Ac oslobođene s glikana pomoću sijalidaza (neuraminidaza, NEU) najčešće u lizosomu (NEU1), citosolu (NEU2) ili s membranskih proteina (NEU3, NEU4) (Maurice i sur., 2016.). One se iz lizosoma transportiraju uz pomoć transportera sialina (SLC17A5), a kroz staničnu membranu putem hipotetskog transportera NanT/SLC17A_x. Za daljnje korake sijalinizacije N-glikana potreban je aktivirani derivat Sia u obliku nukleotidnog šećera – citidin-monofosfat-*N*-acetilneuraminske kiseline (CMP-Neu5Ac) – koja se sintetizira u staničnoj jezgri uz enzim citidin-monofosfat-*N*-acetilneuraminat sintetazu (CMAS). Za transport CMP-Neu5Ac u GA služi antiporter SLC35A1, gdje se, u njegovom *trans*-odjeljku, posredstvom sijaliltransferaza (ST) odvija sijalinizacija N-glikana. Biosinteza Neu5Gc odvija se također u citosolu posredstvom već spomenute hidroksilaze CMAH (Harduin-Lepers, 2023.; Schauer i Kamerling, 2018.; Varki i sur., 2017.). Od ukupno 20 opisanih ST u čovjeka, za sijalinizaciju N-glikana ključne su zapravo četiri koje kataliziraju vezanje Sia na galaktozilirane antene N-glikana, tj. epitop Gal β 1,4GlcNAc (*N*-acetillaktozamin, LacNAc) kao akceptor. Djelovanje prve, β -galaktozid α -2,6-sijaliltransferaze 1 (ST6Gal-I), rezultira α 2,6-vezanom Sia na Gal; npr. Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-R (Bhide i Colley, 2017.). Druga ST, ST6Gal-II, otkrivena je mnogo kasnije i, iako može koristiti LacNAc kao supstrat, pokazuje slabu aktivnost i uloga joj je nejasna (Takashima i sur., 2002.). Djelovanje preostale dvije ST, ST3Gal-IV i ST3Gal-VI rezultira α 2,3-vezanom Sia. Pritom ST3Gal-IV kao supstrat koristi Gal β 1,4(3)GlcNAc, na N-glikanima i O-glikanima s terminalnim GlcNAc. ST3Gal-VI uz Gal β 1,4GlcNAc kao supstrat ima i specifičnost prema glikolipidima kao akceptorima Sia (Bhide i Colley, 2017.). Uz monosijalinizirane glikane postoje i di-, oligo- i polisijalinske kiseline (poliSia) u kojima su monomeri Sia međusobno povezani α 2,8 vezom, a ST uključene u biosintezu su ST8Sia-II i ST8Sia-IV (Sato i Kitajima, 2013.). PoliSia su prisutne u moždanom tkivu, ali i na N-glikanima proteina ljudskog krvnog seruma (Kronewitter i sur., 2014.).

Iz prikazanog je očito da su α 2,3-, α 2,6- i α 2,8-vezane Sia na N-glikanima još jedan strukturni motiv koji doprinosi njihovoj heterogenosti i funkciji, a povrh njih i prirodne kemijske modifikacije Sia (**Slika 2.7A**). U njih se ubrajaju 4/7/8/9-*O*-acetilacija, 8-*O*-sulfatacija, 9-*O*-fosforilacija, 9-*O*-laktilacija i 8-*O*-metilacija (Schauer i Kamerling, 2018.).



Slika 2.7. Prirodne modifikacije Sia i njihove moguće pozicije u molekuli (**A**), djelovanje sialat-*O*-acetiltransferaza i *O*-acetilacija Sia na C-4, C-7, C-8 ili C-9 (debele strelice) te spontana migracija (izomerizacija) *O*-Ac skupina (tanke strelice) (**B**) i shematski prikaz biosinteze *O*-acetiliranih Sia (**C**). **Ac** – *O*-acetilna skupina; **Lac** – laktalna skupina; **Me** – metilna skupina; **PO₃²⁻** – fosfatna skupina; **SO₃⁻** – sulfatna skupina; **EC** – oznaka za numeričku klasifikaciju enzima (engl. *Enzyme Commission number*); **SOAT** – sialat-*O*-acetiltransferaza; **SIAE** – sialat-*O*-acetilesteraza; **CASD1** – SOAT u sisavaca (engl. *capsule structure1 domain containing 1*); **CMAS** – citidin-monofosfat-*N*-acetilneuraminat sintaza; **SLC35A1** – antiporter CMP-Sia u GA (engl. *solute carrier family 35 member A1*); **CoA** – koenzim A; **AcCoA** – acetil-koenzim A; **CMP** – citidin-monofosfat. Preuzeto iz Park (2019.) i Visser i sur. (2021.) te prilagođeno.

2.2.1 *O*-acetilacija sijalinskih kiselina

O-acetilacija Sia njihova je najčešća i najbolje istražena modifikacija. Supstitucija acetilnom skupinom mijenja veličinu, konformaciju, naboj i povećava hidrofobnost, što modulira svojstva i biološku funkciju *O*-Ac-Sia derivata (Traving i Schauer, 1998.). Sia mogu biti *O*-acetilirane na C-4, C-7, C-8, i C-9, u obliku mono- (npr. Neu4,5Ac₂, Neu5,7Ac₂, Neu5,8Ac₂, Neu5,9Ac₂, Neu4Ac5Gc), di- (npr. Neu5,7,9Ac₃) i tri-*O*-Ac-derivata (npr. Neu5,7,8,9Ac₄) (Visser i sur., 2021.). Biosinteza *O*-Ac-Sia odvija se u GA, a započinje sa Sia sintetiziranim *de novo* u citoplazmi ili recikliranim iz egzogenih izvora (**Slika 2.6**) u obliku CMP-Sia, uz katalizu sijalat-*O*-acetiltransferazom (SOAT). Do sada je pročišćena i detaljno okarakterizirana samo jedna SOAT u sisavaca; ljudska CASD1 (engl. *capsule structure 1 domain containing 1*) koja katalizira sintezu Neu5,9Ac₂ (Baumann i sur., 2015.; Visser i sur., 2021.) (**Slika 2.7B**). Ostale SOAT iz različitih izvora uglavnom su identificirane samo na temelju svoje aktivnosti i među njima se izdvaja 4-SOAT odgovorna za *O*-acetilaciju na C-4 (Klein i Roussel, 1998.). Donor acetilne skupine u reakciji je acetil-koenzim A transportiran u GA posredstvom antiportera (**Slika 2.7C**). Sintetizirane *O*-Ac-Sia vežu se potom na N-glikane djelovanjem ST6Gal-I.

Enzimi koji hidroliziraju acetilnu skupinu, tj. deacetiliraju 4/9-*O*-Ac-Sia, ali ne i rezistentne 7-*O*-Ac-Sia, su sijalat-*O*-acetilesteraze (SIAE). Aktivnost SIAE u nekih patogenih bakterija doprinosi njihovoj virulenciji putem najprije deacetilacije, zatim desijalinizacije i najzad razgradnje mucina. Slično je primjerice i s virusima gripe tipa C i D koji se putem HEF glikoproteina (engl. *hemagglutinin esterase fusion*) najprije vežu za Neu5,9Ac₂ prezentirane na površini stanica respiratornog epitela, ulaze u stanicu i nakon replikacije, prilikom otpuštanja iz stanice, deacetiliraju *O*-Ac-Sia na glikanima stanične membrane što ubrzava infekciju (Jennings i sur., 2022.; Visser i sur., 2021.). *O*-acetilacija Sia može prema sijalidazama (NEU1-4) djelovati inhibitorno pa ima i zaštitnu ulogu koja je, omogućena acetilacijom na različitim mjestima u molekuli i migracijom *O*-Ac, koevoluirala zajedno s mikrobnim patogenima. Migracija *O*-Ac po egzocikličkom glicerolnom lancu događa se i u fiziološkim uvjetima pod utjecajem promjena pH-vrijednosti (pH > 5). Taj proces je reverzibilan i dokazano je da se odvija višesmjerno između C7-OH, C8-OH i C9-OH (**Slika 2.7B**) favorizirajući formiranje Neu5,9Ac₂ u ravnotežnom stanju što je možda i razlog najveće zastupljenosti ovog *O*-Ac derivata Sia u prirodi. Nasuprot tome, migracija 4-*O*-Ac zbog steričkih utjecaja nije moguća (Ji i sur., 2021.).

2.3 N-glikozilacija proteina krvne plazme

Ljudsku krv uz eritrocite, leukocite i trombocite čini oko 55 % krvne plazme (KP) koja se sastoji od približno 90 % vode. Ostatak od 10 % otpada na proteine, elektrolite (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^-), faktore zgrušavanja, glukozu, hormone, kreatinin i otopljene plinove. Krvni serum (KS) je KP gotovo bez fibrinogena i prikuplja se uzimanjem krvi bez antikoagulansa, a nakon stvaranja fibrinskog ugruška. Koncentracija proteina u krvnom serumu je stoga 3-4 % niža nego u krvnoj plazmi (Issaq i sur., 2007.). Glavne fiziološke uloge krvi i KP preklapaju se i uključuju: 1) zgrušavanje krvi, 2) imunosni odgovor, 3) održavanje osmotskog tlaka i kiselinsko-bazne ravnoteže, 4) prijenos tvari uključujući hormone, 5) disanje, 6) ekskreciju i dr. (Peters, 1987.). Kako je krv biološka tekućina koja svojim optokom povezuje sve organske sustave i omogućuje izmjenu tvari i plinova, u obliku sastava i koncentracija proteina KP zapravo nosi informaciju o svim tkivima kroz koja prolazi. To pruža neposredan uvid u (pato)fiziološki status organizma i stoga je proteom KP iako najsloženiji, najčešće istraživani ljudski proteom (Anderson i Anderson, 2002.). Krvna plazma se lako prikuplja pa je pogodna za visokoprotodne proteomske analize pomoću tekućinske kromatografije vezane sa spektrometrijom masa (LC-MS) i otkrivanje novih proteinskih biomarkera. Iz velikih skupova tako prikupljenih podataka danas su već razvijeni modeli starenja pojedinih ljudskih organa na razini njihovih proteoma, s potencijalom predviđanja pojave bolesti (Oh i sur., 2023.). Informacija o fenotipu u određenoj vremenskoj točki je za proteom KP gotovo neposredna jer se njegov sastav mijenja u rasponu od nekoliko minuta do nekoliko sati. Proteomi drugih bioloških tekućina (slina, urin, mlijeko, cerebrospinalna tekućina) također su vrlo složeni. Iako sadrže proteine kojih u KP nema, svaki od njih velikim je dijelom samo podskup proteina prisutnih u KP ograničen na lokalnu staničnu aktivnost (Anderson i Anderson, 2002.).

Pravim proteinima KP smatraju se oni koji svoju ulogu obavljaju u samom optoku krvi što isključuje razne receptorske ligande (proteinski i peptidni hormoni, citokini) i proteine sekretoma tkiva (Putnam, 1975.). Stalnih proteina u KP je oko 300 ali dinamički raspon njihovih koncentracija obuhvaća oko 10 redova veličine (pg do mg mL^{-1}). Od toga broja tridesetak je tzv. standardnih (klasičnih) proteina KP, a preostali su proteini sekretoma (engl. *tissue leakage proteins*), interleukini i drugi, prisutni u vrlo niskim koncentracijama.

Od standardnih proteina KP najzastupljeniji je albumin (55 % svih proteina KP), a slijede ga imunoglobulini A, G i M (IgA, IgG, IgM), transferin (Tf), fibrinogen (Fib), α -1-antitripsin (A1AT), α -2-makroglobulin (α 2M), haptoglobin (Hp), komponenta komplementa C3 (C3), α -1-kiseli glikoprotein (AGP), apolipoproteini itd. (Anderson i Anderson, 2002.; Issaq i sur., 2007.).

Većina standardnih proteina KP sintetizira se u jetri, a imunoglobulini u limfoidnom tkivu (Schaller, 2008.). Ukupan broj uopće identificiranih proteina u KP, neovisno o njihovoj funkcionalnoj klasifikaciji, kreće se od oko 700 (Schenk i sur., 2008.) pa sve do gotovo 5000 (Deutsch i sur., 2021.), ali teško ga je odrediti jer on ovisi o odabiru i učinku analitičkih metoda te činjenici da izoforme i PTM proteina rezultiraju stotinama tisuća proteoformi. Jednu od tih razina složenosti definira i N-glikom proteina KP. Svi standardni proteini KP su N-glikozilirani, uključujući i albumin (Garapati i sur., 2024.). Prije dvadesetak godina u ljudskoj KP bilo je moguće pouzdano identificirati tek 37/62 N-glikoproteina/N-glikozilacijskih mjesta obogaćivanjem glikoproteina iz KP lektinima. Primjenom hidrazidne kemije broj identifikacija je povećan na 97/300 (Hägglund i sur., 2004.; Zhang i sur., 2003.). Dodatnim imunoafinitetnim uklanjanjem dijela najzastupljenijih proteina i frakcionacijom glikopeptida i upotrebom najsuvremenijih tehnika LC-MS taj broj je znatno povećan na 303/639 (Liu i sur., 2005.). Potencijalan broj u bazama ljudskih proteomskih podataka za KP je 1800/3000, no treba uzeti u obzir da mnoga N-glikozilacijska mjesta određena bioinformatičkim metodama nisu zauzeta N-glikanima ili za to ne postoji eksperimentalna potvrda (Dang i sur., 2019.).

N-glikom ljudske KP ili KS čini, već prema literaturnim podacima, varijabilan broj N-glikana što ovisi o primijenjenoj analitičkoj metodologiji, analizi izomera i sl. Najčešće se u visokoprotočnim analizama tehnikom UPLC-FLD kvantificira 30 do 40 najzastupljenijih N-glikana (Gudelj i sur., 2016.; Park i sur., 2018.; Trbojević-Akmačić i sur., 2022.). Uz primjenu spektrometrije masa vrlo visoke rezolucije i odjeljivanje kapilarnom elektroforezom ili nanoLC broj identificiranih struktura je veći; od 106 (Stumpo i Reinhold, 2010.) pa sve do 375 (Marie i sur., 2024.). N-glikom ljudske KP čine svi tipovi N-glikana, a najzastupljeniji su diantenarni mono- i disijalinizirani N-glikani, sa ili bez sržne fukoze. Najveće, ali manje zastupljene strukture čine tri- i tetraantenarni tetrasijalinizirani N-glikani (Dotz i Wuhrer, 2019.). Svi sijalinizirani N-glikani ljudske KP imaju α 2,3- i α 2,6-vezanu Neu5Ac (Vreeker i sur., 2018.).

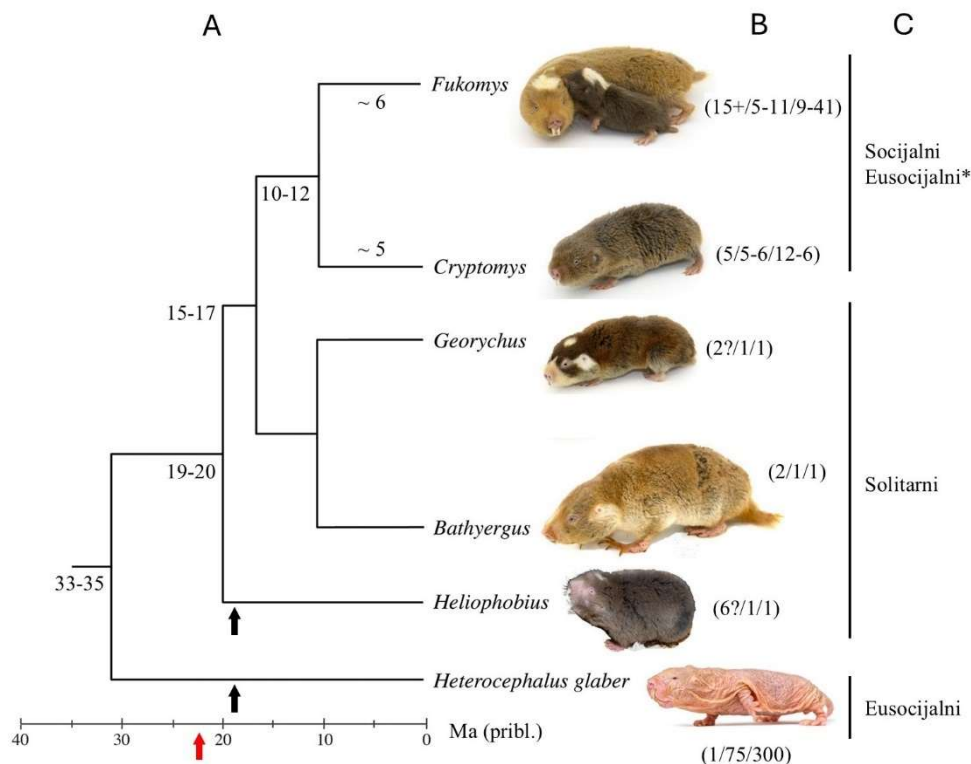
Interindividualne razlike u N-glikomu ljudske KP posljedica su dobi, spola i okolišnih faktora, te različitih bolesti poput dijabetesa tipa 2 (Rudman i sur., 2019.), kolorektalnog karcinoma (de Vroome i sur., 2018.), upalne bolesti crijeva (Šimurina i sur., 2018.) i dr. N-glikozilacija pojedinih najvažnijih proteina čiji N-glikani tvore N-glikom KP također je dobro istražena, posebno kod antitijela IgG (Pučić i sur., 2011.) i IgA (Momčilović i sur., 2020.), AGP (Keser i sur., 2021.), C3 (Šoić i sur., 2022.), fibrinogena (FIB) (Adamczyk i sur., 2013.), te A1AT (Yin i sur., 2018.). Biomarkerski potencijal N-glikoma KP i njegovih ishodišnih glikoproteina je prema tome znatan, no za većinu otkrivenih asocijacija s bolestima još nisu razjašnjeni mehanistički aspekti i utjecaj patofiziologije odnosno starenja na promjenu N-glikozilacije.

N-glikomi krvne plazme ili seruma glodavaca također su istraživani te se u više aspekata razlikuju od ljudskog. U N-glikomu KP miša određeno je tehnikom spektrometrije masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (MALDI-MS) 120, a pouzdano kvantificirano 56 N-glikana koji su sijalinizirani gotovo isključivo s Neu5Gc te njezinim mono-*O*-Ac derivatom; Neu5GcAc. Relativni udio N-glikana s Neu5GcAc iznosi 2-6 % i ovisan je, kao i udjeli ostalih N-glikana, o soju i spolu. U N-glikomu KP ženki izražena je povećana sržna fukozilacija, α 2,6-sijalinizacija i galaktozilacija N-glikana u odnosu na mužjake koji imaju povećane udjele N-glikana s α 2,6-sijalinizacijom i rasijecajućim GlcNAc (Reiding i sur., 2016.). Osim toga, kod visokosrođenih mišjih sojeva je interindividualna razlika u N-glikanskim svojstvima manja, što potvrđuje heritabilnu komponentu N-glikoma KP (Zaytseva i sur., 2020.). Nedavno objavljena detaljna glikoproteomska analiza mišjeg KS otkrila je 39 različitih mono- i di-*O*-Ac-sijaliniziranih N-glikana sa ukupno 41 proteina (Shen i sur., 2023.), što upućuje na širu rasprostranjenost ovih derivata Sia nego što se to do sada smatralo.

N-glikom KS štakora analiziran je naprednijom metodologijom; kromatografijom nederivatiziranih N-glikana na mikrofluidičkom čipu u sustavu vezanom sa spektrometrom masa (chip-LC-ESI-Qq-TOF-MS) pa je, uključujući izomere, otkriveno ukupno 282 N-glikana (Gao i sur., 2015.). U sijaliniziranih N-glikana (70-80 %) prisutne su Neu5Ac i Neu5Gc, ponekad i zajedno u istoj „miješanoj“ strukturi (engl. *mixed N-glycan*) kao i Neu5Ac₂ i Neu5GcAc (ukupna *O*-acetilacija Sia ~ 60 %). Diantenarni N-glikani su, kao i kod čovjeka i miša, u N-glikomu štakora najzastupljeniji i najviše sijalinizirani. Za ostale glodavce nema gotovo nikakvih podataka o N-glikomu KP. U zamorčića je analiziran jedino N-glikom eritrocita (Byrd-Leotis i sur., 2019.) i antitijela IgG (Raju i sur., 2000.).

2.4 Biologija i ekologija golokrtičastoga štakora

Golokrtičasti štakor (*Heterocephalus glaber* Rüppell 1842) (engl. *naked mole-rat*, njem. *der Nacktmull*) vrsta je iz reda glodavaca (Rodentia) koja pripada jedinstvenoj porodici afričkih krtičastih štakora – Bathyergidae – sa šest rodova: *Fukomys*, *Cryptomys*, *Georychus*, *Bathyergus*, *Heliophobius* i *Heterocephalus* (Slika 2.8A). Godine 2014. predloženo je da se GŠ zbog jedinstvenih anatomskih i ekoloških odlika koje ga evolucijski znatno razlikuju od ostalih rodova, izdvoji u vlastitu porodicu – Heterocephalidae – unutar nadporodice Bathyergoidea (Patterson i Upham, 2014.). Prirodni areal ukupno tridesetak vrsta iz ovih rodova je Subsaharska Afrika, a za GŠ Etiopija, Kenija i Somalija.

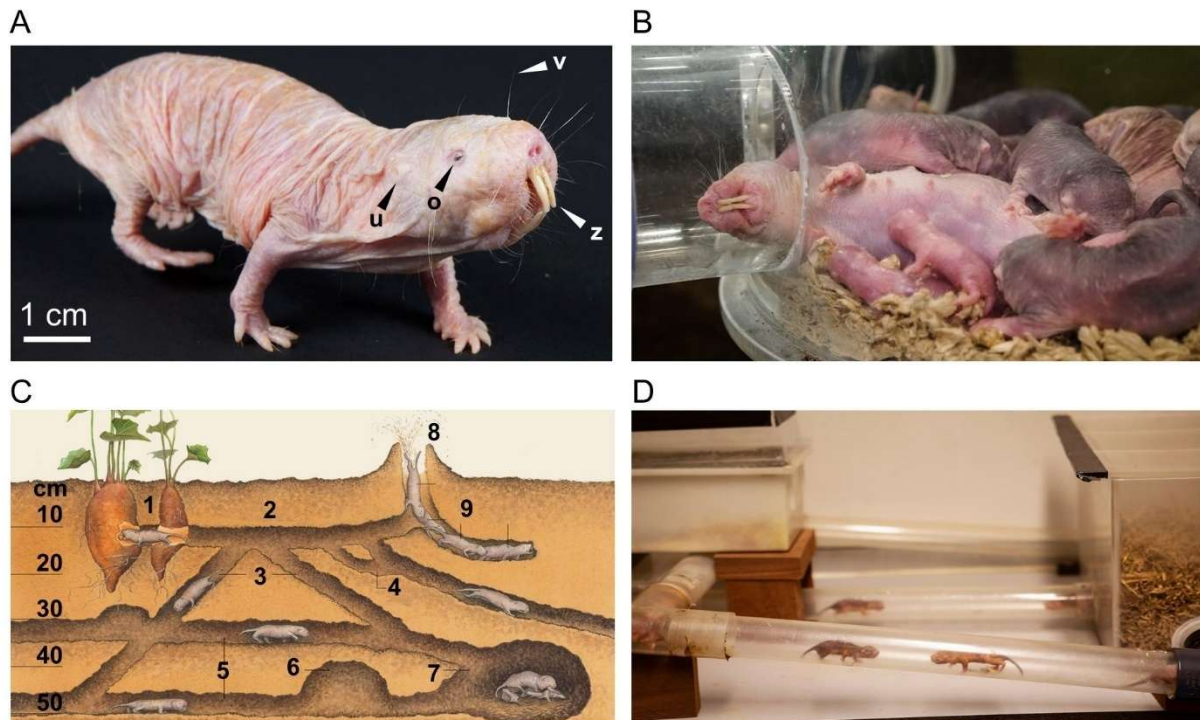


Slika 2.8. Pojednostavljeni prikaz filogenije porodice Bathyergidae (A). Vremenska skala prikazana je u milijunima godina (Ma). Brojevi pokraj čvorova filogenetskog stabla označavaju približno vrijeme divergencije u Ma. Crne strelice označavaju starost poznatih fosila za rodove *Heliophobius* i *Heterocephalus*. Crvena strelica označava približno vrijeme formiranja Istočnoafričke tektonske doline (engl. *Great Rift Valley*); događaja koji je znatno utjecao na evoluciju i specijaciju afričkih krtičastih štakora. Pokraj fotografija životinja u zagradama su navedeni: (broj vrsta unutar roda/prosječna veličina kolonije/maksimalna veličina kolonije). Upitnik (?) naznačava moguću kriptičnu raznolikost unutar roda (B). Prema stupnju socijalnosti, vrste iz nekih rodova su isključivo solitarne, neke socijalne s naznakama eusocijalnosti (*), a prava eusocijalna vrsta je samo GŠ (C). Preuzeto iz Faulkes i Bennett (2021.) i Lutermann (2022.) te prilagođeno.

Golokrtičasti štakor neobične je morfologije, cilindričnog tijela ružičaste do smeđe boje s jakim, kratkim nogama s pet prstiju i kandžicama te repom (**Slika 2.9A**). Duljina tijela mu je prosječno 7-12 cm uz duljinu repa 3-5 cm, a masa 15-70 g. Ženke-matice su redovito veće od ostalih jedinki (**Slika 2.9B**). Glava je blago koničnog oblika sa spljoštenom njuškom i velikim sjekutićima (incizivima) koji izlaze iz usta i preklapaju se, a slična denticija prisutna je i kod ostalih vrsta unutar porodice Bathyergidae. Oko 25 % mišićne mase čine žvačni mišići (*mm. masticatorii*). Fleksibilna simfiza mandibule omogućuje zatvaranje usta prilikom kopanja tla zubima, što je ključno u fosorijalnom načinu života GŠ koji kopajući tunele grade podzemne nastambe (Buffenstein i sur., 2012.; Delaney i sur., 2021.). Tijelo im nije pokriveno dlakom ali je na koži prisutno stotinjak vrlo osjetljivih, pravilno poredanih vibrisa koje omogućuju mehanorecepciju i orijentaciju prilikom kretanja u mraku. Koža je tanka, elastična i naborana što olakšava kretanje uskim tunelima, a smatra se da je gubitak tjelesnog pokrova važna termoregulacijska prilagodba (Buffenstein i Craft, 2021.). Pigment u koži smješten je u dermisu jer nije potreban za zaštitu. Oči GŠ su također reducirane jer za život u mraku nisu potrebne. Vidni živac (*n. opticus*) je sporog odziva, a same oči mogu detektirati jedino razlike u intenzitetu svjetlosti uz amorfne slike. Ušne školjke (*pinnae*) na glavi nisu prisutne, već samo prstenasta izbočina (*annulus*) čiji lumen vodi do unutarnjeg uha sa slabo okoštanim slušnim košćicama (*ossicula tympani*). Ipak, akustička komunikacija je vrlo važna u eusocijalnom načinu života ove vrste. Uho GŠ može detektirati frekvencije u rasponu 8 Hz do 125 kHz, a gotovo 20 različitih zvukova glasanja služi za identifikaciju, potvrđivanje hijerarhijske pripadnosti, iskazivanje agresije ili negodovanja, dozivanje mladunaca i dr. (Barker i sur., 2021.). Osjet mirisa također je razvijen, a GŠ imaju i reduciran vomeronazalni organ (Dennis i sur., 2020.).

Prirodna staništa GŠ nalaze se u aridnim i semiaridnim područjima što podrazumijeva život suhim i toplim uvjetima, s kratkotrajnim obilnim padalinama. Podzemne nastambe GŠ mogu dosezati do 2 m u dubinu, a sastoje se od međusobno povezanih iskopanih tunela i komora različite namjene poput spremanja hrane, obavljanja nužde i gniježđenja (**Slika 2.9C**). Čitav sustav tunela može biti ukupne duljine veće od 1 km. Glavni izvor hrane ovoj striktno herbivornoj vrsti su različiti gomolji, podanci i lukovice do kojih prokopavaju zasebne tunele. Nastamba je relativno zatvoren sustav u kojem životinje neprekidno održavaju tunele i komore, prenose hranu i brinu o leglima te rijetko izlaze na površinu pa su uglavnom zaštićeni od predatora i temperaturnih ekstrema.

Temperatura u nastambama je stalna i iznosi 28-31 °C, a slaba izmjena plinova i gusta naseljenost uzrokuje hipoksiju (10-15 % O₂) i hiperkapniju (~ 5 % CO₂) u dubljim dijelovima nastambe uz prisutnost CH₄ i NH₃ iz izmeta i urina (Buffenstein i sur., 2012.).



Slika 2.9. Habitus odraslog GŠ (A), ženka-matica s mladuncima iz legla (B), shematski prikaz presjeka tunela u prirodnoj nastambi GŠ (C) i izgled laboratorijske nastambe za uzgoj GŠ sa sustavom plastičnih tunela i komora (D). *v* – osjetne vibrise, *z* – izraženi gornji i donji sjekutići (incizivi), *u* – reducirano vanjsko uho bez ušne školjke, *o* – oko. 1 – hrana GŠ su pretežno geofiti, a u zatočeništvu batat, 2 – do izvora hrane u nastambi postoje tuneli za hranjenje (engl. *foraging tunnels*), 3-5 – glavni, stalni tuneli za kretanje (engl. *highways*) povezani su okomitim tunelima i ograncima, 6 – komora za hranu (engl. *food chamber*) ili toalet (engl. *toilet chamber*), 7 – komora za gniježđenje (engl. *nesting chamber*), 8 – intenzivno iskapanje tunela koje provodi kasta radnika, 9, može iznad nastambi stvoriti humke (engl. *mounds*). Preuzeto s URL7-10 i prilagođeno.

Stupnjem razvijene socijalnosti afrički krtičasti štakori su jedinstveni među sisavcima. Taj opseg obuhvaća potpuno solitarne, ksenofobne rodove *Heliophobius*, *Bathyergus* i *Georchus*, vrste kojih se pare jednom u sezoni, a potomci napuštaju nastambu odmah po odvikavanju od roditeljske skrbi. Drugu krajnost, socijalne do eusocijalne rodove *Fukomys*, *Cryptomys* i *Heterocephalus* odlikuje stvaranje zajednica-kolonija, a još k tome u vrsta *F. damarensis* i *H. glaber* i navodni poliandrični odnos u kojem se jedna ženka-matica (kraljica) dugoročno višekратно pari s do dva, odnosno do tri odabrana mužjaka (Slika 2.8C).

Noviji podaci to tradicionalno shvaćanje opovrgavaju i klasificiraju GŠ kao monogamnu vrstu (Szafranski i sur., 2022.). Potomci ove dvije vrste pokazuju natalnu filopatiju, što znači da ostaju vezani uz koloniju i doprinose joj različitim oblicima kooperativnoga ponašanja. Iz toga proizlazi da su, pojednostavljeno, eusocijalne vrste one koje žive u kolonijama sastavljenim od više generacija preklapajuće dobi poteklim od dvije ili nekoliko jedinki privilegiranih za stvaranje potomstva. Sve ostale jedinke su radnici-pomagači zaduženi za brigu o mladuncima, prikupljanje hrane i obranu; već prema kasti kojoj podjelom rada pripadaju (Buffenstein i sur., 2012.; Faulkes i Bennett, 2021.).

Ipak, takva kategorijska podjela ne omogućuje kvantifikaciju socijalnih obrazaca ponašanja pa je teško odrediti koja je vrsta doista eusocijalna i koliko. Stoga treba uzeti u obzir i maksimalnu veličinu kolonije te broj jedinki kao i učestalost napuštanja kolonije i zasnivanja nove. Neki autori su GŠ definirali eusocijalnim jer je permanentno (cjeloživotno) filopatričan, no to se nije pokazalo točnim jer neke jedinke koloniju ipak mogu napustiti, bez obzira što su migrantima šanse za disperziju i neovisno razmnožavanje male (Burda i sur., 2000.). O evoluciji socijalnosti u porodice Bathyergidae moguće je zaključivati samo na temelju živućih vrsta, no nije poznato kako se ona točno razvila i vjerojatno je uključivala više konvergentnih gubitaka i pojava socijalnosti. Zajednički predak mogao je biti solitaran, a socijalnost se potom pojavila neovisno u rodu *Heterocephalus* i zasebno u zajedničkog pretka rodova *Fukomys* i *Cryptomys*, s daljnjim razvojem eusocijalnosti u *H. glaber*. Druga mogućnost je socijalni zajednički predak i gubitak socijalnosti u pretka roda *Heliophobius* koji je ostao solitaran, a u drugih rodova se socijalnost ponovno pojavila (Faulkes i sur., 1997.).

Pokretača evolucije socijalnosti u ove porodice zasigurno ima nekoliko, a prema najzastupljenijoj AFDH hipotezi (engl. *Aridity Food Distribution Hypothesis*), natalna filopatija vodi do kooperativne brige za potomstvo kako bi se nadvladala neuspješna potraga za oskudnom hranom u sušnom okolišu (Lovegrove i Wissel, 1988.). Iako potpomognut prilagodbama na podzemni način života koji smanjuje opasnost od predatora i visoke temperature, GŠ hranu mora tražiti kopajući što je energetska zahtjevno. Što je suša izraženija, disperzija na nova staništa je sporija, pa socijalnost kolonije postaje sve koherentnija i vodi u eusocijalnost. Zato je očit benefit života u koloniji koja uz prosječnih 75 može imati i do 300 jedinki (**Slika 2.8B**) od kojih je većina zadužena za rad, a ne razmnožavanje (Burda i sur., 2000.; Faulkes i Bennett, 2021.).

U kolonijama GŠ izražen je tzv. reproduktivni zaokret (engl. *reproductive skew*), odnosno nejednako sudjelovanje jedinki istog spola u razmnožavanju. Ženke-matice svoj monopolizirajući status postižu i zadržavaju reproduktivnom supresijom ostalih ženki putem fizičke agresije umjesto feromona, dok kompeticija među mužjacima, potencijalnim partnerima, nije izražena. Radnici zaduženi za brigu o potomstvu koprofagijom iz izmeta ženke-matice unose estradiol što im mijenja ponašanje i pobuđuje alopentalni instinkt (Watarai i sur., 2018.). Ženke-matice GŠ uz gestacijski period od 64-74 dana mogu imati do četiri legla godišnje sa prosječno 12 mladunaca mase 1.0-2.5 g (Buffenstein i sur., 2012.). Nakon uginuća ili čak ubojstva kao posljedice napada konkurentice, ženku-maticu nasljeđuje nova koja prolazi dodatan razvoj spolnog i probavnog sustava (Coen i sur., 2021.). Fertilitet i fekunditet u ženki-matica ostaje nepromijenjen do duboke starosti uz kapacitet jajnika (engl. *ovarian reserve*) čak za oko 10 puta veći od drugih sisavaca slične veličine (Briño-Enríquez i sur., 2023.).

Ženka-matica i njezin(i) partner(i) pripadaju rasplodnoj kasti (engl. *breeders*) unutar kolonije GŠ i mogu se prepoznati prema odgurivanju drugih jedinki, hodanjem po njima unutar tunela ili spavanjem na ostalima unutar komore za gniježđenje. Nerasplodna kasta (engl. *non-breeders*) dijeli se na podkaste radnika (engl. *workers*), vojnika (engl. *soldiers*) i migranata (engl. *dispersers*). Radnici obavljaju kopanje i čišćenje tunela, prikupljanje hrane te timarenje i prenošenje mladunaca. U alopentalnoj brizi mužjaci i ženke sudjeluju gotovo ravnopravno. Vojnici nemaju ove obrasce ponašanja, ali su agresivni prema GŠ koji ne pripadaju koloniji i reagiraju na urušavanje tunela ili pojavu otvora. Disperzomorfna kasta migranata ima tendenciju bijega na površinu, migracije i zasnivanja novih kolonija u slučaju reproduktivnog neuspjeha postojeće kolonije, što narušava tezu o permanentnoj filopatiji kao ekskluzivnoj odrednici eusocijalnosti ove vrste (Holmes i Goldman, 2021.).

2.5. Golokrtičasti štakor kao modelni organizam

Golokrtičaste štakore moguće je uzgajati u laboratorijskim uvjetima ili u zoološkim vrtovima simulirajući njihovo prirodno stanište, no to je u usporedbi s miševima i štakorima mnogo zahtjevnije. Umjesto uobičajenih kaveza, kolonija GŠ mora se održavati u nastambi s najmanje tri plastične komore povezane tunelima, od kojih jedna mora imati grijanje za simulaciju promjena temperature u prirodi (**Slika 2.9D**).

Golokrtičasti štakori su vrlo osjetljivi na buku, vibracije i miris drugih životinja, a isto tako i na miris pripadnika druge kolonije pa se jedinke ne smiju miješati jer se ksenofobni GŠ mogu sukobiti. Iako sami nisu zoonotični za čovjeka, on im lako može prenijeti razne alergene i patogene čije širenje može uništiti koloniju. Zbog toga su nužne opsežne higijenske mjere koje uključuju dezinfekciju hrane i piljevine (Smith i Buffenstein, 2021.).

Zbog eusocijalnog ponašanja i kolonijalnog načina života s uspostavljenom hijerarhijom među jedinkama, GŠ nije moguće pariti po želji niti uzgojiti srodne sojeve. Također se zbog ustaljenih socijalnih odnosa u koloniji jedinke ne smiju razdvajati, primjerice, u kontrolne i tretirane eksperimentalne skupine kao što se to može s drugim glodavcima u zasebnim kavezima. Za neka istraživanja već su uspješno uzgajani i transgenični miševi koji ekspimiraju gene od interesa iz GŠ, npr. sintazu hijaluronske kiseline *nmrHas2* (engl. *naked mole-rat hyaluronic acid synthase 2*) (Zhang i sur., 2023.). Iako navedeno znatno ograničava i poskupljuje istraživanja, GŠ je zbog svog dugog životnog vijeka, ekstremofilnog načina života i fizioloških prilagodbi svejedno zanimljiv modelni organizam u biologiji dugovječnosti, sociobiologiji, neurofiziologiji, reproduktivnoj biologiji i dr. (Schuhmacher i sur., 2015.). Najatraktivnija primjena GŠ je ipak u istraživanju karcinogeneze i usporenog starenja jer je gotovo nepostojeći neoplastični rast u ove vrste opisan samo kod nekoliko životinja u zatočeništvu (Delaney i sur., 2013., 2016.; Shepard i Kissil, 2020.), a dokumentirana trenutno najstarija poznata jedinka doživjela je 37 godina starosti (Oka i sur., 2023.). To je u potpunoj suprotnosti s Gompertz-Makehamovim zakonom prema kojem stopa mortaliteta raste eksponencijalno s kronološkom dobi što izdvaja GŠ kao jedinstven biogerontološki model (Ruby i sur., 2024.).

2.6 Molekularni aspekti usporenog starenja i dugovječnosti golokrtičastoga štakora

Složeni fenotip biološkog starenja (engl. *senescence*) manifestira se višeslojno kroz fiziološke i patološke promjene u organizmu. Prvenstveno uključuje povećanu genomsku nestabilnost zbog nakupljanja oštećenja genskog materijala i jezgrine lamine kao i skraćivanja telomera, a sve uz manji kapacitet popravka DNA. Te promjene prate i one na razini epigenoma; uglavnom kroz hipometilaciju DNA i oslabljeno remodeliranje kromatina. Regenerativni potencijal tkiva, hematopoeza i proizvodnja matičnih stanica također slabe i dovode do tzv. imunološkog starenja (engl. *immunosenescence*) i pojave mijeloidnih malignih bolesti. Na razini stanice izražene su mitohondrijska disfunkcija kroz mutacije mtDNA, deregulacija signalnih puteva i međustanične komunikacije te gubitak proteostaze (López-Otín i sur., 2013.; Tomblin i sur., 2020.). Najsuvremenija „multi-omics“ istraživanja koja uključuju transkriptomiku, proteomiku, metabolomiku, lipidomiku i mikrobiomiku upućuju da prilikom starenja čovjeka većina molekularnih profila ima nelinearnu dinamiku. Iz toga slijedi da se biološko starenje ne odvija ujednačeno s kronološkom dobi već postoje kritični periodi intenzivnijih promjena (Shen i sur., 2024.). Za GŠ takvih sveobuhvatnih „omics“ istraživanja nema, no uočeno je da znaci starenja i slabosti postaju izraženi tek u posljednjem kvartilu života. Kod još živih jedinki to su usporeno kretanje, osteoartritis, sarkopenija i smanjena elastičnost kože (Lewis i Buffenstein, 2016.). Postmortalno su uočene hepatocelularna degeneracija s pigmentacijom koja potječe od lipofuscina, mineralizacija tkiva bubrega i kože, ablacija mrežnice oka i stanjena hrskavica u zglobovima (Edrey i sur., 2011.).

Istraživanje usporenog starenja i fizioloških prilagodbi GŠ na molekularnoj razini znatno se intenziviralo tek nakon sekvenciranja genoma ove vrste (Kim i sur., 2011.). Iz fenotipa usporenog starenja GŠ posebno se izdvajaju već gotovo općepoznata otpornost na karcinogenezu i tolerancija na hipoksiju i hiperkapniju (Lewis i Buffenstein, 2016.).

Pod pojmom raka (engl. *cancer*) podrazumijeva se niz bolesti koje uključuju abnormalan, neoplastični rast stanica u formi malignog solidnog ili hematološkog tumora uz mogućnost metastaziranja na druga tkiva i organe (Krieghoff-Henning i sur., 2017.). Kod laboratorijskih miševa više od 2/3 jedinki uginu s razvijenim nekim oblikom tumora (Ikeno i sur., 2009.), ali s uzgojem prvih kolonija GŠ u zatočeništvu vrlo rano je uočeno da ta vrsta gotovo i nema spontani neoplastični rast.

Tek kasnije je ipak zabilježena nekolicina jedinki s metastatskim hepatocelularnim karcinomom, nefroblastomom, limfosarkomom i adenokarcinomom jednjaka (Taylor i sur., 2017.). Pokušaj kemijske indukcije karcinogeneze otkrio je da GŠ, za razliku od miševa, tumore uopće ne razvijaju niti nakon dvije godine unatoč mjerljivim povećanim oštećenjima DNA i stanične smrti. Predloženi mehanizam je mutacija za gubitak funkcije gena-regulatora nekrotične stanične smrti (nekroptoze) što dovodi do oslabljenog imunog odgovora (Oka i sur., 2022.). Neuralne matične stanice i fibroblasti iz kože GŠ također su otporniji na γ -zračenje od mišjih zbog brže inicijacije popravka dvolančanih lomova DNA (Yamamura i sur., 2021.). Kasnije je predloženo da je uzrok uspješnijeg popravka DNA povišena ekspresija sirtuina 6 (SIRT6) koji potiče poli(ADP-ribozil)aciju uz oštećena mjesta, a time i popravak putem izrezivanja baza (Kosova i sur., 2019.). Maligno transformirane stanice imaju izražen gubitak kontaktne inhibicije (KI) što im omogućava nekontroliranu diobu. U fibroblastima GŠ je uz regularnu KI – kontroliranu aktivacijom o ciklinu neovisnog inhibitora kinaze p27^{Kip1} – otkrivena i tzv. rana KI pod kontrolom p16^{INK4a} (Seluanov i sur., 2009.). U čovjeka i miša je KI isključivo jednorazinska. Dodatno, ključni tumor-supresorski protein p53 ima kod GŠ oko 10 puta dulje vrijeme poluživota nego ljudski i mišji. Na funkciju p53 utječe više PTM čija deregulacija doprinosi tumorigenezi, ali možda kod GŠ i stabilnosti što zasad nije poznato (Deuker i sur., 2020.). Hijaluronan (HA) vrlo visoke molekulske mase (engl. *very high molecular mass hyaluronan*, vHMM-HA) otkriven je prvotno u staničnim kulturama fibroblasta GŠ, a kasnije i u većini drugih tkiva i to u većim koncentracijama nego u zamorčića i miša (del Marmol i sur., 2021.). Citoprotektivni učinak vHMM-HA vezan je uz receptor HA – antigen CD44 – ali i stupanj polimerizacije HA. Hijaluronani visoke i niske molekulske mase promoviraju odnosno suprimiraju protein-protein interakcije, pa nakupljeni vHMM-HA signalizira za aktivaciju spomenute rane KI (del Marmol i sur., 2021.; Takasugi i sur., 2020.). Hipersijalinizacija, izraženo grananje i fukozilacija N-glikana membranskih proteina karakteristična je za mnoge tumorske stanice pa bi poseban interes predstavljalo istraživanje aberantne N-glikozilacije u rijetkih tumora GŠ.

Predodžba da GŠ trajno živi u hipoksičnim uvjetima nije posve točna i vjerojatno je da su hipoksija i hiperkapnija prisutne samo u najdubljim dijelovima nastambe (Holtze i sur., 2018.). Unatoč tome ova vrsta je vrlo tolerantna na snižene koncentracije kisika i u eksperimentalno induciranoj anoksiji može preživjeti oko 18 minuta, a u hiperkapniji, pri 80 % CO₂, oko 5 sati (Park i sur., 2017.). Očekivani odgovor na akutnu hipoksiju je ubrzavanje disanja i snižavanje tjelesne temperature kako bi se smanjila stopa metabolizma.

No, golokrtičasti štakori pri hipoksiji ne mijenjaju brzinu disanja, a tjelesna temperatura snižava im se za 2-4 °C i to ne uobičajenom promjenom ponašanja koja dovodi do rasipanja topline već supresijom termogeneze. Otkriveno je da hipoksija inducira smanjenje mitohondrijske respiracije putem smanjene ekspresije termogenina, UCP1 (engl. *uncoupling protein 1*), u smeđem adipoznom tkivu GŠ. Posljedica toga je i smanjenje o drhtanju neovisne termogeneze (engl. *non-shivering thermogenesis*) (Cheng i sur., 2021.). Moždano tkivo je osobito osjetljivo na hipoksiju koja uzrokuje nagli priljev iona Ca^{2+} u međustanični prostor i staničnu smrt. U mozgu GŠ nalazi se veliki broj receptora *N*-metil-D-aspartata (NMDA) s podjedinicama GluN2D koji imaju manju permeabilnost za ione Ca^{2+} , a time i bolji neuroprotektivni učinak (Oka i sur., 2023.). Hiperkapnija uzrokuje metaboličku acidozu te kiselinom izazvanu bol na sluznicama i očima, no kod GŠ postoji mutacija o naponu ovisnog natrijevog kanala NaV1.7 za koju se smatra da je odgovorna za neosjetljivost na taj tip boli (Smith i sur., 2011.). K tome, hemoglobin GŠ ima veći afinitet prema kisiku nego mišji, pa je vjerojatno da i u hipoksiji učinkovito oksigenira tkiva bez stimulacije anaerobnog metabolizma (Johansen i sur., 1976.).

Od ostalih odrednica dugovječnosti mogu se još spomenuti usporena neurodegeneracija, nezamjetan gubitak srčane funkcije te otpornost na neke ksenobiotike i teške metale. U podlozi svih ovih neobičnih svojstava niz je proteina čija se dinamika i PTM tek počinju otkrivati.

2.6.1 Proteomika golokrtičastoga štakora

Iz malobrojnih provedenih istraživanja očito je da proteom GŠ ima neke osobitosti koje ga izdvajaju od ostalih bolje istraženih glodavaca. To su prvenstveno smanjena oksidacija i ubikvitinacija proteina (Pérez i sur., 2009.), povećana točnost translacije proteina i neobično dvostruko cijepanje 28S rRNA u usporedbi s mišem (Azpurua i sur., 2013.). Proteomska analiza jetre GŠ također je, uspoređujući filogenetski bliskog zamorčića (*Cavia porcellus*), otkrila smanjenu mitohondrijsku respiraciju te povećanu ekspresiju enzima uključenih u metabolizam lipida kao i citokroma P450, ključnog u biotransformaciji ksenobiotika. Uz to su u jetri GŠ pojačano eksprimirani peroksiredoksin 1 (PRDX1) i tioredoksin-reduktaza 1 (TrxR); važni za uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Heinze i sur., 2018.). Iako je u GŠ oksidativni stres mnogo izraženiji nego u miševa, čini se da nakupljanje oksidacijskih oštećenja ne skraćuje znatno životni vijek jer su stanice i tkiva na njih tolerantni (Andziak i sur., 2006.).

Goloktričasti štakor općenito ima izraženu pojačanu aktivnost proteasoma u jetri, koji kao dio ubikvitin-proteasomskog sustava uklanjaju pogrešno smotane i oksidirane proteine te pomažu održavanju proteostaze kao važne odrednice usporenog starenja (Rodriguez i sur., 2012.). Za fosforilaciju je pokazano da tijekom inducirane hipoksije regulira signalni put PI3K/AKT/mTOR (Al-attar i sur., 2020.). Uloga citrulinacije niza proteina krvne plazme i izvanstaničnih vezikula GŠ nije potpuno razjašnjena, ali je vjerojatno da omogućava multifunkcionalnost jednih te istih proteina – tzv. proteinski rad na crno (engl. *moonlighting proteins*) (Pamenter i sur., 2019.).

Proteinska homeostaza (proteostaza) obuhvaća skup molekularnih mehanizama na staničnoj razini koji putem šaperona, proteolitičkih enzima i drugih regulatora održavaju funkcionalan, zdravi proteom. Ti faktori kontrolom translacije, smatanja, održavanja konformacije i degradacije proteina – a pod neprekidnim utjecajem egzogenih i endogenih stresora tijekom starenja – koordiniraju rad proteostatske mreže. Kapacitet proteostatske mreže smanjuje se tijekom starenja pri čemu se nakupljaju pogrešno smotani proteini i njihovi agregati (Hipp i sur., 2019.). Takav deregulirani proteom dovodi do patofizioloških promjena jer pravilno smotani proteini više nisu pravovremeno i u potrebnim koncentracijama prisutni na odgovarajućem mjestu u stanici. Postoji nekoliko naznaka da proteostatska mreža GŠ tijekom starenja značajnije ne gubi funkciju te se razlikuje od one u drugih glodavaca.

Kako se većina proteina ne smata spontano u funkcionalnu strukturu, u taj su proces uključeni molekularni šaperoni koji već tijekom translacije štite N-kraj polipeptidnog lanca. Glavninu šaperona čine proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP) za čiju je bazalnu ekspresiju u fibroblastima kože GŠ utvrđeno da je usporediva s razinama HSP u miševa, ali u uvjetima staničnog stresa znatno raste osiguravajući dodatni citoprotektivni učinak (Pride i sur., 2015.). Dodatnim proteomskim istraživanjima i upotrebom spektrometrije masa otkriveno je da je diferencijalna ekspresija HSP iz proteinskih porodica HSP27, HSP40, HSP70 i HSP90 u tkivu jetre GŠ također relativno povišena za 0.5 do 2 puta u odnosu na miša. Proteini iz porodice HSP27 pripadaju holdazama i sprječavaju agregaciju proteina, HSP40 i HSP70 su najvažniji ATP-ovisni proteini odgovorni za smatanje i „trijažu“ proteina koji se neće uspješno smotati. Proteini iz porodice HSP90 ne sudjeluju u smatanju već izazivaju neznatne konformacijske promjene i stabilizaciju proteina koji trebaju postići aktivno stanje za vezanje liganda (Rodriguez i sur., 2016.).

Funkcionalna proteostatska mreža mora iz unutarstaničnog okoliša pogrešno smotane i disfunkcionalne proteine ukloniti. U dugoživućih organizama to podrazumijeva visoku bazalnu stopu aktivnosti proteasoma i/ili autofagije što je doista i potvrđeno kod GŠ. Ponovno, u lizatima tkiva jetre otkriveno je da su enzimske aktivnosti proteina sličnih kimotripsinu i tripsinu te koncentracije pojedinih proteasomskih podjedinica, povišene u odnosu na mišje tkivo (Rodriguez i sur., 2012.). Autofagija je katabolički mehanizam čijom se indukcijom unutar autofagosoma i zatim autolizosoma razgrađuju razne disfunkcionalne unutarstanične komponente, što u određenim slučajevima na molekularnoj razini utječe na dugovječnost organizma (Hansen i sur., 2018.). Mjerenjem omjera ekspresije autofagosomalnih markera LC3-II/LC3-I (engl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) u zvjezdastim stanicama jetre, utvrđeno je da je stopa autofagije u GŠ viša nego u miševa iste dobi (Zhao i sur., 2014.).

Osim pojedinačnih proteina i dugotrajno stabilne proteostaze, dugovječnosti GŠ doprinose i neki transkripcijski faktori i biokemijski signalni putevi kao središnji regulatori stanične homeostaze i otpornosti na stres. To su prije svega proteini FOXO (engl. *forkhead box O*), faktor 1 α inducibilan hipoksijom (HIF1 α), faktor 2 povezan s nuklearnim faktorom eritroidom 2 (NRF2), faktor toplinskog šoka 1 (HSF1) te signalni putevi mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) i inzulin/IGF1 (engl. *insulin-like growth factor 1*) (Narayan i sur., 2021.).

Poremećaji regulacije koncentracije glukoze i inzulina u krvi povezani su s nizom bolesti tijekom starenja. Kalorijska restrikcija u GŠ uzrokuje dugotrajne niske koncentracije glukoze u krvi, a koncentracija inzulina je gotovo nemjerljiva ELISA testom (Buffenstein i sur., 2007.). Ipak, životinje na injekcije glukoze reagiraju porastom i dugotrajnim zadržavanjem visoke koncentracije glukoze, a zatim, na inzulin, naglim padom nakon čega koncentracija glukoze u krvi ostaje duže vrijeme niska. Iako bi to upućivalo na inzulinsku rezistenciju, transkriptomaska istraživanja pokazala su da su komponente međusobno povezanih signalnih puteva inzulin/IGF1 i mTOR regulirane naniže. To rezultira pojačanom ekspresijom transkripcijskog faktora FOXO i autofagijom, ali smanjenom stopom sinteze proteina i u skladu je s opažanjima da je prekomjerna aktivacija mTOR učestala u dijabetesu tipa 2, Alzheimerovoj i drugim bolestima vezanima uz starenje (Lewis i Buffenstein, 2016.; Narayan i sur., 2021.). Tolerancija hipoksije ogleda se u povišenim koncentracijama proteina HIF1 α važnog u staničnoj adaptaciji na hipoksiju.

Premda su u proteomskim istraživanjima GŠ PTM proteina, pa tako i N-glikozilacija, zanemarene jer predstavljaju čitavu dodatnu razinu složenosti i zahtijevaju napredne analitičke pristupe, zanimljivo je da su u ljudskim signalnim putevima inzulin/IGF1 i HIF1 α upravo N-glikani važni regulatorni elementi (Arriagada i sur., 2019.; de-Freitas-junior i sur., 2017.). N-glikani kao amfipatske modifikacije relativno velike molekulske mase utječu na energetiku smatanja i hidratacije proteina te na njihovu stabilnost. Utjecaji N-glikana odgovorni su za proteostazu glikoproteina – glikoproteostazu – a interaktori u glikoproteostatskoj mreži su niz enzima i proteina koji sintetiziraju, razgrađuju, vežu ili transportiraju N-glikane. Uzima se da je intrinzični učinak N-glikozilacije na protein općenito stabilizirajući, a njemu zajednički doprinose vodikove veze, hidrofobne i CH- π interakcije. Načelno amfipatski N-glikani ipak imaju segregirane polarne i nepolarne regije, niz otapalu izloženih donora i akceptora H-veza te jedinstvenu CH- π interakciju β -vezanog prvog sržnog GlcNAc s aromatskim aminokiselinama (pretežno Phe) na poziciji -2 od Asn (Asensio i sur., 2013.). Ekstrinzično, N-glikani utječu na glikoproteostazu jer su ključni za kontrolu kvalitete smotanog proteina u ER, transport iz ER u GA i razgradnju u proteasomu kroz proces ERAD (Hebert i sur., 2014.). Iz tih razloga u glikomici naglasak ne treba biti samo na strukturnoj analizi i udjelima pojedinih struktura u N-glikomu, već i na fizikalno-kemijskim svojstvima N-glikana čije poznavanje je osnova za funkcionalne analize, a taj pristup pokušat će se primijeniti i u ovom istraživanju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Kemikalije i enzimi

Acetonitril (ACN), čistoće za LC-MS, Carlo Erba Reagents S.A.S.

Amonijak, vodena otopina, NH_3 (aq), $w = 25 \%$, Suprapur[®], Merck

Amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), puriss. p.a., $\geq 99.8 \%$, Honeywell

Argon, komprimirani, čistoće 5.0, Messer Croatia Plin d.o.o.

Boran-2-metilpiridin kompleks (2-pikolin-boran, 2-PB), 95 %, Sigma

C_{18} -modificirani silikagel u prahu, CHROMABOND[®] C_{18} ec, Macherey-Nagel GmbH & Co.

Dekstran ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n, $M_r \sim 40\ 000$, Sigma

4,5-dimetilbenzen-1,2-diamin (DMBA), 98 %, Sigma

Dimetil-sulfoksid (DMSO), ACS Reagent, $\geq 99.9 \%$, Sigma

Dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), $\geq 99 \%$, Sigma

Ditiotreitol (DTT), BioUltra, $\geq 99.5 \%$, Sigma

Dušik, komprimirani, čistoće 5.0, Messer Croatia Plin d.o.o.

EMPORE[™] oktadecil (C_{18}) diskovi za ekstrakciju na čvrstu fazu, 3M Company

Etanol (EtOH), apsolutni, p.a., Carlo Erba Reagents S.A.S.

Fosfatni pufer $5\times$ PBS (engl. *phosphate buffered saline*), pH 7.4 ± 0.1

Glikolna kiselina, ReagentPlus[®], 99 %, Sigma

IGEPAL[®] CA-630 neionski deterdžent, Sigma

Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), p.a., $\geq 99 \%$, BIOCHEM Chemopharma

Kalijev klorid (KCl), p.a., $\geq 99 \%$, BIOCHEM Chemopharma

2-kloroacetamid (2-CAA), 98 %, Sigma

Metanol (MeOH), čistoće za LC-MS, Carlo Erba Reagents S.A.S.

Mravlja kiselina (HCOOH), EMSURE[®], ACS Reagent, 98-100 %, Merck

Natrijev dodecil-sulfat (SDS), BioReagent, $\geq 98.5 \%$, Sigma

Natrijev klorid (NaCl), p.a., $\geq 99 \%$, BIOCHEM Chemopharma

Octena kiselina (CH_3COOH), puriss. p.a., $\geq 99.8 \%$, Honeywell

Otopina za kalibraciju spektrometra masa Bruker compact: ESI-L Low Concentration Tuning Mix, Agilent

Otopina za kalibraciju spektrometra masa Orbitrap Exploris 240: Pierce[™] FlexMix[™] Calibration Solution, Thermo Fisher Scientific

Peptid: N-glikozidaza F, rekombinantna, (PNGaza F), 10 U/ μL , Promega Corporation

Peptid: N-glikozidaza F, rekombinantna, (PNGaza F), liofilizirana, 100 U, Roche

Porozni grafitizirani ugljik (PGC), Extract-Clean[™], Sepachrom Srl.

Prokainamid (*p*-amino-*N*-(2-dietilaminoetil)benzamid, ProA), 99 %, Acros Organics
Propionska kiselina, ACS Reagent, ≥ 99.5 %, Sigma
Puferi za kalibraciju pH-metra: InLabTM Technical Buffer Solution pH 4.01 i 7.00 \pm 0.02, Mettler Toledo GmbH
Titanijev(IV) oksid (TiO₂), ReagentPlus[®], 99 %, Sigma
Trietilamin (TEA), $\geq 99.5\%$, Sigma
Trietilamonijev bikarbonat (TEABC); puferirana 1 M otopina (pH 8.5 \pm 0.1), Sigma
Trifluorooctena kiselina (TFA), Reagent Grade, ≥ 99 %, Honeywell
Tripsin, čistoće za sekvenciranje, liofiliziran, 100 μ g, Promega Corporation
Ultračista voda; proizvedena u sustavu Milli-Q[®] IQ 7000 (Merck), $\rho \geq 18$ M Ω
Urea, BioReagent, ≥ 98 %, Sigma
Voda obogaćena na izotop ¹⁸O (H₂¹⁸O), ≥ 98 %, NUKEM Isotopes GmbH

3.2 Laboratorijski uređaji i pribor

Analitička vaga Ohaus ExplorerTM EX224M, Ohaus Corp.
Inkubator, MRC Laboratory Instruments
Kolonice za ekstrakciju na čvrstu fazu; punjene C₁₈ silikagelom, 1 mL/100 mg, CHROMABOND[®] C₁₈ ec, Macherey-Nagel GmbH & Co.
Magnetna miješalica RET basic, IKA-Werke GmbH
Membranski filteri za pokretne faze Nalgene[®] Rapid-FlowTM Bottle Top Filters, aPES membrana, 0.2 μ m, \varnothing 75 mm, Thermo Fisher Scientific
Mikrocentrifuga MiniSpin, Eppendorf AG
pH-metar FiveEasyTM s elektrodom LE438, Mettler Toledo GmbH
Stolna centrifuga 5810 R, s rotorom za mikrotitarske pločice A-2-DWP, Eppendorf AG
Termalna folija za zatvaranje mikrotitarskih pločica Easy Pierce Heat Sealing Foil, Thermo Fisher Scientific
Termalni zatvarač mikrotitarskih pločica MicroTS Manual Heat Sealer, Vitl Life Science Solutions
Termoblok Eppendorf ThermoMixer[®] comfort, Eppendorf AG
Tresilica IKA[®] Rocker 2D, IKA-Werke GmbH
UV-VIS spektrofotometar za mikrovolumene NanoDropTM Eight, Thermo Fisher Scientific

Vakuumska centrifuga Savant™ SpeedVac™ SPD210 Vacuum Concentrator, Thermo Fisher Scientific

Vakuumska pumpa, model 13158, Pall Corporation

Vakuumski uređaj za filtarske pločice (engl. *vacuum manifold*), Pall Corporation

Vorteks miješalica Vortex-Genie® 2, Scientific Industries Inc.

Zamrzivač na -80 °C Forma™ FDE Series, Thermo Fisher Scientific

3.3 Kromatografi i vezani analitički sustavi LC-MS

LC1 (UPLC-FLD): Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti Waters Acquity UPLC® H-class s kvaternom pumpom, automatskim injektorom, grijačem kolone i detektorom fluorescencije. Instrument je upravlján pomoću računalnog programa Empower™, v. 3.6.1 (Waters Corporation, Milford, MA, SAD).

LC-MS1 (UPLC-FLD-Qq-TOF-MS): Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti Waters Acquity UPLC® H-class s kvaternom pumpom, automatskim injektorom, grijačem kolone i detektorom fluorescencije (Waters Corporation, Milford, MA, SAD); vezan s hibridnim tandemnim spektrometrom masa s kvadrupolom i detektorom vremena preleta iona Bruker compact koji je opremljen ionBooster™ ionskim izvorom za elektroraspršenje (engl. *electrospray ion source*) i upravlján pomoću računalnog programa Bruker oTOF Control, v. 3.3 i Compass HyStar, v. 3.2 (Bruker Daltonik GmbH & Co., Bremen, Njemačka).

LC-MS2 (nanoLC-Orbitrap): Nano-tekućinski kromatograf Dionex UltiMate™ 3000 RSLCNano System s analitičkom binarnom pumpom (raspon protoka 50-1500 nL min⁻¹), pomoćnom ternarnom pumpom (raspon protoka 10-2500 µL min⁻¹) i automatskim injektorom WPS-3000TPL s ventilom za preusmjeravanje protoka (engl. *switching valve*) na predkolonu za zadržavanje analita (engl. *trap column*). Kromatograf je vezan sa spektrometrom masa visoke rezolucije Orbitrap Exploris 240 opremljenim s EASY-Spray™ ionskim izvorom za nano-elektoraspršenje (engl. *nano-electrospray ion source*, nano-ESI) te upravlján pomoću računalnih programa Orbitrap Exploris Tune Application, v. 3.1.279.9 i Thermo Scientific Xcalibur, v 4.4.16.14 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

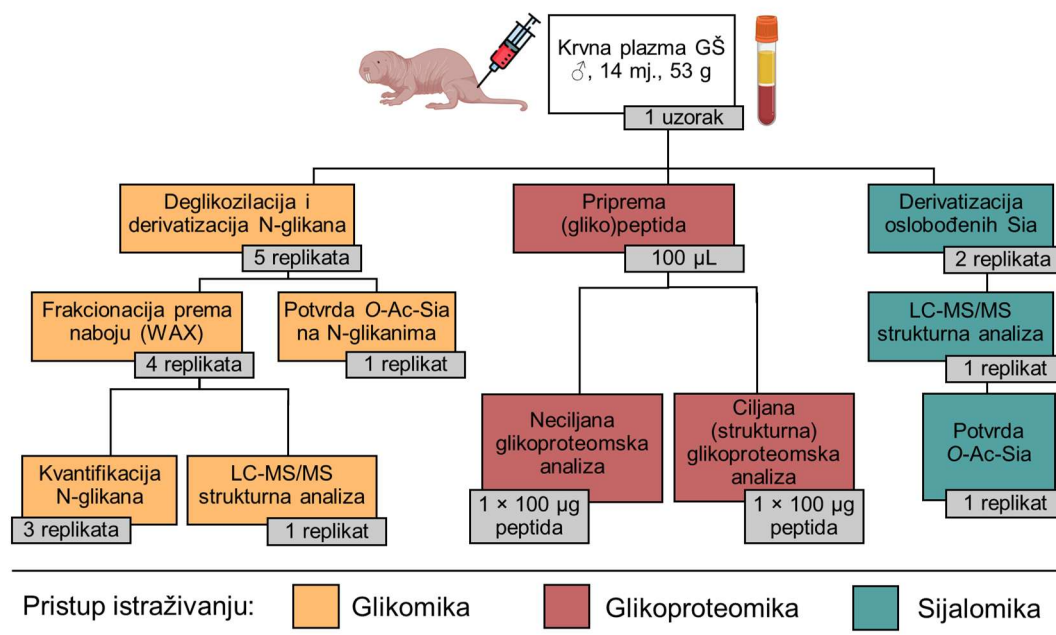
3.4 Pokusne životinje i uzorak krvne plazme

Kolonija golokrtičastih štakora uzgajana je u posebnoj nastambi u suradničkom Laboratoriju za senzornu neurofiziologiju i bol koji vodi prof. dr. sc. Ewan St. John Smith (*Department of Pharmacology, Corpus Christi College, University of Cambridge, UK*). Uzgoj i rad s golokrtičastim štakorima odobrio je *Animals in Science Regulation Unit, Home Office Science*, London, br. P7EBFC1B1, od 19. srpnja 2018.

Krv jednog mužjaka GŠ starosti 14 mjeseci i mase 53 g prikupljena je prilikom žrtvovanja u epruvetu s EDTA kao antikoagulansom. Krvna plazma (oko 600 μ L) je odmah odvojena centrifugiranjem na $5000 \times g$ tijekom 5 min, smrznuta u tekućem dušiku i transportirana na suhom ledu. Zaprmljeni uzorak odmrznut je i alikvotiran u volumene od 20 μ L koji su pohranjeni na -80 °C do analize. Istraživanje u sklopu ovog doktorskog rada provedeno je uz odobrenje Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (KLASA: 643-02/22-01/1, URBROJ: 251-58-10617-22-486, od 06. lipnja 2022.).

3.5 Eksperimentalni dizajn

Svi pokusi u ovom istraživanju provedeni su na jednom uzorku krvne plazme prema shemi na **Slici 3.1**. Prilikom osmišljavanja istraživanja slijedene su smjernice MIRAGE inicijative (engl. *Minimum Information Required for A Glycomics Experiment*) koje pokušavaju standardizirati dokumentiranje provedenih pokusa, nomenklaturu i usustaviti prikazivanje glikomskih podataka (York i sur., 2014.). Pojedinih priprema uzoraka, LC i LC-MS analize uneseni u MIRAGE predloške mogu se zajedno sa spektralnim datotekama i tablicama interpretiranih struktura pohraniti u online repozitorije glikomskih podataka. To osigurava transparentnost i otvoreni pristup podacima te će na taj način biti publicirani i rezultati ovog istraživanja.



Slika 3.1. Eksperimentalni dizajn i broj korištenih replikata ili količine uzorka za pojedine analize provedene u sklopu istraživanja N-glikoma krvne plazme golokrtičastog štakora.

3.6 Priprema pufera i pokretnih faza za tekućinsku kromatografiju

Za pripremu pufera, vodenih otopina soli i deterdženata, kiselina, razrijeđenih otopina acetonitrila (ACN), etanola (EtOH) i metanola (MeOH) te u pojedinim koracima opisanih protokola korištena je isključivo ultračista voda proizvedena u sustavu Milli-Q® IQ 7000. Prije početka svakog mjerenja pH-metar je kalibriran kupovnim puferima na pH 4.01 i 7.00.

- Fosfatni puferi 10× i 5× PBS

U čašu od 1 L ulije se oko 800 mL vode i otopi 80.02 g NaCl, 13.83 g Na₂HPO₄, 2.96 g KH₂PO₄ i 1.97 g KCl. Kada su se soli potpuno otopile, izmjeri se pH i po potrebi titrira s 1 M HCl(aq) ili NaOH(aq) tako da bude 6.6 ± 0.1. Otopina se zatim prelije u odmjernu tikvicu od 1 L, nadopuni vodom do oznake i profiltrira kroz membranski filter veličine pora 0.2 µm u čistu bocu. Za pripremu 5× PBS potreban se volumen razrijedi vodom u omjeru 1:1 (v/v) i titrira s 1 M NaOH(aq) do pH 7.4 ± 0.1.

- Temeljna 1 M otopina amonijeva acetata

U odmjernu tikvicu od 1 L ulije se oko 500 mL vode, doda 77.08 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ i promiješa da se sol otopi. Tikvica se zatim nadopuni vodom do oznake. Otopina se profiltrira kroz membranski filtar veličine pora 0.2 μm u čistu bocu.

- Puferirana 500 mM otopina amonijeva acetata, pH 4.5 ± 0.1

U čašu od 1 L menzurom se odmjeri 500 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4(\text{aq})$, $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ i 400 mL vode. Uz miješanje na magnetnoj miješalici otopini se izmjeri pH i titrira se octenom kiselinom na pH 4.5 ± 0.1 . Tako pripremljena otopina prelije se u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopuni vodom do oznake.

- Otapalo B za kromatografiju N-glikana na koloni sa slabim anionskim izmjenjivačem

U čistu bocu menzurom se odmjeri 500 mL 1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4(\text{aq})$, pH 4.5 ± 0.1 , zatim 300 mL vode i 200 mL ACN i promiješa. Nije potrebno filtrirati.

- Temeljna 2 M otopina amonijeva formijata, pH 4.4 ± 0.1

U čašu od 1 L ulije se 600 mL vode i ohladi u hladnjaku. Zatim se uz miješanje na magnetnoj miješalici u vodu doda 75.5 mL HCOOH te postupno ukupno 150 mL $\text{NH}_3(\text{aq})$ pazeći da temperatura ne prijeđe 25 °C. Čaša se zatim pokrije aluminijskom folijom i ostavi na miješalici sljedeća 2 h kako bi se pH stabilizirao. U otopinu se tada uroni elektroda pH-metra i titrira se uz miješanje s $\text{NH}_3(\text{aq})$ do pH 4.4 ± 0.1 , prelije u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopuni vodom do oznake. Tako pripremljena puferirana otopina HCOONH_4 profiltrira se kroz membranski filtar veličine pora 0.2 μm u čistu bocu.

- Otapalo B za kromatografiju N-glikana na HILIC koloni

U čistu bocu menzurom se odmjeri 950 mL vode i 50 mL 2 M $\text{HCOONH}_4(\text{aq})$, pH 4.4 ± 0.1 i promiješa. Nije potrebno filtrirati.

3.7 Enzimaska deglikozilacija proteina krvne plazme

U plastičnu mikroeprevetu volumena 1.5 mL (Eppendorf) otpipetirano je 20 μL 2 % (w/v) vodene otopine natrijeva dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl-sulfate*, SDS) i 10 μL krvne plazme te inkubirano 10 min na 60 °C u termobloku uz miješanje (600 min^{-1}), kako bi se denaturirali proteini. Nakon hlađenja, dodano je 10 μL 4 % (w/v) vodene otopine neionskog deterdženta IGEPAL[®] CA-630 i smjesa je ostavljena da odstoji 15 min na sobnoj temperaturi. Za enzimsku deglikozilaciju dodane su 2 U PNGaze F razrijeđene u ukupno 10 μL 5 × PBS (pH 7.4). Reakcijska smjesa inkubirana je na 37 °C tijekom 18 h.

3.8 Derivatizacija oslobođenih N-glikana prokainamidom

Oslobođeni N-glikani derivatizirani su s ProA kao fluoroforom dvostupanjskom reakcijom reduktivne aminacije. Pritom u prvom koraku reakcijom reducirajućeg kraja N-glikana i amino skupine ProA nastaje nestabilna Schiffova baza (imin) koja se u drugom koraku reducira s 2-PB u stabilan sekundarni amin. Nakon enzimske deglikozilacije, u reakcijsku smjesu s oslobođenim N-glikanima dodano je najprije 4.3 mg (18.3 μmol) ProA otopljenog u 25 μL smjese CH_3COOH i DMSO (30:70, v/v) i zagrijavano 1 h na 60 °C u termobloku. Potom je nakon hlađenja dodano 4.5 mg (42.1 μmol) 2-PB kao reducensa u 25 μL istog otapala. Zagrijavanje je nastavljeno na istoj temperaturi tijekom daljnjih 1,5 h.

3.8.1 Pročišćavanje derivatiziranih N-glikana ekstrakcijom na čvrstu fazu

Derivatizirani N-glikani pročišćeni su ekstrakcijom na čvrstu fazu (engl. *solid phase extraction*, SPE) utemeljenu na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC). Kao sorbens za HILIC-SPE upotrijebljena je membrana filtarske pločice s 96 jažica načinjena od hidrofilnog PTFE (Pall AcroPrep Advance wwPTFE, 1 mL, Pall Corp.). Čitav postupak proveden je pomoću vakuumnog uređaja za pločice s pripadajućom vakuumskom pumpom (engl. *vacuum manifold*) koji omogućava odsisavanje tekućine. Potreban broj jažica najprije je ispran s 200 μL 70 % EtOH (v/v) i 200 μL vode te kondicioniran dva puta s 200 μL 96 % ACN (v/v) ohlađenog na 4 °C. Nakon svakog koraka tekućina je iz jažica odsisana u podmetnutu plastičnu kadicu tako da primijenjeni vakuum ne prelazi 10 mmHg (13 hPa).

Reakcijska smjesa iz prethodnog koraka derivatizacije razrijeđena je s 900 μL ohlađenog čistog ACN i nanescena u kondicioniranu jažicu filtarske pločice wwPTFE. Suvišak tekućine je odsisan pri čemu se ProA-derivatizirani N-glikani vežu za hidrofilnu membranu. Zaostale hidrofobne primjese isprane su dodavanjem $5 \times 200 \mu\text{L}$ 96 % ACN (*v/v*). Derivatizirani N-glikani eluirani su s membrane filtarske pločice dodavanjem 180 μL vode u jažicu i centrifugiranjem eluata u podmetnutu PCR pločicu tijekom 5 min na $1000 \times g$. Pročišćeni derivatizirani N-glikani krvne plazme GŠ prebačeni su u mikroeprove, osušeni u vakuumskoj centrifugi na 40 °C i zamrznuti do daljnje analize.

3.9 Hidroliza dekstrana i derivatizacija izomaltooligosaharida za određivanje glukočnih jedinica N-glikana

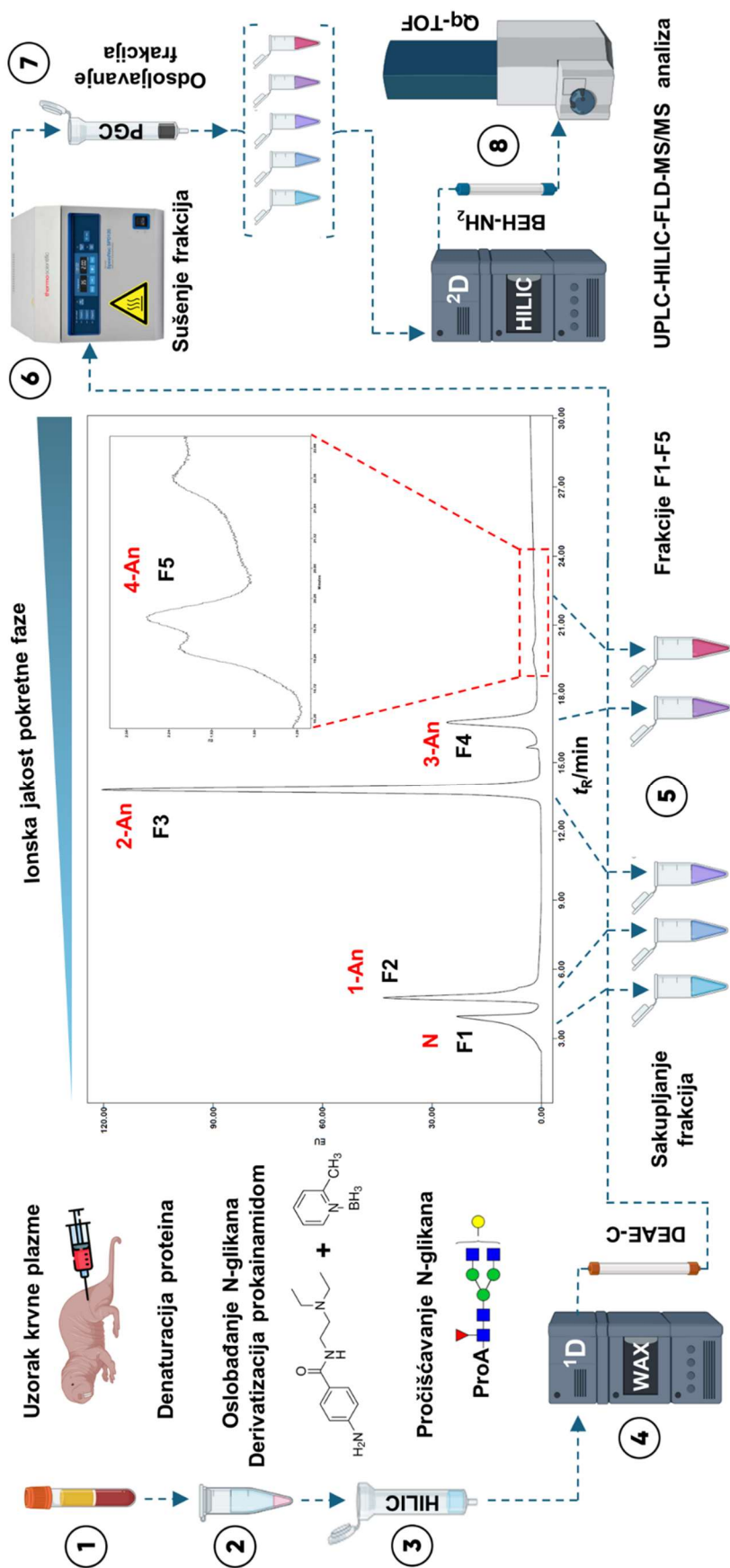
Osim upotrebe spektrometrije masa za strukturnu analizu N-glikana, u određenim bazama podataka za identifikaciju se još uvijek ponekad koriste i tzv. glukočne jedinice (engl. *glucose units*, GU). Hidrolizom dekstrana (Dex) – homopolimera sastavljenog od α 1,6-vezanih monomera glukoze u glavnom lancu – nastaju izomaltooligosaharidi različitog stupnja polimerizacije (engl. *degree of polymerization*, DP) koji se kao i N-glikani mogu derivatizirati i kromatografski odijeliti. Iz vremena zadržavanja oligosaharida poznatog DP i derivatiziranog N-glikana, moguće je izračunati njegovu GU vrijednost. Glukočne jedinice omogućuju usporedbu podataka dobivenih na različitim kromatografskim sustavima te su stoga ovdje određivane za svaki N-glikan.

Za kiselinsku hidrolizu u mikroeprovetu volumena 2 mL odvagano je 5 mg dekstrana i otopljeno u 1 mL 0.3 M trifluoroctene kiseline (TFA) (*v/v*). Smjesa je zagrijavana 1 h u termobloku na 95 °C uz miješanje na 800 min^{-1} . Nakon hlađenja, u pločicu s 96 jažica volumena 1 mL otpipetirano je 5 μL uzorka hidroliziranog dekstrana po jažici. Dobiveni izomaltooligosaharidi derivatizirani su s ProA i pročišćeni ekstrakcijom na čvrstu fazu kako je opisano za oslobođene N-glikane iz krvne plazme. Pročišćeni standard Dex-ProA pohranjen je na -20 °C otopljen u vodi.

3.10 Pristup LC-MS analizi N-glikoma krvne plazme

Zbog iznimne strukturne složenosti N-glikoma krvne plazme analizu nije bilo moguće provesti kako je prvotno planirano; kromatografski odjeljujući sve derivatizirane oslobođene N-glikane u jednoj analizi. Stoga je odabran analitički pristup s varijantom dvodimenzijske tekućinske kromatografije razdvojene u prostoru i vremenu te vezane sa spektrometrijom masa (engl. *offline two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry*, offline 2D-LC-MS). U prvoj su dimenziji (¹D) derivatizirani N-glikani frakcionirani prema naboju (engl. *charge profiling*) na koloni sa slabim anionskim izmjenjivačem (engl. *weak anion exchange resin*, WAX). Pritom s kolone najprije eluiraju neutralni N-glikani sakupljeni u neutralnu frakciju (F1), a zatim, porastom ionske jakosti pokretne faze, anionski N-glikani s jednom pa sve do četiri anionske – karboksilne, fosfatne i/ili sulfatne – funkcionalne skupine, sakupljeni u mono- do tetraanionsku frakciju (F2-F5). Nakon pročišćavanja, N-glikani iz frakcija F1-F5 odjeljivani su kromatografijom na HILIC koloni u drugoj dimenziji (²D) vezanoj sa spektrometrijom masa za strukturnu analizu (**Slika 3.2**).

Na ovaj način se složenost izvorne smjese analita u ¹D preraspodjeljuje na pet zasebnih frakcija što osigurava potpuno kromatografsko odjeljivanje u ²D bez koeluiranja, a time lakšu i detaljniju anotaciju pikova N-glikanskim strukturama iz interpretiranih fragmentacijskih spektara masa.



Slika 3.2. Shematski prikaz protokola za enzimsku deglikozilaciju proteina krvne plazme, derivatizaciju N-glikana, frakcionaciju prema naboju i LC-MS strukturnu analizu. **1** – denaturacija proteina deterdžentima; **2** – deglikozilacija PNGazom F i derivatizacija s ProA putem reakcije reaktivne aminacije; **3** – ekstrakcija na čvrstu fazu (HILIC-SPE); **4** – frakcionacija prema naboju u prvoj kromatografskoj dimenziji (1D) na WAX koloni uz detekciju fluorescencije; **5** – sakupljanje frakcija F1-F5 koje sadrže neutralne (N) i mono- (1-An) do tetraanienske N-glikane (4-An); **6**, **7** – sušenje i odsoljavanje frakcija na PGC; **8** – odjeljivanje N-glikana iz pojedinih frakcija na HILIC koloni u drugoj kromatografskoj dimenziji (2D) i strukturna analiza spektrometrijom masa.

3.11 Frakcionacija N-glikana prema naboju

Neutralni i mono- do tetraanionski N-glikani frakcionirani su kromatografijom na koloni GlycoSep™ C WAX, 7.5 × 75 mm, (ProZyme, Inc.) napunjenoj slabim anionskim izmjenjivačem – dietilaminoetil-celulozom (DEAE-C) – kao nepokretnom fazom. Kromatografska analiza provedena je na kromatografu LC1 (UPLC-FLD). Prije početka rada kolona je kondicionirana prema uputama proizvođača. Za pokretnu fazu korišteni su 20 % ACN (v/v) kao otapalo A te smjesa 500 mM CH₃COONH₄(aq), pH 4.5 ± 0.1, vode i ACN u omjeru 50:30:20 (v/v/v) kao otapalo B.

Kondicionirana kolona isprana je prije početka rada s 25 mL otapala A na protoku od 0.75 mL min⁻¹. Osušeni derivatizirani N-glikani otopljeni su u 55 µL otapala A i 50 µL je injektirano na kolonu. Kao slijepa proba injektiran je isti volumen otapala A. Uzorci u vialama su u automatskom injektoru održavani na 10 °C. Odjeljivanje je provedeno gradijentnim eluiranjem na 25 °C (**Tablica 3.1**).

Tablica 3.1. Gradijent otapala korišten za frakcionaciju N-glikana prema naboju na WAX koloni.

Vrijeme / min	Otapalo A / %	Otapalo B / %	Protok / mL min ⁻¹
0	100	0	0.5
5	100	0	0.5
35	0	100	0.5
40	0	100	0.5
41	100	0	0.5
60	100	0	0.5

Detektor fluorescencije postavljen je na odgovarajuću pobudnu i emisijsku valnu duljinu za ProA, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370$ nm, a multiplikacija signala (engl. *gain*) je zbog vrlo intenzivne fluorescencije i zasićenja detektora, smanjena s 1.0 na 0.2. Pet zasebnih N-glikanskih frakcija (F1-F5) sakupljeno je ručno u čiste mikroeprevete volumena 2 mL pomoću plastične kapilare montirane na izlaz protočne ćelije detektora fluorescencije. Dobivene frakcije uparene su do volumena od oko 100 µL u vakuumskoj centrifugi na 40 °C i zatim zamrznute na -80 °C.

3.11.1 Odsoljavanje frakcija ekstrakcijom na čvrstu fazu

Derivatizirani neutralni i anionski N-glikani su nakon frakcionacije onečišćeni znatnom količinom amonijeva acetata kojeg je potrebno ukloniti. Za to je kao sorbens korišten porozni grafitizirani ugljik (engl. *porous graphitic carbon*, PGC). Improvizirane kolonice za PGC-SPE pripremljene su u tzv. StageTip formatu (engl. *Stop-And-Go Extraction*), a originalno su razvijene za pripremu uzoraka u proteomici (Rappsilber i sur., 2007.). Potrebni StageTip-ovi izrađeni su od nastavaka za pipete volumena 200 μL u koje je, pomoću izrezivača sastavljenog od tupe metalne igle i plastične šprice, utisnut komadić diska EMPORETM C₁₈ ($\varnothing \sim 1 \text{ mm}$) kao nosač, tj. filter za čestice PGC. Zatim je uz neprekidno miješanje suspenzije na magnetnoj miješalici u kolonicu otpipetirano 50 μL PGC u MeOH ($\gamma = 50 \text{ mg mL}^{-1}$). Kolonice su pomoću plastičnog adaptera postavljene na otvor mikropruvete i centrifugirane 1 min na $2000 \times g$. Sorbens je potom ispran s $2 \times 200 \mu\text{L}$ ACN i ekvilibriran s $2 \times 200 \mu\text{L}$ vode; također centrifugirajući kolonice. Uzorci frakcioniranih ProA-derivatiziranih N-glikana razrijeđeni su vodom na ukupni volumen od 200 μL , nanoseni na PGC, te je sorbens ispran s 200 μL vode kako bi se uklonio amonijev acetat. Kolonice s adapterima nakon ovog su koraka premještene na čiste mikropruvete i vezani analiti su eluirani dodatkom 55 μL smjese 75 % ACN u 100 mM HCOONH₄(aq), (v/v). Uzorci su odmah prebačeni u plastične kromatografske viala.

3.12 HILIC-UPLC-FLD-MS/MS analiza N-glikana

Kromatografsko odjeljivanje i spektrometrija masa za strukturnu analizu N-glikana krvne plazme GŠ iz pojedinih frakcija provedena je pomoću vezanoga analitičkog sustava LC-MS1 (UPLC-FLD-Qq-TOF-MS). Odabrana je HILIC kolona ACQUITY UPLC[®] Glycan BEH Amide, $2.1 \times 150 \text{ mm}$, veličine čestica 1.7 μm i promjera pora čestica 130 Å (Waters Corporation). Za pokretnu fazu korišteni su 100 mM HCOONH₄(aq), pH 4.4 ± 0.1 , kao otapalo A i čisti ACN kao otapalo B. Eluiranje je provedeno gradijentno tijekom 90 min (**Tablica 3.2**) na koloni termostatiranoj na 50 °C. Volumen injektiranja iznosio je 50 μL , a uzorci su u automatskom injektoru održavani na temperaturi od 10 °C.

Tablica 3.2. Gradijent otapala korišten za kromatografiju N-glikana na HILIC koloni.

Vrijeme / min	Otapalo A / %	Otapalo B / %	Protok / mL min ⁻¹
0	25	75	0.56
2	25	75	0.56
92	40	60	0.56
94	70	30	0.35
99	70	30	0.35
100	25	75	0.56
110	25	75	0.56

Detektor fluorescencije postavljen je na odgovarajuću pobudnu i emisijsku valnu duljinu za ProA, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370$ nm te je izlaz protočne ćelije detektora plastičnom kapilaram spojen s ionskim izvorom spektrometra masa. Hibridni tandemni spektrometar masa s kvadrupolom i detektorom vremena preleta iona (Qq-TOF-MS) Bruker compact kalibriran je prije početka rada direktnom infuzijom kupovne otopine za kalibraciju. Kao plin za sušenje i raspršivanje korišten je dušik. Ionski izvor za elektroraspršenje sljedećim je postavkama prilagođen za protok pokretne faze iz kolone kako bi se osigurala efikasna ionizacija analita: napon na kapilari 2.25 kV, tlak plina za raspršivanje 5.5 bar, protok plina za sušenje 4 L min⁻¹, temperatura plina za sušenje 200 °C. Grijač nebulizatora također je namješten na 200 °C uz dodatni koaksijalni protok plina za sušenje od 3.3 L min⁻¹.

Fragmentacijski (MS/MS) spektri ioniziranih N-glikana prikupljeni su u pozitivnom polaritetu automatskog podatkovno ovisnog načina rada instrumenta (engl. *data-dependent acquisition*) u rasponu m/z 100-4000. Za fragmentaciju su po svakom MS spektru odabrana tri najintenzivnija prekursorska iona za MS/MS u ciklusu od 3 s. Dozvoljeni naboj prekursorskih iona ograničen je na +1 do +4, uz aktivno isključenje onih već fragmentiranih nakon tri prikupljena MS/MS spektra ili nakon proteklih ukupno 60 s. Za fragmentaciju je upotrijebljena kolizijom inducirana disocijacija (engl. *collision induced dissociation*, CID), uz argon kao kolizijski plin. Ovisno o naboju i m/z prekursorskog iona, primijenjena je stupnjevana (engl. *stepping*) kolizijska energija 20-40 eV za višestruko i 45-70 eV za jednostruko nabijene ione. Vrijeme transfera iona iz kolizijske ćelije bilo je 150 μ s, a vrijeme zadržavanja iona prije pulsa u TOF cijev 10 μ s pri naponu od 9 kV. Spektri masa pohranjivani su u profilnom obliku pri frekvenciji pretraživanja (engl. *scan rate*) od 1 Hz za MS i MS/MS.

Za određivanje GU, 12 μ L standarda Dex-ProA razrijeđeno je s 48 μ L ACN i na kolonu je injektirano 10 μ L koristeći istu metodu.

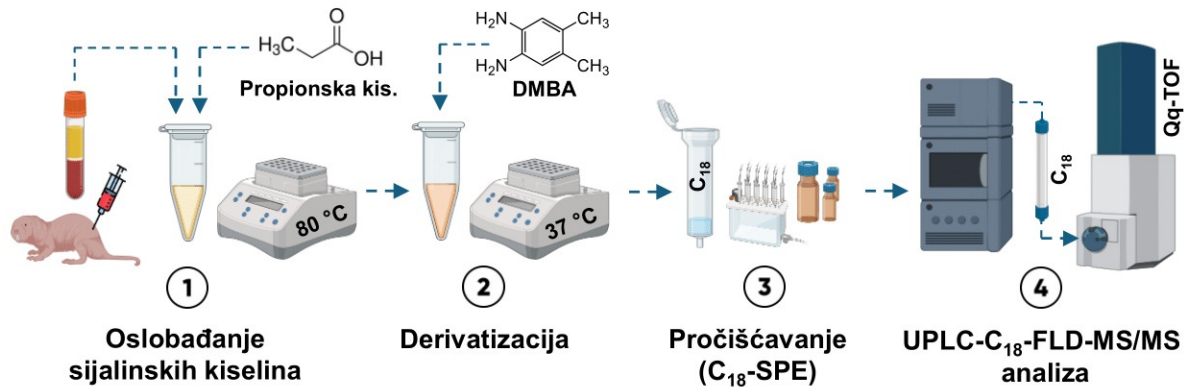
Replikati namijenjeni za relativnu kvantifikaciju N-glikana u pojedinim frakcijama analizirani su istom kromatografskom metodom na kromatografu LC1 (UPLC-FLD) uz detekciju fluorescencije ali bez spajanja sa spektrometrom masa.

3.13 Analiza oslobođenih sijalinskih kiselina

Sijalinske kiseline s glikoproteina krvne plazme oslobođene su kemijski; hidrolizom glikana s propionskom kiselinom na povišenoj temperaturi (**Slika 3.3**). U 190 μL 2.1 M propionske kiseline otpipetirano je 10 μL krvne plazme i smjesa je zagrijavana tijekom 3.5 sata u termobloku na 80 °C. Nakon hlađenja, uzorci su centrifugirani 10 min na $13\,000 \times g$ kako bi se istaložili denaturirani proteini. Supernatant ($\sim 180 \mu\text{L}$) je prenesen u čistu mikroeprevetu i osušen u vakuumskoj centrifugi na 40 °C.

Oslobođene sijalinske kiseline derivatizirane su s 4,5-dimetilbenzen-1,2-diaminom (DMBA) kao fluoroforom (Du i sur., 2020.). U osušene uzorke dodano je 50 μL vode i 50 μL 49 mM otopine DMBA, pripremljene otapanjem 13.3 mg DMBA u 2 mL 4 M $\text{CH}_3\text{COOH}(\text{aq})$. Reagens je osjetljiv na svjetlost te se važe u tami i priprema se svjež. Reakcijska smjesa zagrijavana je u termobloku – zaštićenom od svjetlosti aluminijskom folijom – na 60 °C tijekom 1 h. Nakon hlađenja u smjesu je dodan 1 mL vode čime se reakcija derivatizacije zaustavlja.

DMBA-derivati sijalinskih kiselina pročišćeni su ekstrakcijom na čvrstu fazu na kupovnim kolonicama volumena 1 mL napunjenima C_{18} -modificiranim silikagelom. Kolonice su najprije isprane s $2 \times 1 \text{ mL}$ 80 % ACN + 0.1 % TFA (v/v) i ekvilibrirane s $2 \times 1 \text{ mL}$ vode odsisavajući tekućinu pomoću vakuuma te pazeći da sloj silikagela ne ostane suh. Naneseni uzorci propuštani su kroz kolonice bez primjene vakuuma brzinom od 1 kapi u sekundi. Sorbens je potom ispran s $2 \times 1 \text{ mL}$ vode, a vezani analiti su eluirani s 1 mL 30 % ACN (v/v) u čiste mikroeprevete. Eluati su osušeni u vakuumskoj centrifugi na sobnoj temperaturi kako bi se uklonio ACN i odmah analizirani.



Slika 3.3. Shematski prikaz protokola za analizu oslobođenih sijalinskih kiselina. **1** – oslobađanje Sialina s proteina krvne plazme kiselinom hidrolizom; **2** – derivatizacija s DMBA kao fluoroforom; **3** – ekstrakcija na čvrstu fazu; **4** – kromatografsko odjeljivanje na C₁₈ koloni i strukturna analiza spektrometrijom masa.

3.13.1 RP-UPLC-FLD-MS/MS analiza oslobođenih sijalinskih kiselina

Kromatografsko odjeljivanje i spektrometrija masa za strukturnu analizu oslobođenih sijalinskih kiselina provedeni su pomoću vezanog analitičkog sustava LC-MS1 (UPLC-FLD-Qq-TOF-MS). Umjesto HILIC kolone korištena je C₁₈ kolona ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈, 1.0 × 100 mm, veličine čestica 1.7 μm i promjera pora čestica 130 Å (Waters Corporation). Eluiranje je provedeno gradijentno tijekom 30 min (**Tablica 3.3**) na koloni termostatiranoj na 45 °C. Za otapalo A pokretne faze korišten je 5 % ACN + 0.1 % HCOOH (v/v), a za otapalo B 95 % ACN (v/v). Osušeni uzorci otopljeni su u 50 μL otapala A te je na kolonu injektirano 5 μL.

Tablica 3.3. Gradijent otapala korišten za kromatografiju sijalinskih kiselina derivatiziranih s DMBA na C₁₈ koloni.

Vrijeme / min	Otapalo A / %	Otapalo B / %	Protok / mL min ⁻¹
0	100	0	0.1
0.5	100	0	0.1
32	80	20	0.1
33	0	100	0.1
36	0	100	0.1
36.5	100	0	0.1
41	100	0	0.1

Detektor fluorescencije postavljen je na odgovarajuću pobudnu i emisijsku valnu duljinu za DMBA, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 379/432$ nm. Sve postavke ionskog izvora za elektroraspršenje i Qq-TOF spektrometra masa bile su gotovo jednake kao i za analizu derivatiziranih oslobođenih N-glikana, uz sljedeće izmjene: kolizijska energija snižena je i postavljena fiksno na 18 eV, za fragmentaciju su iz MS spektara odabirani su samo prekursorski ioni naboja +1, a raspon prikupljanja spektara sužen je na m/z 50-1500.

3.13.2 De-*O*-acetilacija sijaliniziranih N-glikana i oslobođenih sijalinskih kiselina

Kao dodatna potvrda *O*-acetilacije sijalinskih kiselina koja je uočena u fragmentacijskim spektrima masa derivatiziranih N-glikana i oslobođenih Sia, provedena je i kemijska de-*O*-acetilacija u baznim uvjetima. Po jedan osušeni nefrakcionirani uzorak derivatiziranih N-glikana ili oslobođenih Sia otopljen je u 100 μ L 0.1 M vodene otopine trietilamina i inkubiran na 37 °C tijekom 18 h. Trietilamin je naposljetku uklonjen sušenjem u vakuumskoj centrifugi na 40 °C, a derivatizirani de-*O*-acetilirani N-glikani i Sia analizirani su zasebnim prethodno opisanim LC-MS metodama. Prednost de-*O*-acetilacije s trietilaminom nad često korištenom vodenom ili etanolnom otopinom NaOH je što smanjuje migraciju *O*-Ac-skupine, a trietilamin se lako uklanja sušenjem (Baumann i sur., 2015.).

3.14 Priprema uzoraka krvne plazme za glikoproteomske analize

Za glikoproteomske analize pripremljena je veća količina pročišćenih peptida iz 100 μL krvne plazme GŠ. Slijeden je publicirani protokol koji uključuje denaturaciju proteina, redukciju disulfidnih mostova, alkilaciju slobodnih cisteina, proteolizu tripsinom i pročišćavanje peptida putem SPE (Woo i Zhang, 2023.). Potrebne otopine za pripremu uzoraka pripremljene su svježe:

- **Otopina 1:** 50 mM TEABC. U 19 mL vode doda se 1 mL kupovne puferirane 1 M otopine TEABC i promiješa.
- **Otopina 2:** 8 M urea + 10 mM DTT. U 10 mL Otopine 1 otopi se 4.8 g uree i 15.4 mg DTT.
- **Otopina 3:** 420 mM 2-CAA. U 1 mL Otopine 1 otopi se 39.2 mg 2-CAA. Otopina se čuva zaštićena od svjetlosti.
- **Otopina tripsina:** $\gamma = 1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. U vialu sa 100 μg liofiliziranog tripsina doda se 1 mL pufera priloženog u pakiranju. Otopljeni tripsin se alikvotira i čuva na -20°C .

U 10 mikroeproveta volumena 1.5 mL otpipetirano je 50 μL Otopine 2 i 10 μL krvne plazme. Uzorci su inkubirani 1 h na 37°C u termobloku kako bi se denaturirali proteini. Nakon hlađenja, u uzorke je dodano 5 μL Otopine 3 za alkilaciju (karbamidometilaciju) slobodnih cisteina i inkubirano u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 1 h. Reakcija alkilacije prekinuta je dodatkom 5 μL Otopine 2, tj. suviškom DTT. Približna koncentracija proteina u otopini izmjerena je kao apsorbancija na 280 nm u 3 μL svakog uzorka na UV-VIS spektrofotometru za mikrovolumene. Na kraju su uzorci razrijeđeni s 515 μL Otopine 1 kako bi množinska koncentracija uree prije dodatka tripsina bila ispod 0.9 M. Svih 10 pripremljenih uzoraka je prije proteolize pomiješano u jedan alikvot. Približna koncentracija proteina u otopini izmjerena kao srednja vrijednost apsorbancije (280 nm) na 3 μL uzorka u triplikatu na UV-VIS spektrofotometru za mikrovolumene NanoDropTM Eight. Zatim je u pločicu s 96 jažica volumena 1 mL otpipetirano 100 μL uzorka što je prema koncentraciji odgovaralo $\sim 60 \mu\text{g}$ proteina po jažici. Za proteolizu je u svaku jažicu dodano 2 μL otopine tripsina (maseni omjer tripsina i proteina 1:30). Pločica je potom zatvorena termalnom folijom i inkubirana na 37°C tijekom 18 h.

3.14.1 Pročišćavanje peptida ekstrakcijom na čvrstu fazu

Reakcija proteolize zaustavljena je dodatkom 400 μL 0.1 % TFA (v/v) u uzorke. Dobiveni peptidi pročišćeni su tehnikom RP-SPE na C_{18} -modificiranom silikagelu u filtarskoj pločici s 96 jažica Orochem OF1100, veličine pora 10 μm (Orochem Technologies Inc.). Jažice su najprije napunjene sorbensom pripremljenim u obliku suspenzije C_{18} -modificiranog silikagela u 80 % ACN (v/v) masene koncentracije 50 mg mL^{-1} . Uz neprekidno miješanje suspenzije na magnetnoj miješalici u svaku je jažicu otpipetirano 200 μL što odgovara masi sorbensa od oko 10 mg. Pomoću vakuumskeg uređaja za pločice višak ACN-a je odsisan u podmetnutu kadnicu, a sorbens je ispran s još $2 \times 200 \mu\text{L}$ ACN te kondicioniran s $2 \times 200 \mu\text{L}$ 0.1 % TFA (v/v). Na tako pripremljen sorbens nanoseni su uzorci uz miješanje sadržaja u jažici multikanalnom pipetom. Nakon 1 min višak tekućine je odsisan, a sorbens je ispran s $2 \times 200 \mu\text{L}$ 0.1 % TFA (v/v). Vezani peptidi eluirani su dodatkom 150 μL 80 % ACN (v/v) centrifugirajući filtarsku pločicu postavljenu na čistu PCR pločicu pri $500 \times g$ tijekom 5 min. Pročišćeni peptidi iz svih 10 alikvota osušeni su u vakuumskoj centrifugi na 40 $^{\circ}\text{C}$, otopljeni u 50 μL vode i pomiješani u zajednički alikvot. Približna koncentracija peptida izmjerena je spektrofotometrijski na 280 nm. Vodena otopina peptida pohranjena je na -80 $^{\circ}\text{C}$ u inertnoj plastičnoj mikroepreveti Eppendorf LoBind[®]. Iz tako pripremljene i pročišćene smjese peptida pročišćavani su sijaloglikopeptidi za ciljanu i neciljanu glikoproteomsku analizu.

3.14.2 Afinitetno pročišćavanje sijaloglikopeptida na titanijevom(IV) oksidu

Biomolekule s negativno nabijenim funkcionalnim skupinama poput fosfopeptida, fosfolipida, nukleinskih kiselina i sijalinskih kiselina pokazuju znatan afinitet prema vezanju na površinu titanijeva(IV) oksida. Na tom je načelu utemeljeno i afinitetno ciljano pročišćavanje sijaloglikopeptida koji se u vrlo kiselim uvjetima vežu na TiO_2 kao sorbens stvarajući multidentatne površinske komplekse (Larsen i sur., 2007.). U prisutnosti 2,5-dihidroksibenzojeve, ftalne ili glikolne kiseline njihovim se kompetitivnim vezanjem na površinu TiO_2 dodatno smanjuje neselektivno vezanje nemodificiranih peptida. Djelomično izmijenjen protokol iz literature (Palmisano i sur., 2010.) primijenjen je za afinitetno pročišćavanje sijaloglikopeptida iz krvne plazme GŠ (**Slika 3.4.**). Potrebni puferi pripremljeni su svježi kako slijedi:

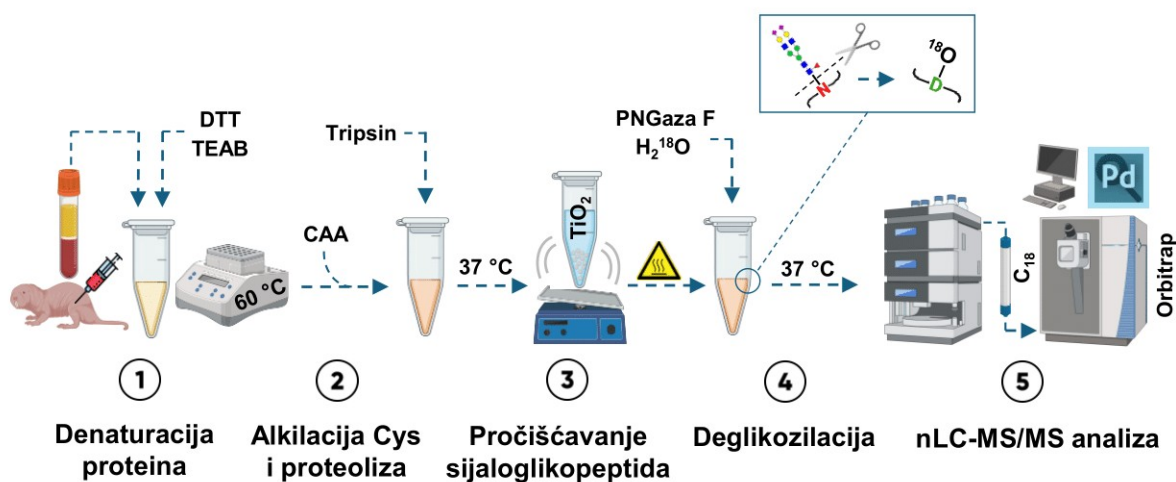
- **Pufer za vezanje:** 1 M glikolna kiselina u 80 % ACN + 5 % TFA (v/v). U smjesi od 18.9 mL ACN i 4.8 mL vode otopi se 1.9 g glikolne kiseline, te se doda 1.25 mL TFA.
- **Pufer za ispiranje A:** 80 % ACN + 19 % H₂O + 1 % TFA (v/v/v). U smjesu od 19.8 mL ACN i 4.9 mL vode doda se 250 µL TFA.
- **Pufer za ispiranje B:** 2 % ACN + 97.9 % H₂O + 0.1 % TFA (v/v/v). U smjesu od 24.5 mL vode i 0.5 mL ACN doda se 25 µL TFA.
- **Pufer za eluiranje:** 2 % NH₃(aq) (w/v). U 9.2 mL vode doda se 800 µL 25 % NH₃(aq), (w/v).
- **Suspencija TiO₂ u ACN:** $\gamma = 100 \text{ mg mL}^{-1}$. U 10 mL ACN doda se 1 g TiO₂ i magneti c za miješanje.

U čiste mikroepuvete LoBind[®] otpipetirano je, uz neprekidno miješanje suspenzije na magnetnoj miješalici, 10 µL suspenzije TiO₂ u ACN i osušeno u vakuumskoj centrifugi; što odgovara 1 mg sorbensa potrebnog za pripremu jednog uzorka. Od alikvota peptida dobivenih proteolizom proteina krvne plazme otpipetiran je volumen ekvivalentan ~ 100 µg peptida, razrijeđen s 1 mL Pufera za vezanje i prebačen u mikroepuvetu s TiO₂. Smjesa uzorka i sorbensa miješana je 30 min na horizontalnoj tresilici pri brzini od 80 min⁻¹. Zatim je sorbens istaložen centrifugiranjem 1 min na 1000 × g, a supernatant odbačen. Talog TiO₂ ispran je najprije s 400 µL Pufera za vezanje uz miješanje na tresilici tijekom 1 min i ponovno istaložen centrifugiranjem, a zatim također s po 400 µL Pufera za ispiranje A i B, ponavljajući postupak. Kako bi se uklonili tragovi kiseline koji smetaju eluiranju u lužnatim uvjetima, sorbens je nakratko osušen u vakuumskoj centrifugi. Na suhi TiO₂ dodano je 200 µL Pufera za eluiranje i miješano na tresilici tijekom 20 min. Nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u plastičnu kromatografsku vialu i osušen u vakuumskoj centrifugi na 40  C.

3.15 Neciljana glikoproteomska analiza sijaloglikopeptida

Ishodišni proteini i njihova N-glikozilacijska mjesta zauzeta sijaloglikanima identificirani su neciljanom glikoproteomskom analizom koja ne pruža informaciju o sastavu i strukturi N-glikana, već samo o proteomu koji je njima modificiran. U tu su svrhu sijaloglikopeptidi, afinitetno pročišćeni na TiO₂, deglikozilirani enzimski, PNGazom F, ali reakcijom u vodi obogaćenoj na izotop ¹⁸O (H₂¹⁸O). Pritom dolazi do konverzije Asn iz aminokiselinskog sekvona N-glikozilacijskog mjesta u Asp i isoAsp putem reakcije deamidacije, te nastaju ¹⁸O₁-Asp i dijelom ¹⁸O₁-isoAsp.

Tu modifikaciju moguće je putem promjene mase peptida (+2.988 Da) pretraživati pri analizi proteomskih podataka i odrediti koja su obilježena N-glikozilacijska mjesta doista bila zauzeta sijaliniziranim N-glikanima. Provođenjem reakcije deglikozilacije u običnoj vodi ($H_2^{16}O$) promjena mase peptida iznosi +0.984 Da što je također pogodno za identifikaciju, ali time nije moguće razlikovati enzimski kataliziranu od spontane deamidacije i hidrolize N-glikana do koje dolazi u fiziološkim uvjetima posredstvom susjednih aminokiselina, osobito Gly, vezanih na C-kraj Asn. Ovim pristupom također se mogu nedvojbeno razlikovati N-glikopeptidi od fosfopeptida koji se vežu na TiO_2 . U originalnom protokolu uzorak se prije nanošenja na TiO_2 zato mora tretirati alkalnom fosfatazom što uz enzimsko obilježavanje s ^{18}O nije potrebno.



Slika 3.4. Shematski prikaz protokola za neciljanu glikoproteomsku analizu sijaloglikopeptida. **1** – denaturacija proteina i redukcija S-S mostova; **2** – alkilacija slobodnih Cys i proteoliza tripsinom; **3** – afinitetno pročišćavanje sijaloglikopeptida na TiO_2 ; **4** – enzimsko deglikozilovanje u $H_2^{18}O$ za obilježavanje N-glikozilacijskih mjesta; **5** – proteomska analiza deglikopeptida pomoću nLC-MS/MS. Umetnuta manja slika prikazuje konverziju Asn u $^{18}O_1$ -Asp prilikom deglikozilacije.

3.15.1 Deglikozilacija sijaloglikopeptida i enzimsko obilježavanje N-glikozilacijskih mjesta izotopom ^{18}O

Liofilizirana PNGaza F (100 U) otopljena je u 100 μL H_2^{18}O kako se u reakcijsku smjesu ne bi unosila obična voda čime se smanjuje udio deglikoziliranih peptida s enzimski ugrađenim ^{18}O . U osušeni uzorak sijaloglikopeptida dodano je 30 μL H_2^{18}O i 2 U PNGaze F. Reakcijska smjesa inkubirana je na 37 °C tijekom 18 h.

3.15.1.1 Pročišćavanje peptida ekstrakcijom na čvrstu fazu

Za uklanjanje PNGaze F, deglikozilirani peptidi pročišćeni su ekstrakcijom na čvrstu fazu koristeći kolonice – StageTip-ove – volumena 200 μL napunjene s dva diska C_{18} sorbensa kako je prethodno opisano. Svaki korak proveden je uz centrifugiranje na $2000 \times g$ tijekom 1 min. Uzorci su zakiseljeni sa 70 μL 0.1 % TFA (v/v) i nanoseni na sorbens prethodno ispran sa 100 μL 80 % ACN (v/v) i kondicioniran sa 100 μL 0.1 % TFA (v/v). Vezani peptidi isprani su sa 100 μL 0.1 % TFA (v/v), eluirani s 50 μL 80 % ACN (v/v) u plastičnu kromatografsku vialu i osušeni u vakuumskoj centrifugi na 40 °C.

3.15.2 nanoLC-MS analiza

Analiza pročišćenih deglikoziliranih sijaloglikopeptida provedena je na vezanom analitičkom sustavu LC-MS2 (nanoLC-Orbitrap). Osušeni peptidi otopljeni su u 15 μL 0.1 % HCOOH (v/v). Volumen od 1 μL injektiran je uz protok od 15 $\mu\text{L min}^{-1}$ otapala A iz pomoćne pumpe na C_{18} predkolonu za zadržavanje uzorka AcclaimTM PepMapTM 100 C_{18} , dimenzija 0.3 \times 5 mm, veličine čestica 5 μm (Thermo Fisher Scientific), montiranu na ventil za preusmjeravanje protoka. Nakon 5 min, okretanjem ventila protok je iz analitičke pumpe preusmjeren kroz predkolonu čime započinje eluiranje vezanih analita. Peptidi su kromatografski odijeljeni na nano-LC koloni AcclaimTM PepMapTM RSLC C_{18} , dimenzija 75 $\mu\text{m} \times 15$ cm, veličine čestica 3 μm i promjera pora čestica 100 Å (Thermo Fisher Scientific). Kolona ima ugrađen metalni kontakt za visoki napon i emiter, te grijač kojim je kolona zagrijavana na 30 °C. Eluiranje je provedeno gradijentno, tijekom 180 min (**Tablica 3.4**). Kao otapalo A korištena je 0.1 % HCOOH (v/v) na obje pumpe, a kao otapalo B 80 % ACN + 0.1 % HCOOH (v/v). Uzorak je u automatskom injektoru održavan na temperaturi od 10 °C.

Tablica 3.4. Gradijent otapala korišten za kromatografiju peptida na C₁₈ koloni. *Pozicije ventila za preusmjerenje protoka: P1 – zadržavanje analita na predkoloni protokom iz pomoćne pumpe, P2 – eluiranje s predkolone protokom iz analitičke pumpe.

Vrijeme / min	Analitička pumpa			Pomoćna pumpa		
	Otapalo A / %	Otapalo B / %	Protok / nL min ⁻¹	Ventil *	Otapalo A / %	Protok / μL min ⁻¹
0	99	1	200	P1	100	15
5	95	5	200	P2	100	15
185	60	40	200	P2	100	15
190	20	80	200	P2	100	15
195	20	80	200	P2	100	15
200	99	1	200	P1	100	15
210	99	1	200	P1	100	15

Spektrometar masa Orbitrap Exploris 240 kalibriran je prije početka rada direktnom infuzijom kupovne otopine za kalibraciju. Zbog vrlo malog protoka pokretne faze plin za sušenje i raspršivanje prilikom ionizacije nano-elektoraspršenjem nije potreban. Napon na emiteru postavljen je na 2.1 kV u pozitivnom polaritetu, a ulazna kapilara za transfer iona zagrijavana je na 270 °C kako bi se osigurala potpuna desolvatacija ioniziranih analita bez njihovog raspadanja. Prekursorski ioni odabrani su za fragmentaciju u automatskom podatkovno ovisnom načinu rada instrumenta u rasponu m/z 350-1550, pri rezoluciji od 60 000. Radiofrekventna (RF) ionska leća postavljena je na razinu od 70 % za optimalno propuštanje iona očekivanog m/z raspona. Očekivana širina kromatografskog pika zadana je s 25 s, minimalni intenzitet prekursorskih iona 10⁴, a raspon naboja od +2 do +6. Ioni neodredivog naboja ili naboja +1 nisu odabrani za fragmentaciju. Automatska kontrola pojačanja signala (engl. *Automatic Gain Control*, AGC) postavljena je na 300 % (3 × 10⁶ iona), a vrijeme injektiranja iona automatsko. Po jednom MS događaju (skenu) u kojem se odabiru prekursorski ioni zadano je 12 ovisnih uzastopnih MS/MS događaja koji su zajedno činili jedan ciklus. Za fragmentaciju iona upotrijebljena je kolizijom inducirana disocijacija povišene energije (engl. *Higher-energy Collisional Dissociation*, HCD). Normalizirana kolizijska energija (engl. *Normalized Collision Energy*, NCE) postavljena je fiksno na 30 %, a kao kolizijski plin korišten je dušik čistoće 5.0.

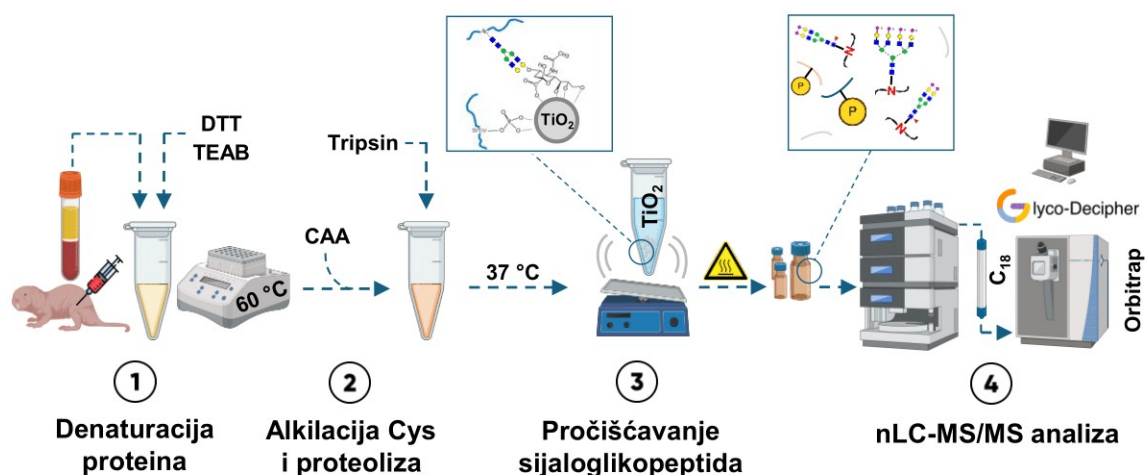
Fragmentacijski spektri prikupljeni su pri rezoluciji od 15 000 uz AGC od 200 % (2 × 10⁵ iona), vrijeme injektiranja iona 22 ms te širinu izolacijskog prozora m/z 1.3. Nakon jednog MS/MS spektra po prekursorskom ionu, isti je isključen iz odabiranja tijekom narednih 25 s.

3.16 Ciljana (strukturna) glikoproteomska analiza *O*-acetiliranih sijaloglikopeptida

Ciljana glikoproteomska analiza istovremeno daje uvid u aminokiselinski slijed peptida, N-glikanske strukture na njima i ishodišne proteine s kojih oni potječu. Stoga sijaloglikopeptidi pročišćeni na TiO₂ za ovu analizu nisu deglikozilirani već su analizirani koristeći istu kromatografsku i djelomično modificiranu MS metodu kako bi se dobili što kvalitetniji fragmentacijski spektri (Slika 3.5).

3.16.1 nanoLC-MS analiza

Osušeni uzorak sijaloglikopeptida otopljen je u 15 μ L 0.1 % HCOOH (*v/v*). Volumen od 1 μ L injektiran je na C₁₈ predkolonu za zadržavanje uzorka i odijeljen kromatografski na vezanom analitičkom sustavu LC-MS 2 (nanoLC-Orbitrap) kako je opisano za neciljanu proteomsku analizu uz nepromijenjene postavke LC metode, kolone i gradijenta otapala. U MS metodi promijenjeni su parametri prema sličnim metodama opisanim u literaturi (Shen i sur., 2021.). Ionska leća RF postavljena je na razinu od 40 % za lakšu transmisiju viših *m/z* glikopeptida u odnosu na peptide. Prekursorski ioni odabirani su za fragmentaciju u automatskom podatkovno ovisnom načinu rada instrumenta u rasponu *m/z* 375-2000, pri rezoluciji od 120 000, AGC 300 % (3×10^6 iona) i automatsko vrijeme injektiranja iona. Očekivana širina kromatografskog pika zadana je s 25 s, minimalni intenzitet prekursorskih iona 10^5 , a raspon naboja od +2 do +7. Ioni neodredivog naboja ili naboja +1 nisu odabirani za fragmentaciju. Po jednom MS događaju (skenu) zadano je 20 ovisnih uzastopnih MS/MS događaja koji su zajedno činili jedan ciklus. Za fragmentaciju svakog odabranog prekursorskog iona putem HCD ovdje su korištene dvije NCE; viša (33 %) za peptidni i niža (20 %) za glikanski dio iona glikopeptida kako bi se pokušalo dobiti što više informativnih iona-fragmenata unutar istog spektra. U oba MS/MS događaja *m/z* raspon postavljen je na *m/z* 100-3000, a izolacijski prozor na *m/z* 2 pri rezoluciji od 30 000. Takav prošireni *m/z* raspon omogućava opažanje N-glikanskih dijagnostičkih iona malih masa. Vrijeme injektiranja iona ograničeno je fiksno, na 100 ms uz AGC vrijednost od 200 % (2×10^5 iona). Nakon jednog MS/MS spektra na obje kolizijske energije po prekursorskom ionu, isti je isključen iz odabiranja tijekom narednih 25 s na koliko je procijenjena prosječna širina kromatografskih pikova.



Slika 3.5. Shematski prikaz protokola za ciljanu glikoproteomsku analizu sijaloglikopeptida. **1** – denaturacija proteina i redukcija S-S mostova; **2** – alkilacija slobodnih Cys i proteoliza tripsinom; **3** – afinitetno pročišćavanje sijaloglikopeptida na TiO_2 ; **4** – strukturna analiza pročišćenih sijaloglikopeptida pomoću nLC-MS/MS. Lijeva umetnuta slika prikazuje mehanizam vezanja Sia iz N-glikana na površinu TiO_2 stvaranjem multidentatnog kompleksa. Desna umetnuta slika naznačava da uzorak osim sijaloglikopeptida sadrži i fosfopeptide.

3.17 Analiza podataka

3.17.1 Interpretacija fragmentacijskih spektara masa oslobođenih derivatiziranih N-glikana

Spektralne datoteke dobivene LC-MS analizom ukupnog N-glikoma plazme sadrže kromatograme fluorescencije, ukupne ionske struje (engl. *total ion current*, TIC) kao i MS odnosno MS/MS (fragmentacijske) spektre N-glikana u pojedinim vremenskim točkama njihovog prikupljanja. Svaki je kromatografski pik bilo potrebno anotirati strukturom koju sadrži. Iz tih podataka interpretacija spektara N-glikana provedena je poznavajući njihov biosintetski put te mehanizam fragmentacije N-glikanskih iona prilikom CID. Time se interpretacija svodi na strukturno i kemijski smislene te biosintetski moguće N-glikanske strukture. U računalnom programu Compass DataAnalysis, v. 4.4 (Bruker Daltonik GmbH & Co.) za pojedini je pik pregledan MS/MS spektar te je m/z vrijednost prekursorskog iona pretražena pomoću računalnog programa GlycoMod (Cooper i sur., 2001.) na online portalu ExPASy Swiss Bioinformatics Resource Portal (URL1).

Pod parametre pretrage zadani su derivatizirani N-glikani u obliku jednostruko nabijenog protoniranog adukta, $[M+H]^+$ uz toleranciju monoizotopne mase ± 0.3 Da. Kao derivatizacijski reagens odabran je ProA s monoizotopnom masom 235.1685 Da. Program nakon pretrage baza podataka ponudi jednu ili više N-glikanskih struktura koje intaktnom molekulskom masom odgovaraju pretraživanju.

U sljedećem koraku od tih su struktura izabirane one biosintetski moguće i pristupljeno je poluautomatskoj interpretaciji MS/MS spektara u kojima su traženi dijagnostički oksonijevi ioni i karakteristični veći fragmentni ioni B- i Y-serije. Potencijalne N-glikanske strukture nacrtane su istodobno u računalnom programu GlycoWorkbench, v. 2.1, koji omogućava *in silico* fragmentaciju i olakšava pretraživanje m/z vrijednosti fragmentnih iona opaženih u realnim MS/MS spektrima (Ceroni i sur., 2008.). Svaki interpretirani MS/MS spektar je iz računalnog programa Compass DataAnalysis konvertiran u datoteku MGF formata (engl. *Mascot Generic Format file*) te je potom u programu GlycoWorkbench anotiran teoretskim fragmentima za izradu grafičkog prikaza. Svi interpretirani spektri iz pojedinih N-glikanskih frakcija pohranjivani su u datoteci GlycoWorkbench formata (.gwp).

Uz to su u računalnom programu Microsoft Office Excel 2016 izrađene i tablice s interpretiranim strukturama svakog N-glikanskog pika (GP) u koju su unošeni podaci o vremenima zadržavanja (t_R), glukoznim jedinicama, opaženim m/z vrijednostima te njihovom apsolutnom (Δm) i relativnom ($\delta m/m$) odstupanju od teoretskih, zatim tipu adukta i naboju, tipu N-glikana, antenarnosti, broju pojedinih monosaharida i njihovim modifikacijama (**Prilog 2.**). Te su tablice nadopunjene s površinama integriranih pikova i iz njih su filtriranjem podataka izračunavani relativni udjeli i izvedena N-glikanska svojstva.

3.17.2 Izračunavanje glukoznih jedinica N-glikana

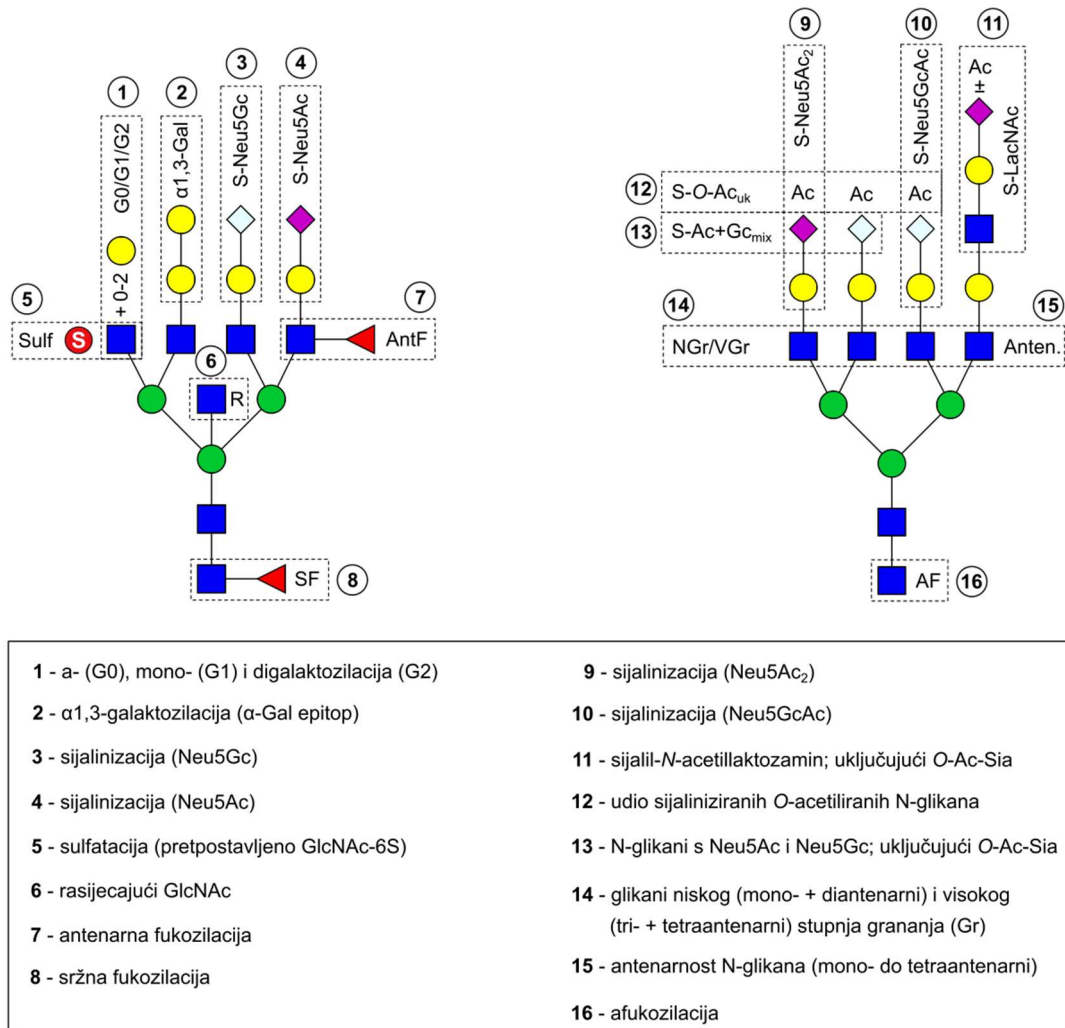
Stupanj polimerizacije Dex-ProA izomaltooligosaharida određen je iz m/z vrijednosti u fragmentacijskom spektru analita iz pojedinog kromatografskog pika. Ovisnost vremena zadržavanja Dex-ProA izomaltooligosaharida s DP2-15, tj. GU2-15 očitanih iz kromatograma prikazana je grafički i kroz točke je povučena krivulja opisana polinomom petog stupnja. Uvrštavanjem vremena zadržavanja pojedinog N-glikana u jednadžbu, izračunata je njegova GU vrijednost (**Prilog 1**).

3.17.3 Relativna kvantifikacija oslobođenih derivatiziranih N-glikana

Anotirani pikovi u kromatogramima fluorescencije ProA-derivatiziranih N-glikana ($\lambda_{em} = 370$ nm) integrirani su ručno u računalnom programu EmpowerTM, v. 3.6.1. Nepotpuno odijeljeni pikovi integrirani su tangencijalno između dolova dvaju pikova; iznad glavne bazne linije. Pikovi koji nisu anotirani izbačeni su iz integracije, a za svaki triplikat neutralne i anionskih frakcija broj integriranih pikova i način integracije (početak i kraj t_R) bio je jednak kako bi se dobili usporedivi rezultati. Nakon toga izračunat je relativni postotni udio (površina) pojedine N-glikanske strukture normalizirajući apsolutnu površinu svakog pika na ukupnu apsolutnu površinu svih pikova u kromatogramu jedne frakcije. Slijedeći pretpostavku da su sve frakcije kromatografski odjeljivane pri istim uvjetima, na jednak su način izračunati i relativni postotni udjeli pojedinih N-glikanskih struktura u ukupnom N-glikomu krvne plazme – uzimajući zbroj apsolutnih površina pikova iz svih frakcija. Za izračunavanje je korišten računalni program Microsoft Office Excel 2016. Rezultati u postotcima prikazani su grafički putem stupčastih dijagrama.

3.17.4 Izračunavanje izvedenih N-glikanskih svojstava

Za lakše uspoređivanje kvantitativnih podataka o N-glikozilaciji izračunavaju se tzv. izvedena N-glikanska svojstva (engl. *derived N-glycan traits*) zbrajanjem relativnih udjela N-glikanskih struktura sa zajedničkim strukturnim osobinama (npr. sržnom fukozilacijom, monogalaktozilacijom ili grananjem u dvije antene). Izračunato je 16 izvedenih N-glikanskih svojstava za ukupan N-glikom krvne plazme GŠ, a za pojedine frakcije (F1-F5) samo određena; već prema prisutnim strukturnim osobinama N-glikana u njima (**Slika 3.6**). Rezultati u postotcima prikazani su grafički putem kutijastih dijagrama.



Slika 3.6. Tumač 16 izvedenih N-glikanskih svojstava izračunatih kao zbroj relativnih udjela (%) N-glikanskih struktura sa zajedničkim strukturnim osobinama označenima iscrtkanim kućicama. Prikazane hipotetske strukture ne postoje u N-glikomu krvne plazme već služe samo za ilustraciju.

3.17.5 Interpretacija fragmentacijskih spektara masa derivatiziranih sijalinskih kiselina

Fragmentacijski spektri oslobođenih Sia derivatiziranih s DMBA interpretirani su ručno u računalnom programu Compass DataAnalysis slijedeći dostupne literaturne podatke (Kamerling i Gerwig, 2006.). Pozicija *O*-acetilne skupine u molekuli pojedinih *O*-Ac-Sia određena je prema prisutnosti dijagnostičkih fragmentnih iona nastalih neutralnim gubitkom molekule H₂O ili CH₃COOH prilikom fragmentacije.

3.17.6 Analiza podataka neciljane glikoproteomske analize

Dobiveni proteomski podaci u obliku spektralnih datoteka analizirani su u računalnom programu Proteome Discoverer v. 2.5 (Thermo Fisher Scientific). FASTA datoteka sa sekvencama proteina iz proteoma GŠ preuzeta je iz online baze podataka GenBank® (taksonomski identifikator ID: 10181). Kao algoritam za pretraživanje korišten je Sequest HT koji iz zadanih aminokiselinskih sekvenci i korištenog enzima za proteolizu generira teoretske MS/MS spektre i uspoređuje ih s onim realnima, prikupljenima LC-MS proteomskom analizom, koristeći metodu unakrsne korelacije kao mjeru sličnosti. U postavkama pretraživanja kao korišteni enzim za proteolizu zadan je tripsin s najviše dva pogrešna cijepanja (engl. *missed cleavage*), tolerancija mase prekursorskih iona naboja +2 do +6 od 20 ppm u rasponu m/z 350-5000 i očekivanu veličinu triptičkih peptida 7-30 aminokiselina. Tolerancija mase fragmentnih iona iz y- i b-serije postavljena je na 0.02 Da uz dozvoljenu mogućnost neutralnih gubitaka H₂O i NH₃. Kao statičke – namjerno uvedene – modifikacije peptida zadane su ugradnja ¹⁸O na Asn (+2.988 Da) i karbamidometilacija Cys (+57.021 Da). Za dinamičke modifikacije zadane su one najučestalije za većinu proteina: oksidacija Met (+15.995 Da), deamidacija Asn (+0.984 Da), acetilacija N-kraja proteina (+42.011 Da) i konverzija Gln→piroGlu (-17.027 Da). Za oba tipa broj potencijalnih modifikacija ograničen je na ukupno tri po peptidu. Nakon pretrage, proteini s dobivenog popisa filtrirani su tako da se izdvoje samo oni za koje su identificirani pripadajući peptidi s jednom ili više ¹⁸O₁-Asp modifikacija uz graničnu vrijednost PEP (engl. *posterior error probability*) ≤ 0.01 za dano peptid-spektar podudaranje (engl. *peptide-spectrum match*, PSM).

Iz toga su popisa najzad identificirani proteini iz krvne plazme GŠ modificirani sijaloglikanima te broj N-glikozilacijskih mjesta s kojih oni potječu, a prilikom deglikozilacije su bila obilježena enzimskom ugradnjom izotopa ¹⁸O. Za svaki protein automatski je izračunata i postotna pokrivenost aminokiselinske sekvence (engl. *sequence coverage*) MS/MS spektrima, molekulska masa, ukupan broj aminokiselina u proteinu, izoelektrična točka i GRAVY vrijednost (engl. *grand average of hydropathy*) koja pokazuje hidrofobnost proteina.

3.17.6.1 Analiza obogaćivanja genske ontologije

Analiza obogaćivanja genske ontologije (GO) identificiranih proteina provedena je pomoću online alata g:Profiler Web Server (URL2) (Kolberg i sur., 2023.) pretražujući pojmove GO vezane uz pripadnost genskog produkta iz upita staničnoj komponenti, molekulskoj funkciji i biološkom procesu (engl. *cellular component*, *molecular function*, *biological process*). Alat automatski pretražuje i zbirku baza podataka o biokemijskim putovima KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) kako bi s njima povezao genske produkte iz upita. Kao statistički značajni, uzeti su obogaćeni termini GO s $p \leq 0.01$.

3.17.7 Analiza podataka ciljane (strukturne) glikoproteomske analize

Za strukturnu analizu *O*-acetiliranih sijaloglikopeptida korišten je računalni program otvorenog koda Glyco-Decipher, v. 1.0.3 koji omogućuje istovremeno pretraživanje teoretskih peptidnih i N-glikanskih fragmentnih iona u spektrima masa i njihovu interpretaciju (Fang i sur., 2022.). Uz FASTA datoteku s proteinskim sekvencama, za pretragu je zadana i datoteka s 25 najzastupljenijih *O*-acetiliranih sijaloglikana anotiranih u N-glikomu krvne plazme GŠ. Za izradu datoteke, N-glikanske strukture nacrtane u SNFG formatu prevedene su najprije u linearni tekstualni zapis WURCS formata (engl. *Web3 Unique Representation of Carbohydrate Structures*) (Tanaka i sur., 2014.) putem alata GlycanBuilder (Ceroni i sur., 2007.) na online portalu GlyCosmos (URL3). Za proteolitički enzim odabran je tripsin s najviše tri moguća pogrešna cijepanja.

Za fiksnu modifikaciju zadana je samo karbamidometilacija Cys, a za varijabilnu oksidacija Met, uz očekivani naboj protoniranih glikopeptidnih iona +2 do +6 i duljinu peptida 6-40 aminokiselina. Tolerancija mase prekursorskih iona postavljena je na 20 ppm, a fragmentnih iona na 0.1 Da. Nakon pretrage spektralne datoteke, program rezultate ispisuje u obliku tablice s nađenim proteinima i očekivanim *O*-acetiliranim sijaloglikanima na N-glikozilacijskim mjestima. Ti su kvalitativni rezultati prikazani grafički.

3.17.8 Parametri N-glikanskog kemijskog prostora proteina krvne plazme GŠ

Molekulska masa (m) pojedinih N-glikana preračunata je iz m/z vrijednosti opaženih u MS/MS spektrima i naboja prekursorskog iona oduzimajući monoizotopnu masu derivatizacijskog reagensa (ProA). Vrijednosti su izražene u kDa. Ukupan broj monosaharida po N-glikanu (N_{mono}) dobiven je zbrajanjem broja pojedinih monosaharida prema strukturi identificiranoj u fragmentacijskom spektru.

Kao novi parametar N-glikanskog kemijskog prostora u ovom radu predložen je **indeks hidrofobnosti N-glikana** (IH_G). Pojednostavljeno izračunavanje ovog parametra umjesto računalnih modela, pretežno utemeljenih na strojnom učenju, koristi koeficijente raspodjele oktanol-voda ($\log P$) monosaharidâ u sastavu N-glikana. Za izračun IH_G preuzeti su literaturni podaci o predviđenim $\log P$ monosaharidâ iz online kemoinformatičke baze podataka ChemSpider (URL4) (**Tablica 3.5**). Kako za sulfatirane N-glikane nije bilo moguće utvrditi poziciju sulfatne skupine u strukturi, vrijednost je aproksimirana uzevši da se radi o *N*-acetilglukozamin-6-sulfatu (GlcNAc-6S) kao najčešće sulfatiranom monosaharidu u N-glikanima.

Tablica 3.5. Teoretske vrijednosti $\log P$ monosaharidâ uzete za izračunavanje IH_G i međusobni odnosi njihovih hidrofilitnosti i hidrofobnosti.

Monosaharid	Neu5Gc	GlcNAc-6S	Neu4Ac5Gc	Neu5Ac	Neu4,5Ac ₂	GalNAc	GlcNAc	Fuc	Gal	Man
logP	-4.31	-3.60	-3.50	-3.13	-2.90	-2.68	-2.48	-2.04	-1.88	-1.88
Svojtvo	Hidrofilno → Hidrofobno									

Indeks hidrofobnosti izračunavan je kao zbroj umnožaka $\log P$ pojedinih monosaharida s brojem njihovih jedinica u molekuli N-glikana i utežnjen na ukupan broj monosaharida prema sljedećoj formuli:

$$IH_G = \left(10^{\frac{(\log P_{M_1} \times N_{M_1}) + (\log P_{M_2} \times N_{M_2}) + \dots + (\log P_{M_n} \times N_{M_n})}{N_{M_1} + N_{M_2} + \dots + N_{M_n}}} \right) \times 10^3$$

Gdje je:

IH_G – indeks hidrofobnosti N-glikana

$\log P_{M_1-M_n}$ – koeficijenti raspodjele oktanol-voda pojedinih monosaharida M_1-M_n

$N_{M_1-M_n}$ – broj pojedinih monosaharida M_1-M_n u N-glikanu

Vrijednosti su zbog lakšeg prikazivanja i razumijevanja antilogaritmirane da ne budu negativne te pomnožene s 10^3 kako bi skala IH_G bila približno u rasponu 0-100. Pritom niža vrijednost IH_G predstavlja hidrofilniju N-glikansku strukturu, a viša hidrofobniju. Rezultati su za pojedine frakcije prikazani grafički u obliku kutijastih dijagrama, a za sve frakcije zajedno (ukupan N-glikom) u obliku histograma. Također je prikazana i ovisnost svakog parametra o vremenu zadržavanja pojedine N-glikanske strukture u kromatogramu.

3.17.9 Vizualizacija i dostupnost podataka

Za izradu slika i tablica korišteni su računalni programi Microsoft Office Excel 2016, GraphPad Prism, v. 9.0.0., Inkscape, v. 0.92.4, Adobe Illustrator 2019 i BioRender (URL5). Glikanske strukture prikazane su simboličkom nomenklaturom (engl. *Symbolic Nomenclature For Glycans*, SNFG) koju propisuje Konzorcij za funkcionalnu glikomiku (Varki i sur., 2015.). Podaci o N-glikomu krvne plazme GŠ bit će prilikom publiciranja pohranjeni u online repozitorij GlycoPOST (Watanabe i sur., 2021.) (URL6). Time će postati dostupni drugim istraživačima u skladu s FAIR načelima (engl. *Findable, Accessible, Interoperable and Reusable*) reproducibilnosti i održivosti znanstvenih istraživanja.

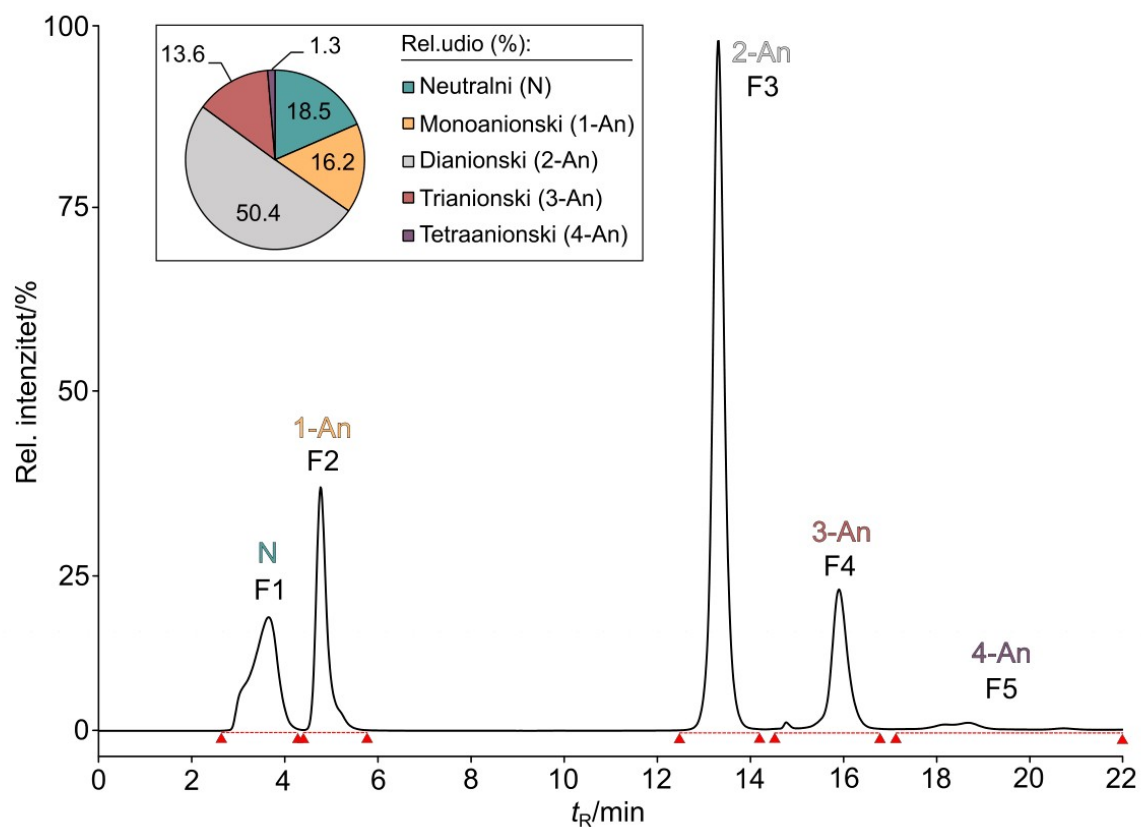
4. REZULTATI

4.1 Strukturna analiza N-glikoma krvne plazme

Strukturna analiza N-glikoma krvne plazme GŠ provedena je enzimskom deglikozilacijom deterdžentom denaturiranih proteina pomoću PNGaze F i derivatizacijom oslobođenih N-glikana prokainamidom kao fluoroforom. Zbog velike strukturne složenosti i brojnosti N-glikana, analizi je pristupljeno tehnikom offline 2D-LC u kojoj su najprije u prvoj kromatografskoj dimenziji N-glikani frakcionirani prema naboju, a zatim su dobivene neutralna i anionske frakcije kromatografski odjeljivane na HILIC koloni. Druga kromatografska dimenzija bila je spregnuta sa detektorom fluorescencije i hibridnom tandemnom spektrometrijom masa. To je omogućilo izračunavanje relativnih udjela pojedinih struktura integracijom kromatografskih pikova u kromatogramu fluorescencije, kao i fragmentaciju ioniziranih N-glikana u plinskoj fazi i određivanje njihove strukture interpretacijom dobivenih spektara masa.

4.1.1 Frakcionacija N-glikana prema naboju

Osim što je kromatografsko odjeljivanje derivatiziranih N-glikana na WAX koloni iskorišteno za frakcionaciju prema naboju kako bi se olakšala strukturna analiza (**Slika 3.2**), iz površina kromatografskih pikova pojedinih frakcija izračunat je relativni udio neutralnih i anionskih N-glikana. Ovisno o broju negativno nabijenih funkcionalnih skupina, s porastom ionske jakosti pokretne faze N-glikani eluiraju u rasponu t_R 2.5-22.0 min grupirani u pet kromatografskih pikova koji sadrže neutralne, monoanionske, dianionske, trianionske i tetraanionske strukture. Ti su pikovi sakupljeni kao frakcije F1-F5. U N-glikomu krvne plazme GŠ najzastupljeniji su dianionski N-glikani (frakcija F3) s relativnim udjelom od 50.4 %, dok su najmanje zastupljeni tetraanionski N-glikani (frakcija F5). Relativni udjeli neutralnih, monoanionskih i trianionskih N-glikana (frakcije F1, F2 i F4) su gotovo podjednaki (**Slika 4.1**).



Slika 4.1. Kromatogram oslobođenih N-glikana derivatiziranih s ProA nakon odjeljivanja na koloni sa slabim anionskim izmjenjivačem (WAX) uz detekciju fluorescencije ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370$ nm). Crvenim strelicama i iscrtkanim linijama ispod pikova označeni su vremenski intervali sakupljanja pojedine frakcije. Umetnuti tortni grafikon prikazuje srednju vrijednost ($n = 4$) relativnih udjela pojedinih nabojem određenih tipova N-glikana. **N** – neutralni N-glikani; **1-An** – monoanionski N-glikani; **2-An** – dianionski N-glikani; **3-An** – trianionski N-glikani; **4-An** – tetraanionski N-glikani; **F** – frakcija.

4.1.2 Neutralni N-glikani

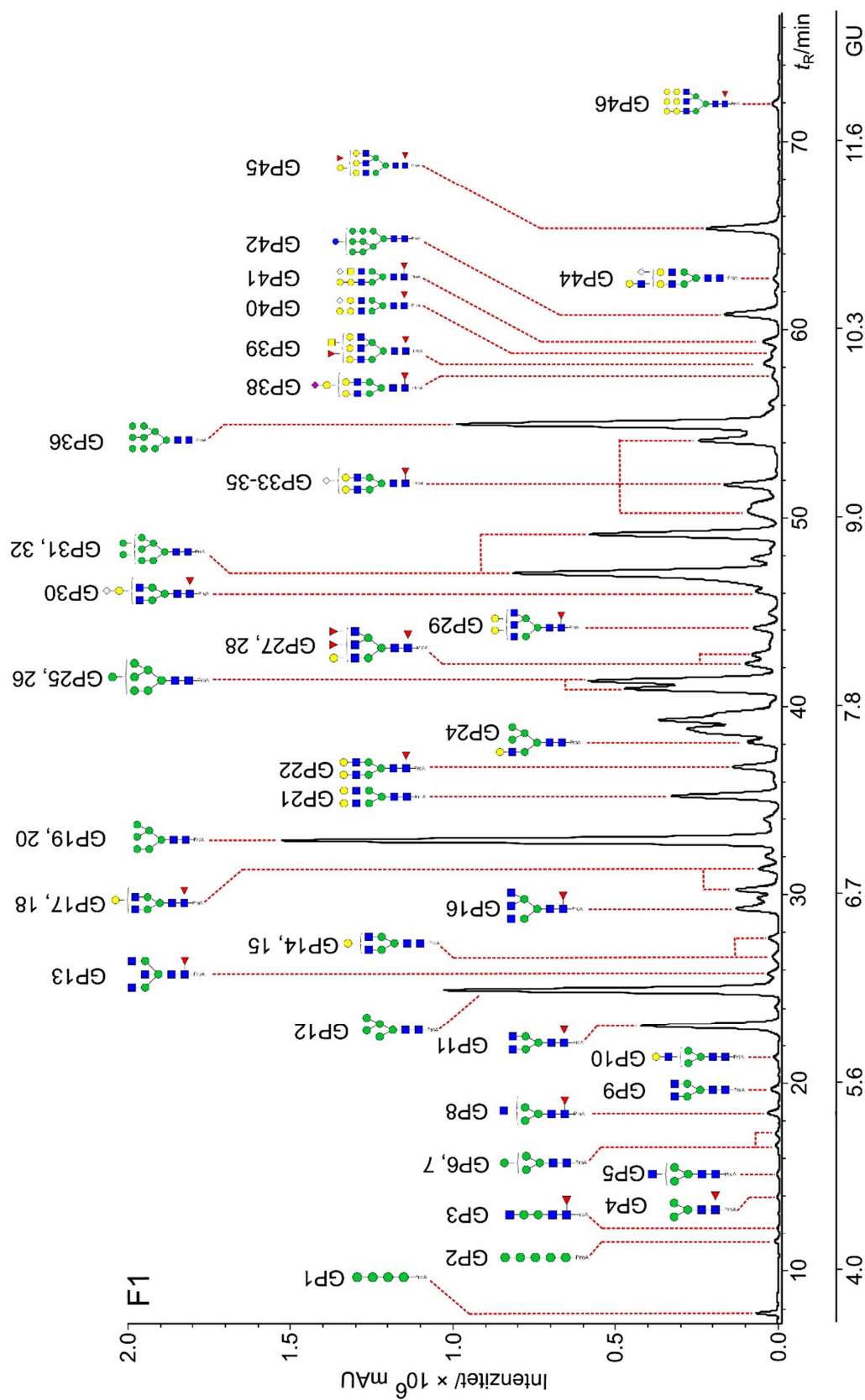
N-glikani iz svake od pet frakcija razdvajani su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti na HILIC koloni, istom metodom s gradijentnim eluiranjem u trajanju od 90 min. U neutralnoj frakciji interpretacijom fragmentacijskih spektara masa ukupno je anotirano 46 N-glikana (F1-GP1-46) koji eluiraju u rasponu t_R 7.8-72.0 min, s vrijednostima GU 3.51-11.89. Među neutralnim N-glikanima prisutna su sva tri tipa – visokomanozni (5), hibridni (1) i kompleksni (40). Identificirane najmanje strukture uključuju mano-oligosaharide (F1-GP1, 2) – koji zapravo ne spadaju u N-glikane – te paucimanozne i kompleksne monoantelarne N-glikane (F1-GP3-10). Najveće strukture predstavljene su visokomanoznim N-glikanima sastava H5-9N2 (Man₅₋₉GlcNAc₂) (npr. F1-GP12, 19, 26, 31 i 36) i nepotpuno obrađenim H10N2 (Glc₁Man₉GlcNAc₂) (F1-GP42), kao i kompleksnim sržno fukoziliranim triantenarima među kojima se izdvajaju strukture s α -Gal epitopom (F1-GP46) (**Slika 4.2, Prilog 2A**).

Ovisno o tipu i sastavu neutralnih N-glikana, razlikuju se i njihovi fragmentacijski spektri masa prema kojima su određene konačne strukture. U svim interpretiranim spektrima masa uglavnom su dominantni fragmentni ioni Y-serije jer na sebi nose ProA kao aglikon koji zadržava pozitivan naboj u formi protoniranog, natrijevog ili kombiniranog adukta: $[M+nH]^{n+}$, $[M+nNa]^{n+}$, $[M+nNa+mH]^{(n+m)+}$. Za fragmentaciju iona visokomanoznih N-glikana karakterističan je serijski gubitak ostataka manoze (-162 Da) iz prekursorskoga iona. Fragmentacijom glikozidne veze između ostataka GlcNAc-a iz pentasaharidne srži N-glikana nastaje intenzivan Y₁-ion GlcNAc-ProA, m/z 441.2, $[M+H]^+$. Njega slijedi i Y₂-ion GlcNAc₂-ProA m/z 644.3, $[M+H]^+$, što je oboje karakteristično za N-glikane bez sržne fukoze. Dodatnim gubitkom manoznih ostataka preostaje fragmentni Y₄-ion Man₃GlcNAc₂-ProA, m/z 1130.4, $[M+H]^+$. U spektrima masa visokomanoznih N-glikana relativno je malo dijagnostičkih oksonijevih iona koji olakšavaju interpretaciju i dominantni su pretežno $[HexHexNAc]^+$, m/z 366.1, i $[Hex_2HexNAc]^+$, m/z 528.1 (**Slika 4.3**). Oksonijevi ioni su mali jednostruko nabijeni ioni s intrinzičnim pozitivnim nabojem. Nastaju fragmentacijom glikozidne veze mehanizmom A-tipa pri kojem se naboj zadržava na nereducirajućem kraju fragmentnog iona. Najčešće nastaju iz terminalnih antenarnih monosaharida GlcNAc, Gal, Fuc i Sia, a formiranje može biti praćeno neutralnim gubitkom molekule vode (dehidracijom) (Harding i Crabbe, 1992.). Redovito su prisutni u CID i HCD fragmentacijskim spektrima glikana i vrlo su informativni za strukturnu analizu.

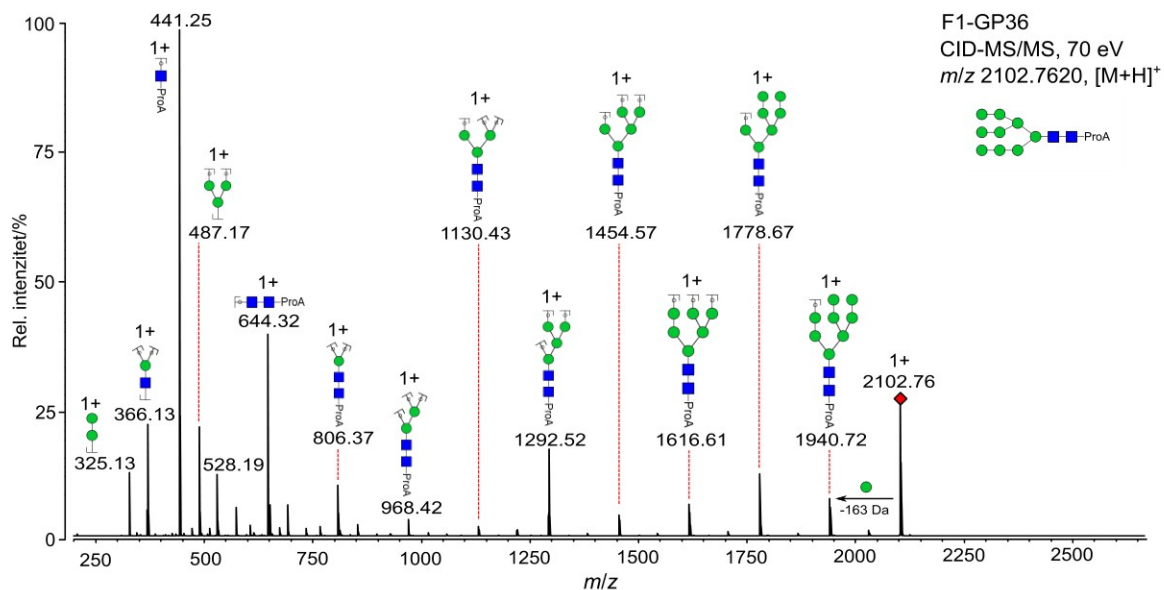
Sličan obrazac imaju i fragmentacijski spektri hibridnih N-glikana kod kojih je α 1,6-vezana Man pentasaharidne srži supstituirana s *N*-acetillaktozaminom (Gal- β 1,4-GlcNAc, LacNAc), a α 1,3-vezana Man s još dva ostataka Man, pa ove strukture dijele osobine visokomanoznih i kompleksnih N-glikana. Za gubitak sva tri heksozna ostataka svojstven je Y-ion $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3\text{-ProA}$, m/z 1333.5, $[\text{M}+\text{H}]^+$, a za gubitak LacNAc Y-ion $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, m/z 1454.5, $[\text{M}+\text{H}]^+$. U frakciji F1 određen je samo jedan hibridni afukozilirani N-glikan (F1-GP24) (**Slika 4.4**).

Kompleksni mono-, di- i triantenarni N-glikani brojnošću dominiraju neutralnom frakcijom. U njihovim fragmentacijskim spektrima masa dijagnostički su važni oksonijevi i Y-ioni koji ukazuju na tip fukozilacije gdje se izdvajaju Fuc-GlcNAc-ProA, m/z 587.3 i Fuc-GlcNAc-ProA, m/z 790.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ tipični za sržnu fukozilaciju. Y₁-ion GlcNAc-ProA, m/z 441.2, $[\text{M}+\text{H}]^+$ u fragmentacijskim spektrima sržno fukoziliranih N-glikana nastaje gubitkom fukoze iz svojeg fukoziliranog analoga i znatno je nižeg relativnog intenziteta (**Slika 4.5**). Antenarno fukozilirani N-glikani u neutralnoj su frakciji bili zastupljeni samo s tri strukture (F1-GP27, 39 i 45) a identificirani su prema oksonijevu ionu $[\text{Gal-GlcNAc-Fuc}]^+$, m/z 512.2. Ostatak strukture N-glikana u ovoj i anionskim frakcijama rješavana je uz pomoć *in silico* fragmentacije strukture pretpostavljene iz intaktne mase i traženja podudarajućih većih fragmentnih iona Y- i ponekad B-serije u spektrima masa.

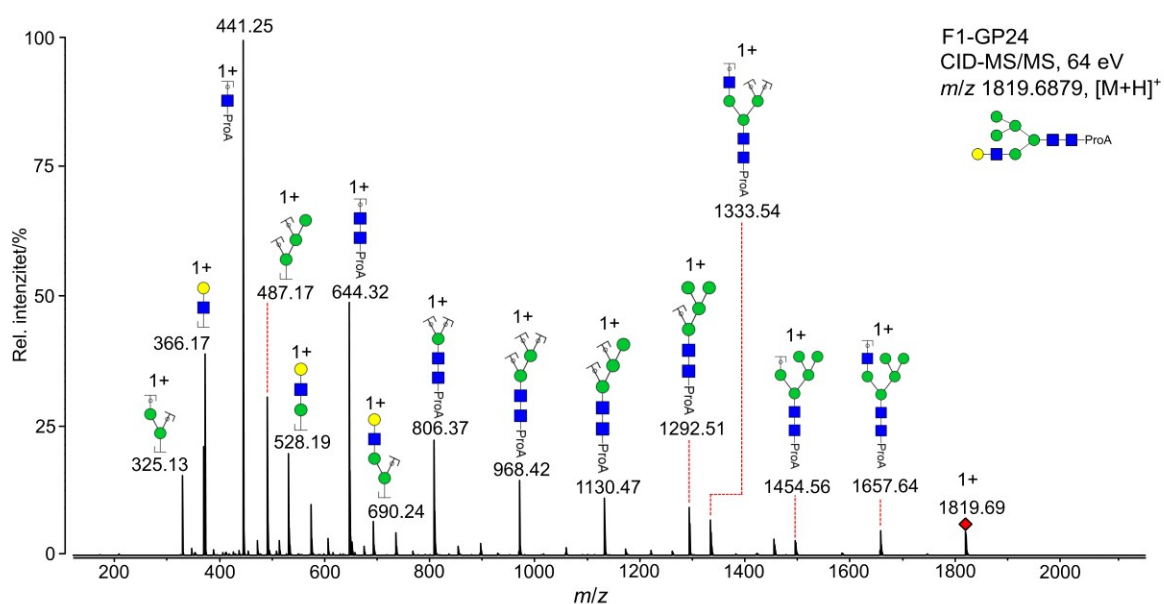
U neutralnoj N-glikanskoj frakciji relativnim udjelom najzastupljeniji su visokomanozni (60.5 %) i kompleksni (37.0 %) N-glikani, dok hibridni i paucimanozni zajedno čine tek 2.4 % (**Slika 4.7A**). Izuzmu li se visokomanozni N-glikani, prema antenarnosti su najzastupljeniji diantenari (30.6 %) (**Slika 4.7B**). Promatrano po pojedinačnim strukturama, s više od 10 % zastupljeni su jedino H5/6/9N2 (F1-GP12, 20, 36). Slijede ih H8N2 (F1-GP31, 32) i diantenari – sržno fukozilirani agalaktozilirani H3N4F1 (F1-GP11), afukozilirani digalaktozilirani H5N4 (F1-GP21) i sržno fukozilirani monogalaktozilirani H4N5F1 sa rasijecajućim GlcNAc (F1-GP23) – svi s udjelima 5-10 %. U neutralnoj frakciji F1 također je utvrđena i prisutnost anionskih, monosijaliniziranih N-glikana (npr. F1-GP28, 30, 33-35); vjerojatno zbog miješanja prilikom ručnog sakupljanja frakcija F1 i F2 iz bliskih kromatografskih pikova (**Slika 4.1**).



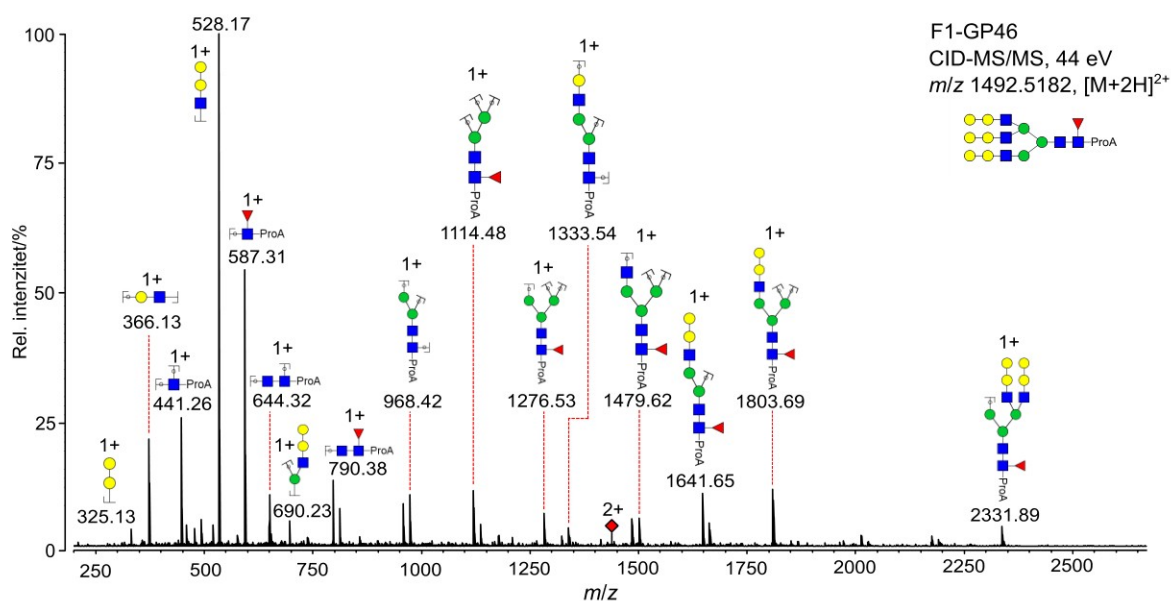
Slika 4.2. Anotirani kromatogram ProA-derivatiziranih neutralnih N-glikana iz frakcije F1 nakon odjeljivanja na HILIC koloni uz detekciju fluorescencije ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370$ nm). Popis svih anotiranih N-glikana naveden je i u **Prilogu 2A**. Simbolička nomenklatura N-glikana (SNFG) prikazana je na **Slici 2.1**. GU – glukozne jedinice, GP – N-glikanski pik.



Slika 4.3. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa visokomanoznog N-glikana sastava H9N2 (Man₉). Prekursori ion u spektru označen je crvenim kvadratićem. Uz predloženu interpretiranu strukturu navedena je m/z vrijednost prekursora, tip adukta i primijenjena kolizijska energija.

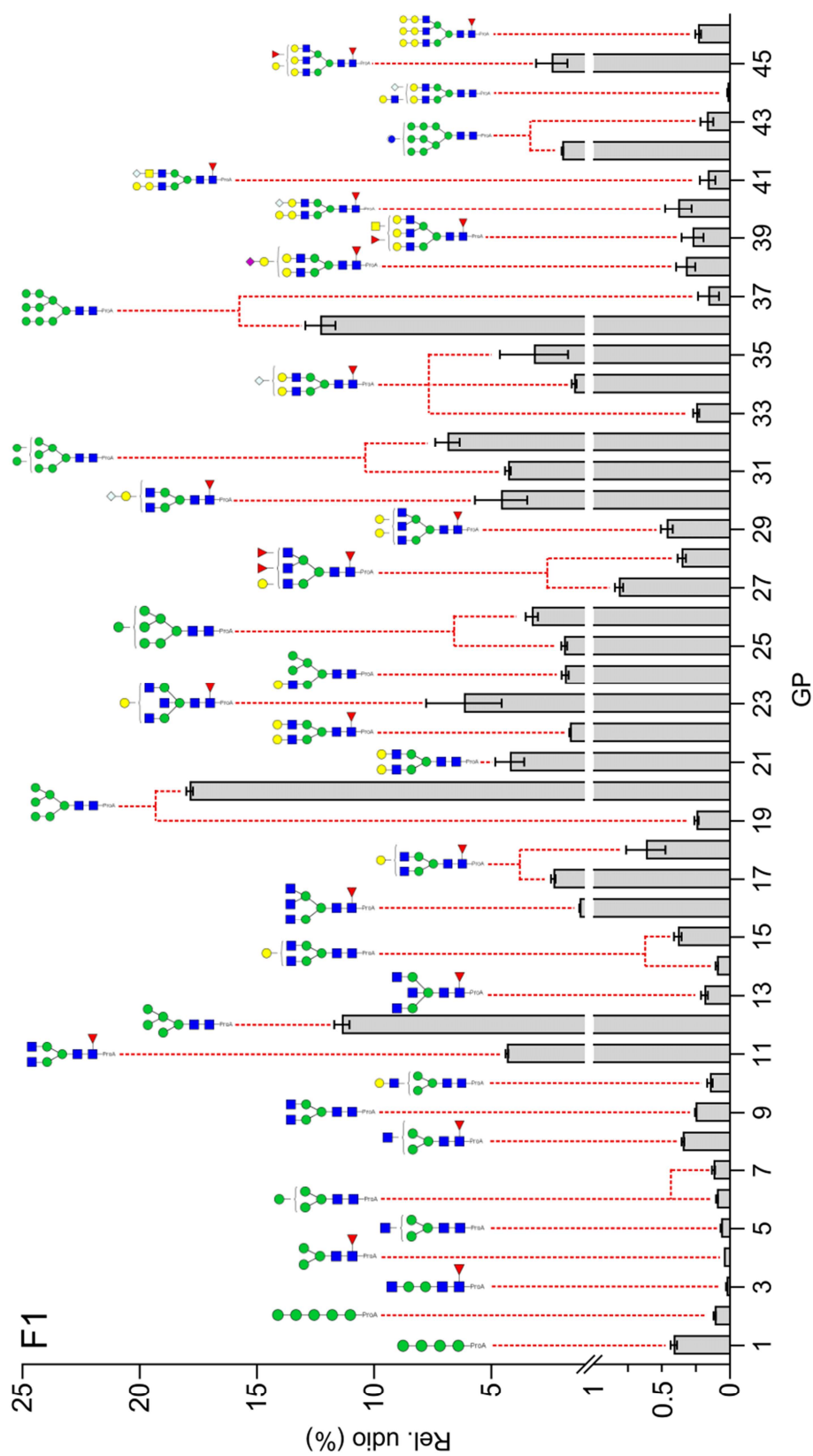


Slika 4.4. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa hibridnog afukoziliranog N-glikana sastava H6N3. Prekursori ion u spektru označen je crvenim kvadratićem.

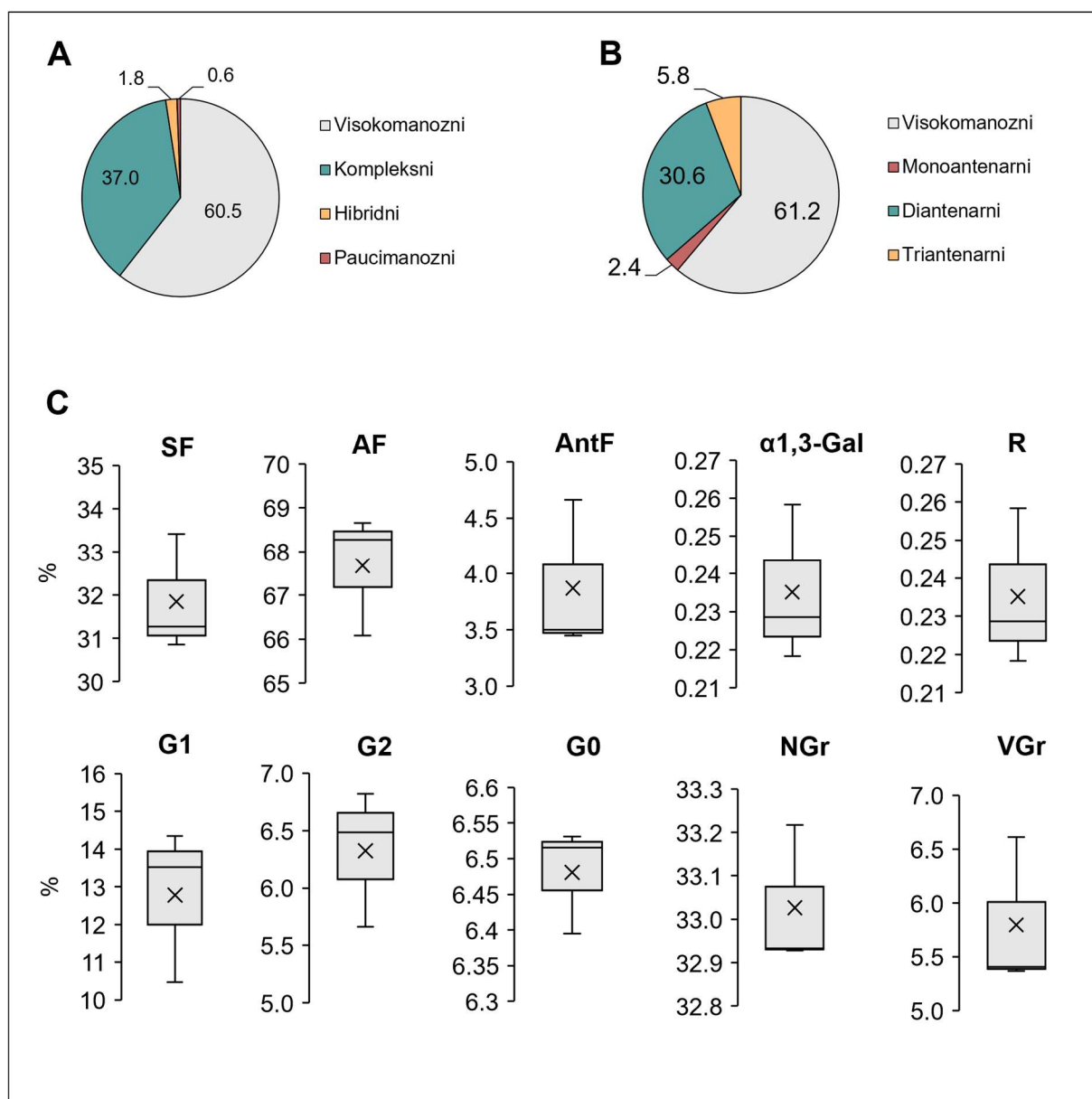


Slika 4.5. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa kompleksnog sržno fukoziliranog triantennarnog N-glikana s tri α -Gal epitopa sastava H9N2F1. Prekursorski ion u spektru označen je crvenim kvadratićem.

Izračunata izvedena N-glikanska svojstva slijede obrasce uočene u relativnim udjelima pojedinačnih struktura, ali omogućuju lakšu usporedbu strukturnih motiva u N-glikomu. Afukozilirani N-glikani, u koje spadaju i visokomanozni, imaju udio od gotovo 70 %, a sržno i antenarno fukozilirani čine preostali udio u kompleksnim N-glikanima. U galaktozilaciji prevladavaju monogalaktozilirani kompleksni N-glikani (13 %), a di- i agalaktozilirani su podjednako zastupljeni s oko 6.5 %. Prevladavajući su N-glikani niskog stupnja grananja, a oni visokog su samo triantennari. Udio struktura s rasijecajućim GlcNAc i α -1,3 galaktozilacijom je u F1 ispod 1 % (Slika 4.7C).



Slika 4.6. Relativni udjeli (%) pojedinih neutralnih N-glikana u frakciji F1. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$). U slučaju izomernih N-glikana, jedna struktura je prikazana za dva ili više N-glikanska pika. Prikaz slijedi kromatogram na **Slici 4.2** i **Prilog 2A**. GP – N-glikanski pik.



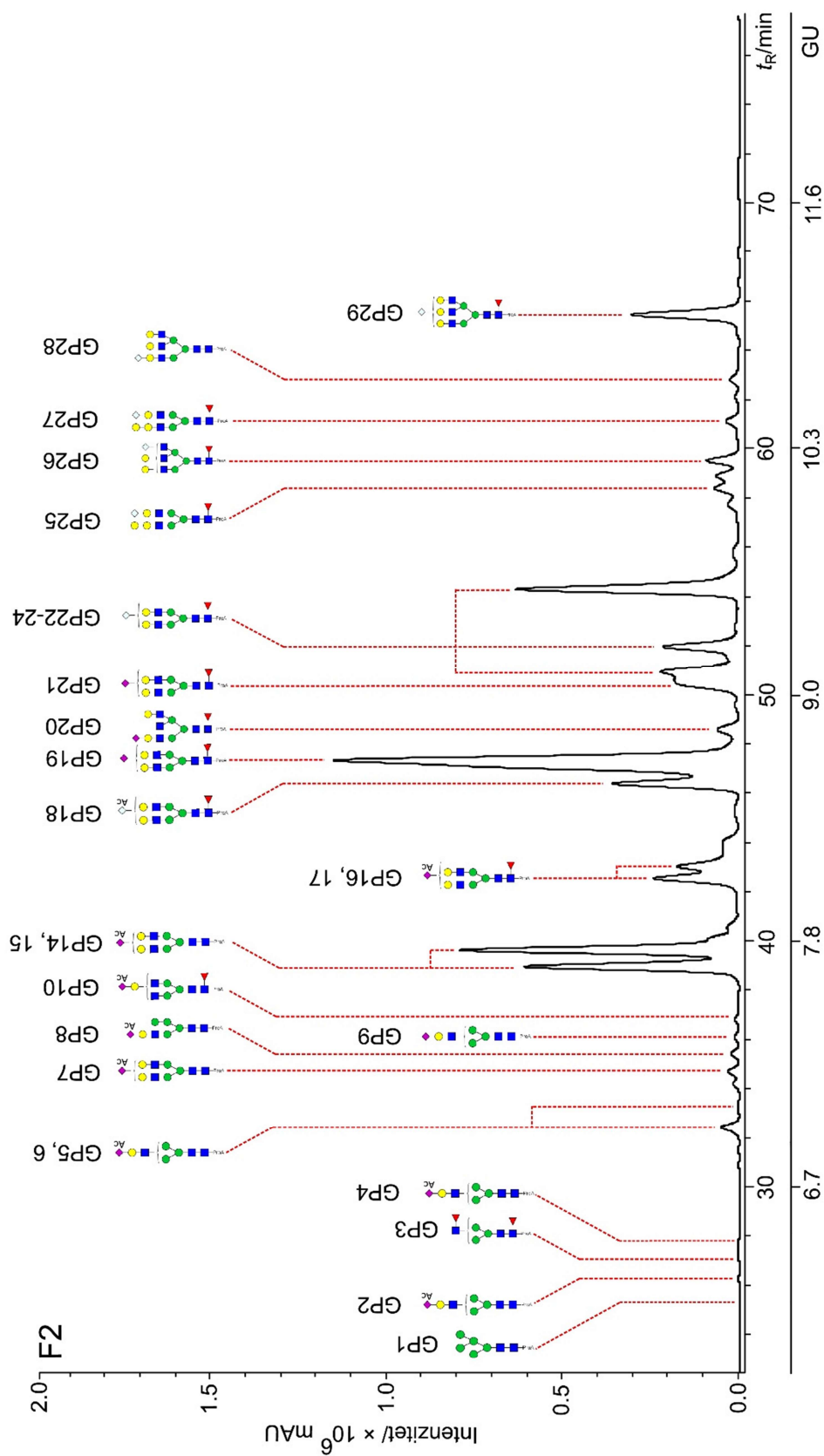
Slika 4.7. Relativni udjeli (%) neutralnih N-glikana u frakciji F1 prema tipu (A) i antenarnosti (B). Visokomanozni N-glikani nemaju antene pa su izdvojeni kao zasebna kategorija. Izvedena N-glikanska svojstva prikazana su kao zbrojeni relativni udjeli N-glikana sa zajedničkim strukturnim karakteristikama (C). Podaci u tortnim dijagramima predstavljeni su kao srednja vrijednost ($n = 3$). U kutijastim dijagramima križić predstavlja srednju vrijednost, crta unutar kutije medijan, donji i gornji rub kutije 1. i 3. kvartil, a brkovi minimum i maksimum ($n = 3$). **SF** – sržna fukozilacija; **AF** – afukozilacija; **AntF** – antenarna fukozilacija; **α -Gal** – α 1,3-galaktozilacija (α -Gal epitop); **R** – rasijecajući GlcNAc; **G1** – monogalaktozilacija; **G2** – digalaktozilacija; **G0** – agalaktozilacija; **NGr** – N-glikani niskog stupnja grananja (mono- i diantenarni); **VGr** – N-glikani visokog stupnja grananja (tri- i tetraantenarni).

4.1.3 Monoanionski N-glikani

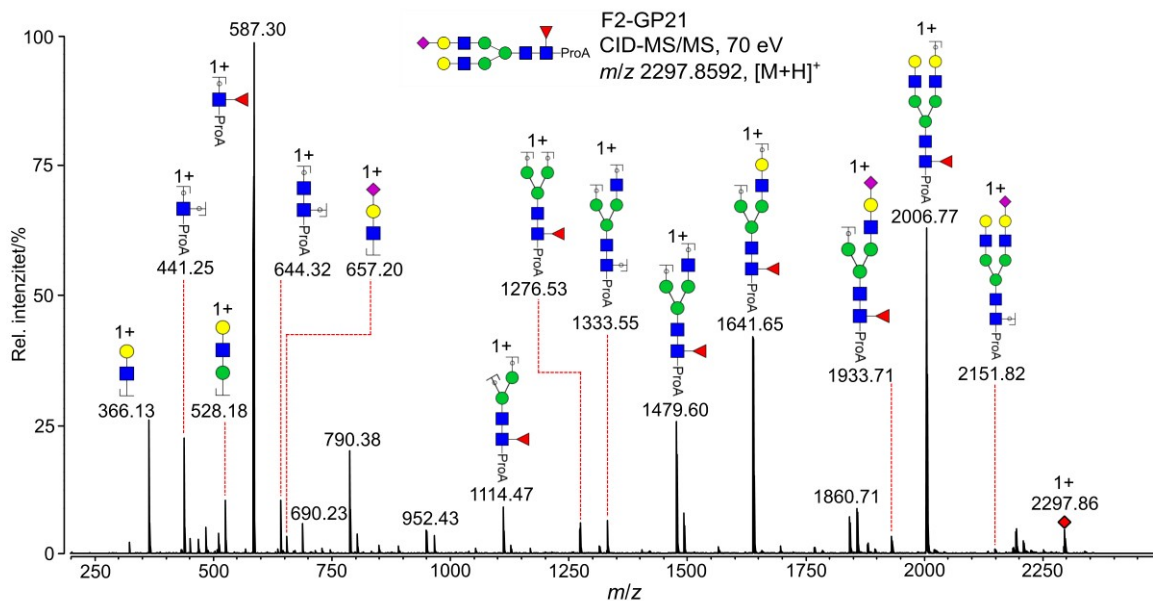
U monoanionskoj frakciji anotirano je ukupno 29 N-glikana (F2-GP1-29) koji eluiraju u rasponu t_R 25.3-65.5 min, s vrijednostima GU 6.25-11.00. Među monoanionskim N-glikanima prisutni su kompleksni (28) i hibridni (1). N-glikani u ovoj frakciji su monosijalinizirani s Neu5Ac ili Neu5Gc, a to su ujedno i jedine prisutne anionske modifikacije. Najmanje strukture predstavljene su monoantenarnim Neu5Ac-sijaliniziranim N-glikanima (F1-GP9) i njihovim analogima s *O*-Ac-Sia (F2-GP2, 4-6), a najveći N-glikani su triantenari s Neu5Gc (F2-GP29) (**Slika 4.8, Prilog 2B**).

U spektrima masa uz fragmentne ione svojstvene neutralnim N-glikanima, pojavljuju se i dijagnostički ioni koji ukazuju na sijalinizaciju. Tako se, na primjeru fragmentacije N-glikana sastava H5N4F1S1, m/z 2297.8, $[M+H]^+$, najprije uočava gubitak Sia iz prekursorskog iona uz promjenu mase od -291 Da u slučaju Neu5Ac (m/z 2006.7), ili -307 Da za Neu5Gc. Dominantan oksonijev ion koji ukazuje na sijalinizaciju je $[Sia-Gal-GlcNAc]^+$ s m/z 657.2 za Neu5Ac, odnosno m/z 673.2 za Neu5Gc) (**Slika 4.9**). U fragmentacijskim spektrima gotovo svih sijaliniziranih struktura koje eluiraju u prvoj polovici kromatograma, do $t_R \sim 47$ min, uočeno je da isti ti ioni imaju porast mase za +42.01 Da, što je pripisano *O*-acetilaciji Sia i slaže se s literaturnim podacima (Gao i sur., 2015.). U skladu s tim, u spektrima masa je opažen gubitak same *O*-acetilne skupine iz Sia (-42.01 Da) ili cijele *O*-Ac-Sia iz N-glikana; -333.1 Da za Neu5Ac₂ i -349.1 Da za Neu5GcAc. Oksonijev ion $[O-Ac-Sia-Gal-GlcNAc]^+$ s m/z 699.2 za Neu5Ac₂, odnosno m/z 715.2 za Neu5GcAc, najzastupljeniji je u slučaju *O*-acetiliranih monosijaliniziranih N-glikana.

U monoanionskoj N-glikanskoj frakciji relativnim udjelom najzastupljeniji su kompleksni N-glikani (99.3 %) uz samo jednu strukturu hibridnog tipa (F2-GP8) (**Slika 4.11A**), a prema antenarnosti, diantenarni N-glikani (90.1 %). Udio triantenara veći je nego u neutralnoj frakciji (**Slika 4.11B**). Kao pojedinačne strukture s Neu5Ac najzastupljeniji su H5N4S-Ac1 koji se javlja kao više izomera (F2-GP14-17) i sržno fukozilirani H5N4F1S1 (F2-GP19) s udjelom od preko 20 %. Kod N-glikana s Neu5Gc to su strukturno analogni H5N4F1G-Ac1 (F2-GP18) i H5N4F1G1 (F2-GP22-24) (**Slika 4.10**).

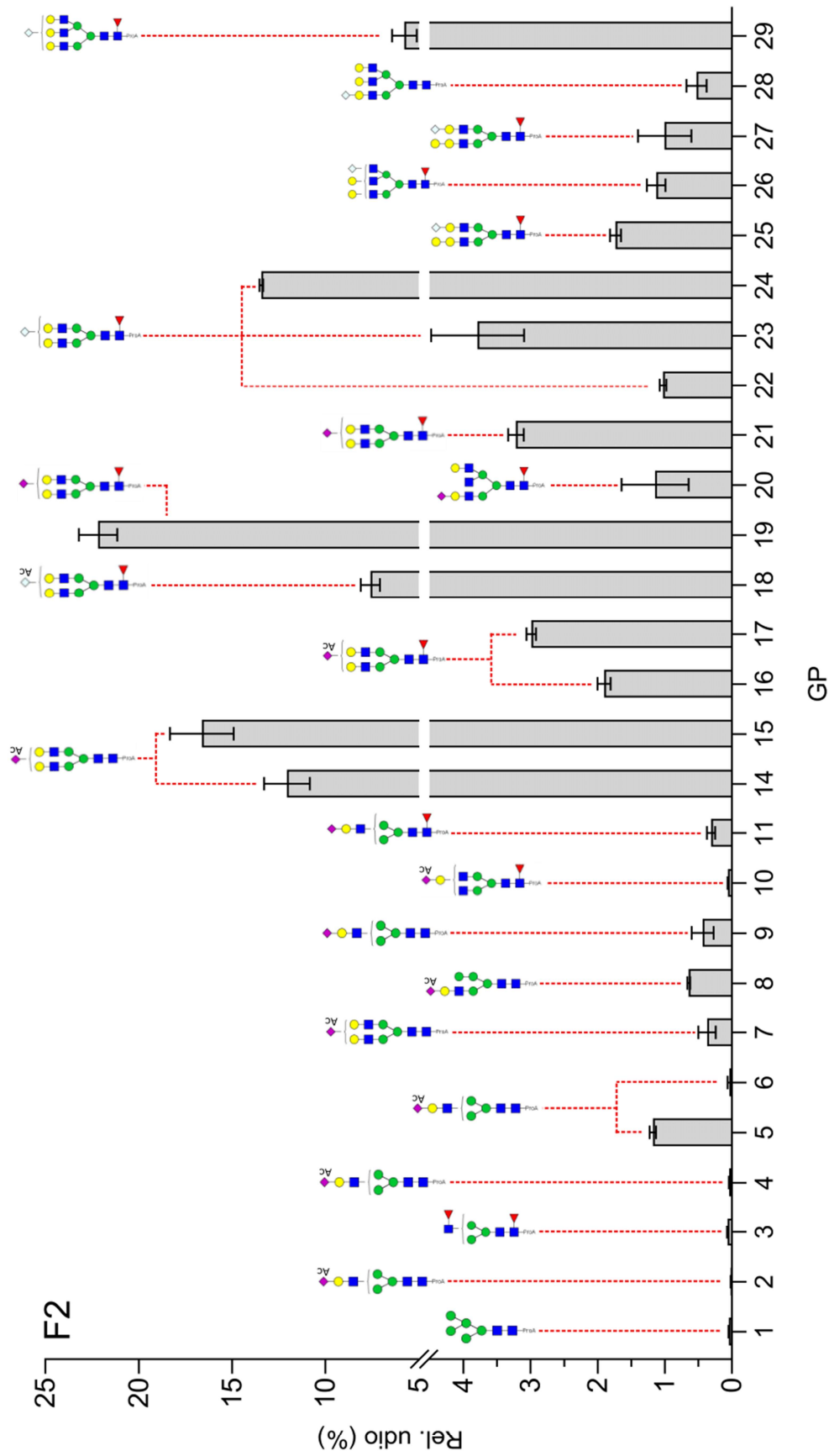


Slika 4.8. Anotirani kromatogram ProA-derivatiziranih monoanijskih N-glikana iz frakcije F2 nakon odjeljivanja na HILIC koloni uz detekciju fluorescencije ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370 \text{ nm}$). Popis svih anotiranih N-glikana naveden je i u **Prilogu 2B**. **GU** – glukoze jedinice, **GP** – N-glikanski pik.

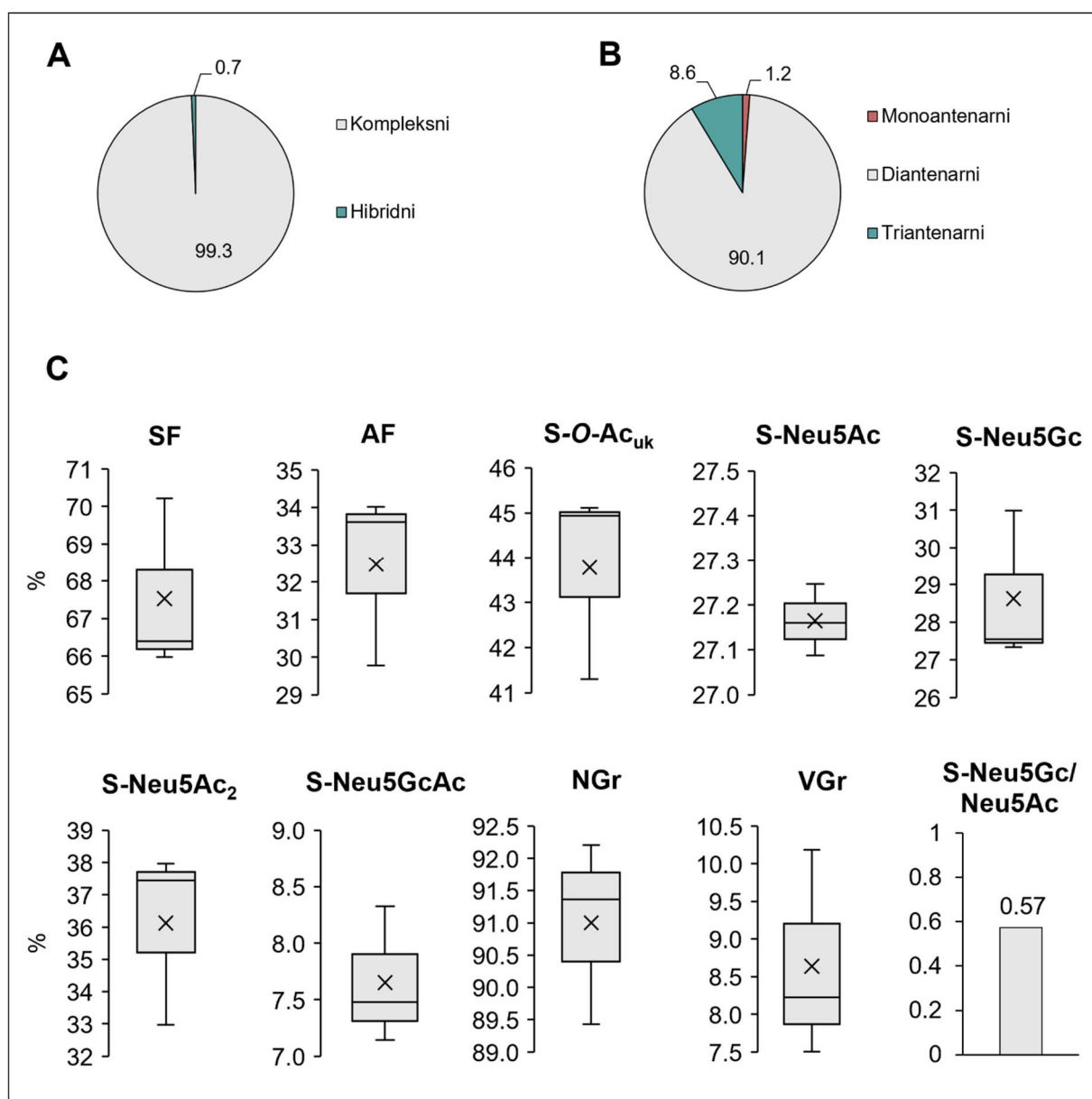


Slika 4.9. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa kompleksnog monosijaliniziranog i sržno fukoziliranog diantenarnog N-glikana sastava H5N4F1S1. Prekursorski ion u spektru označen je crvenim kvadratićem.

Sržno fukozilirani N-glikani su zastupljeni s prosječnim relativnim udjelom od 68 %, a antenarna fukozilacija u frakciji F2 nije utvrđena. Ukupan udio struktura s *O*-Ac-Sia je visok, gotovo 45 %, a među njima su zastupljeniji N-glikani s Neu5Ac₂, što je u suprotnosti s udjelom neacetiliranih sijaloglikana među kojima prevladavaju oni s Neu5Gc. Na to ukazuje i visoki omjer Neu5Gc/Neu5Ac od 0.57. N-glikani niskog stupnja grananja imaju udio od preko 90 % što je razvidno i iz pojedinačnih identificiranih struktura (**Slika 4.11**). U kromatogramu je uočeno da sijalinizirani N-glikan s *O*-Ac skupinom eluira ranije od svog strukturnog analoga bez nje, i to prvo oni s Neu5Ac, a zatim s Neu5Gc. To ukazuje da *O*-acetilacija Sia mijenja hidrofobnost N-glikana i njegovu retentivnost na kromatografskoj nepokretnoj fazi.



Slika 4.10. Relativni udjeli (%) pojedinih monoanionskih N-glikana u frakciji F2. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$). U slučaju izomernih N-glikana, jedna struktura je prikazana za dva ili više N-glikanska pika. Prikaz slijedi kromatogram na **Slici 4.8** i **Prilog 2B. GP** – N-glikanski pik.



Slika 4.11. Relativni udjeli (%) monoanionskih N-glikana u frakciji F2 prema tipu (A) i antenarnosti (B). Izvedena N-glikanska svojstva prikazana su kao zbrojeni relativni udjeli N-glikana sa zajedničkim strukturnim karakteristikama (C). **SF** – sržna fukozilacija; **AF** – afukozilacija; **S-O-Ac_{uk}** – ukupan udio sijaliniziranih O-acetiliranih N-glikana; **S-Neu5Ac** – sijalinizacija s Neu5Ac; **S-Neu5Gc** – sijalinizacija s Neu5Gc; **S-Neu5Ac₂** – sijalinizacija s Neu5Ac₂; **S-Neu5GcAc** – sijalinizacija s Neu5GcAc; **NGr** – N-glikani niskog stupnja grananja (mono- i diantennarni); **VGr** – N-glikani visokog stupnja grananja (tri- i tetraantennarni); **S-Neu5Gc/Neu5Ac** – omjer udjela N-glikana s Neu5Gc i Neu5A.

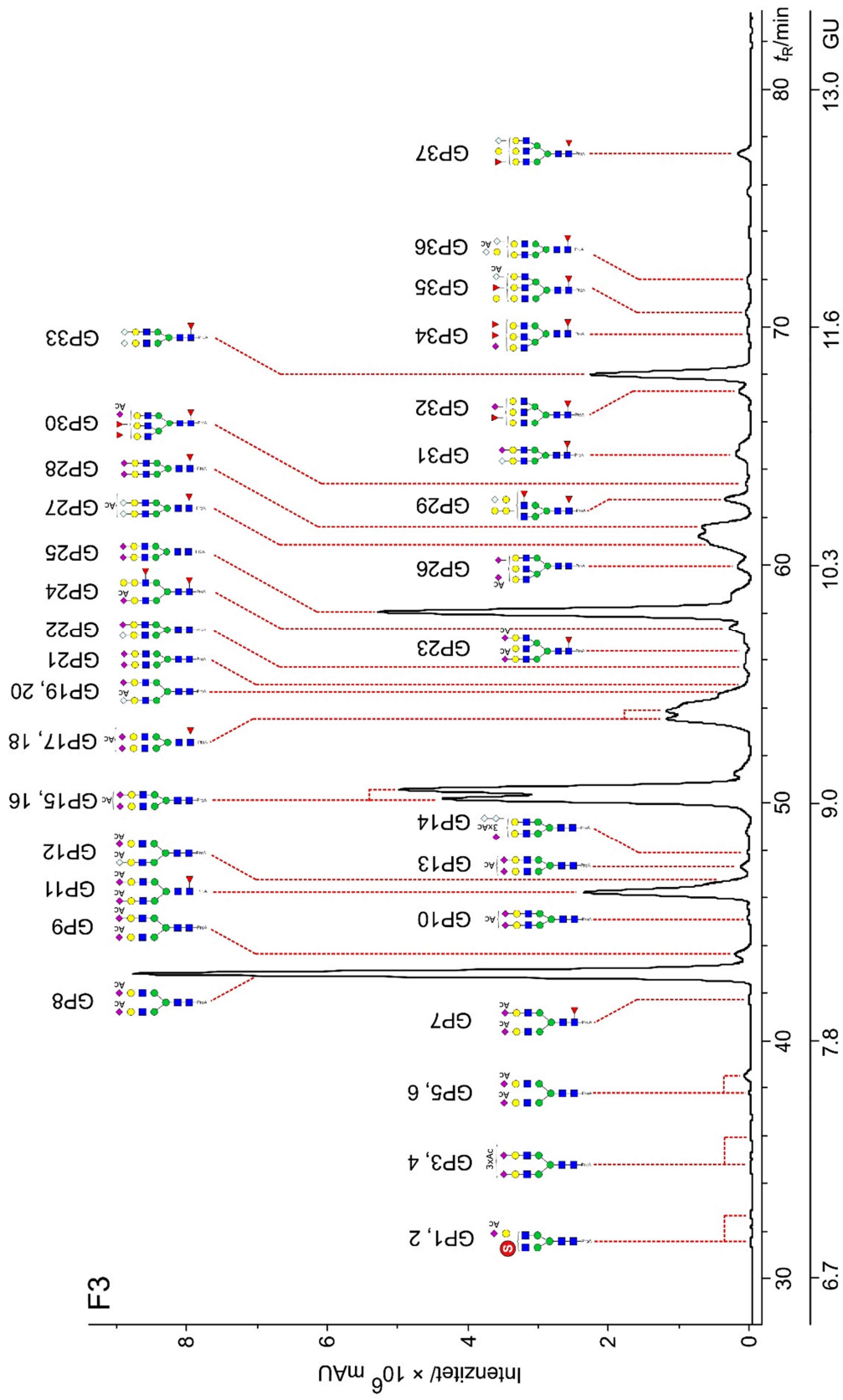
4.1.4 Dianionski N-glikani

U dianionskoj frakciji anotirano je ukupno 37 N-glikana (F3-GP1-37) koji eluiraju u rasponu t_R 31.6-77.3 min, s vrijednostima GU 6.91-12.46. Strukture u ovoj frakciji su disijalinizirane, uz iznimku jednog sulfatiranog monosijaliniziranog N-glikana (F3-GP1, 2) koji je veličinom ujedno i najmanji. Najveće strukture su triantenari ($t_R \sim 62$ min i dalje) s dvije Sia od kojih su jedna (F3-GP26) ili obje (F3-GP27) *O*-acetilirane. Neke strukture interpretirane su kao monoanionske s jednom Sia i antenarnom fukozom, uz mogućnost pogreške zbog slabih signala u fragmentacijskom spektru ili koeluiranja iz monoanionske frakcije. Kao i u monoanionskoj frakciji, Sia čine Neu5Ac i Neu5Gc, no prisutne su i „miješane“ strukture s obje Sia (F3-GP12, 14, 22, 31) (**Slika 4.12, Prilog 2C**).

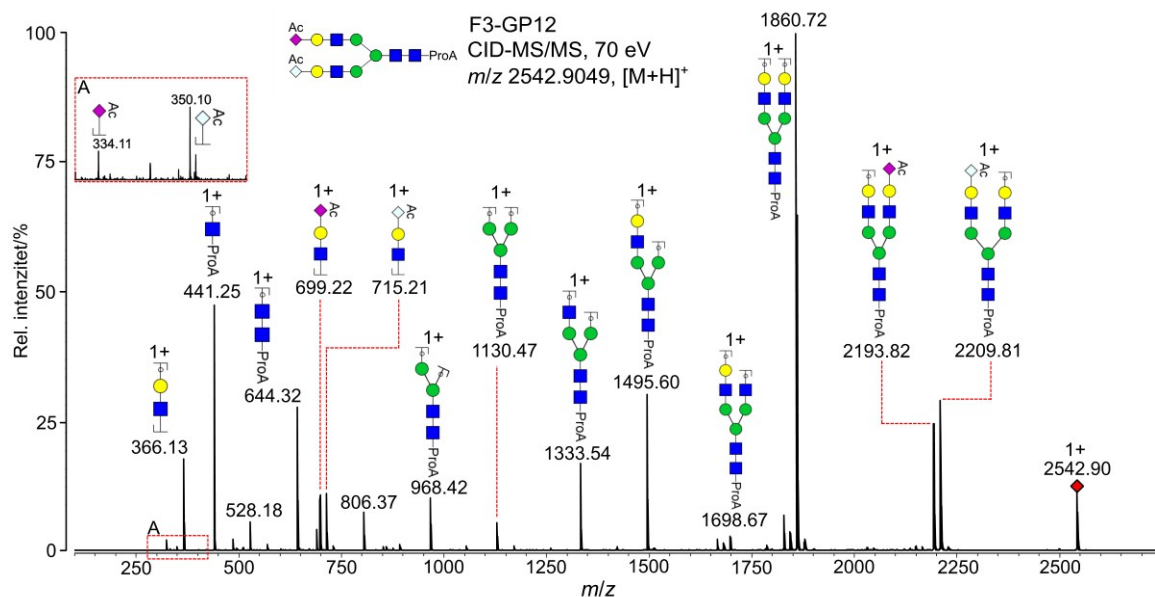
Fragmentacijski spektri masa dianionskih N-glikana dijele sličnosti s monoanionskim. U slučaju „miješanih“ disijaliniziranih struktura karakteristični su najprije gubitci Sia s antena prekursorškog iona, kao u primjeru na **Slici 4.13**. U području nižih m/z vrijednosti uočava se prisutnost oba oksonijeva iona karakteristična za Neu5Ac₂ i Neu5GcAc na m/z 699.2 i m/z 715.2. Također su u nekim fragmentacijskim spektrima prisutni i oksonijevi ioni vrlo slabog intenziteta formirani iz same *O*-Ac-Sia: [Neu5Ac₂]⁺, m/z 334.1, i [Neu5GcAc]⁺, m/z 350.1 (**Slika 4.13A**). Sulfatirani N-glikani nisu zasebno pročišćavani niti analizirani. Sulfatna skupina je labilna i u pozitivnom polaritetu ionizacije vrlo lako otpadne s monosaharida na koji je vezana, pa su takvi N-glikani identificirani samo prema gubitku mase od -79.9 Da iz prekursorškoga iona (**Slika 4.14**). Također nije bilo moguće odrediti niti koji je monosaharid sulfatiran, te je sulfatacija slobodno interpretirana u formi GlcNAc-6-S koji je najčešći.

U ovoj su frakciji zastupljeni isključivo kompleksni N-glikani, i to diantenari, s udjelom od 97.5 % (**Slika 4.16A, B**). Od pojedinačnih N-glikana udjelom su dominantni H5N4S2 (F3-GP25) i strukturni analog H5N4S-Ac2 s dvije Neu5Ac₂ koji čini 25 %. S udjelima 5-15 %, sljedeći po zastupljenosti su H5N4S-Ac1 u obliku dva izomera (F3-GP15, 16) i sržno fukozilirani H5N4F1S-Ac2 (F3-GP11). N-glikana s Neu5Gc i Neu5GcAc je udjelom znatno manje i izdvaja se H5N4F1G1 (**Slika 4.15**).

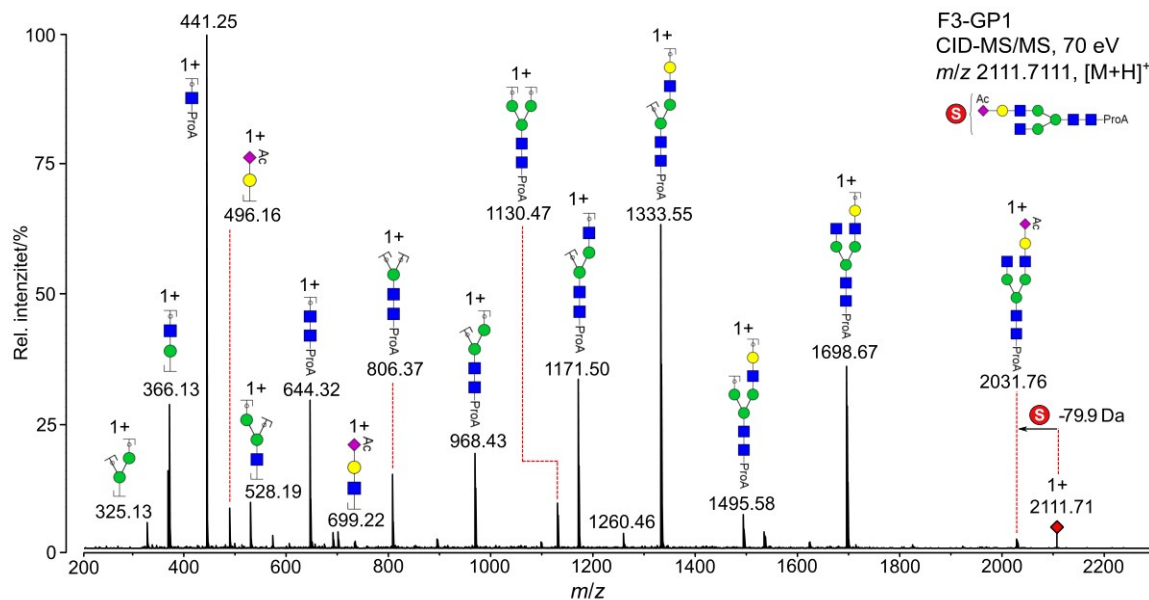
Afukoziliranih N-glikana je u usporedbi s F1 i F2 najviše, 73 %. Sijalinizirani N-glikani modificirani su pretežno s Neu5Ac (~ 30%) i Neu5Ac₂ (~ 60 %), a manji dio udjela otpada na „miješane“ N-glikane s obje Sia. Znatno manji udio N-glikana s Neu5Gc uočava se i kroz omjer Neu5Gc/Neu5Ac od 0.16. Udio N-glikana s *O*-Ac-Sia također je povećan u odnosu na monoanionsku frakciju i iznosi 65 %. Kao i u monoanionskoj frakciji, većina struktura su niskog stupnja grananja.



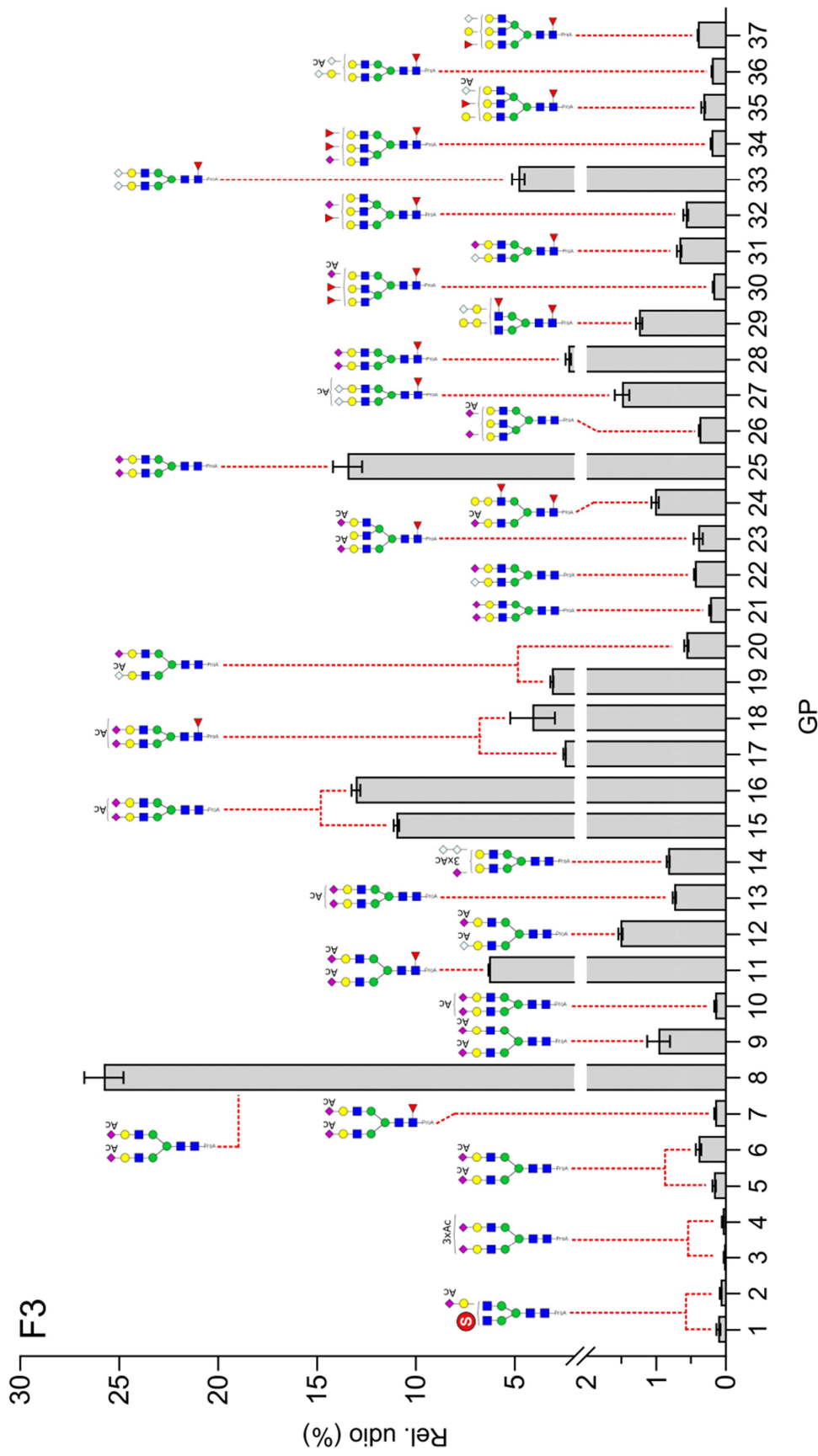
Slika 4.12. Anotirani kromatogram ProA-derivatiziranih dianionskih N-glikana iz frakcije F3 nakon odjeljivanja na HILIC koloni uz detekciju fluorescencije ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370$ nm). Popis svih anotiranih N-glikana naveden je i u **Prilogu 2C**. **GU** – glukozne jedinice, **GP** – N-glikanski pik.



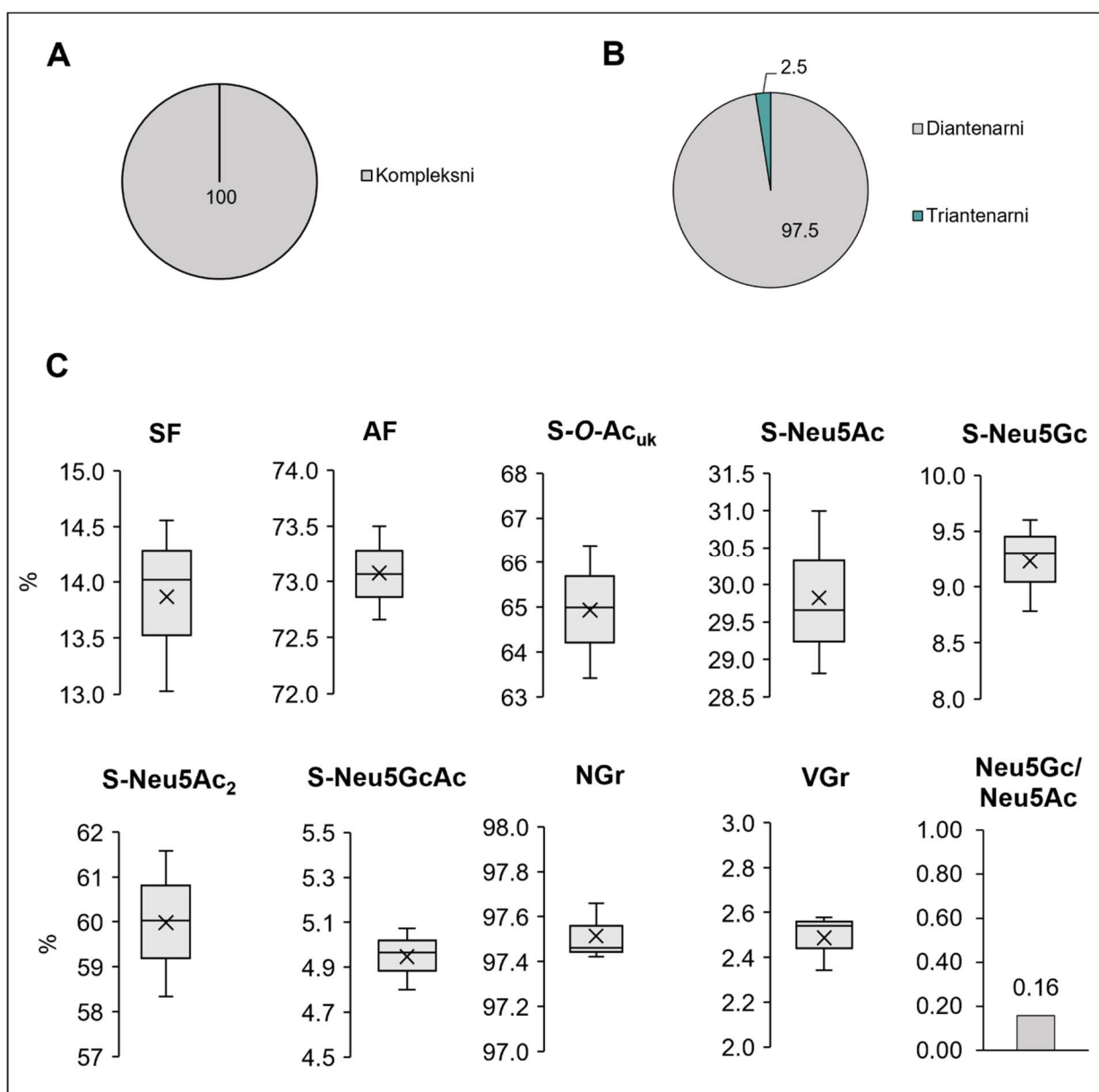
Slika 4.13. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa kompleksnog disijaliniziranog dantenarnog N-glikana s dvije različite *O*-Ac-Sia, sastava H5N4S-Ac1G-Ac-1. Prekursorni ion u spektru označen je crvenim kvadratićem.



Slika 4.14. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa kompleksnog sulfatiranog dantenarnog N-glikana s Neu5Ac₂ sastava H4N4S-Ac1Sulf1. Prekursorni ion u spektru označen je crvenim kvadratićem.



Slika 4.15. Relativni udjeli (%) pojedinih dianionskih N-glikana u frakciji F3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$). U slučaju izomernih N-glikana, jedna struktura je prikazana za dva ili više N-glikanska pika. Prikaz slijedi kromatogram na **Slici 4.12** i **Prilog 2C. GP** – N-glikanski pik.



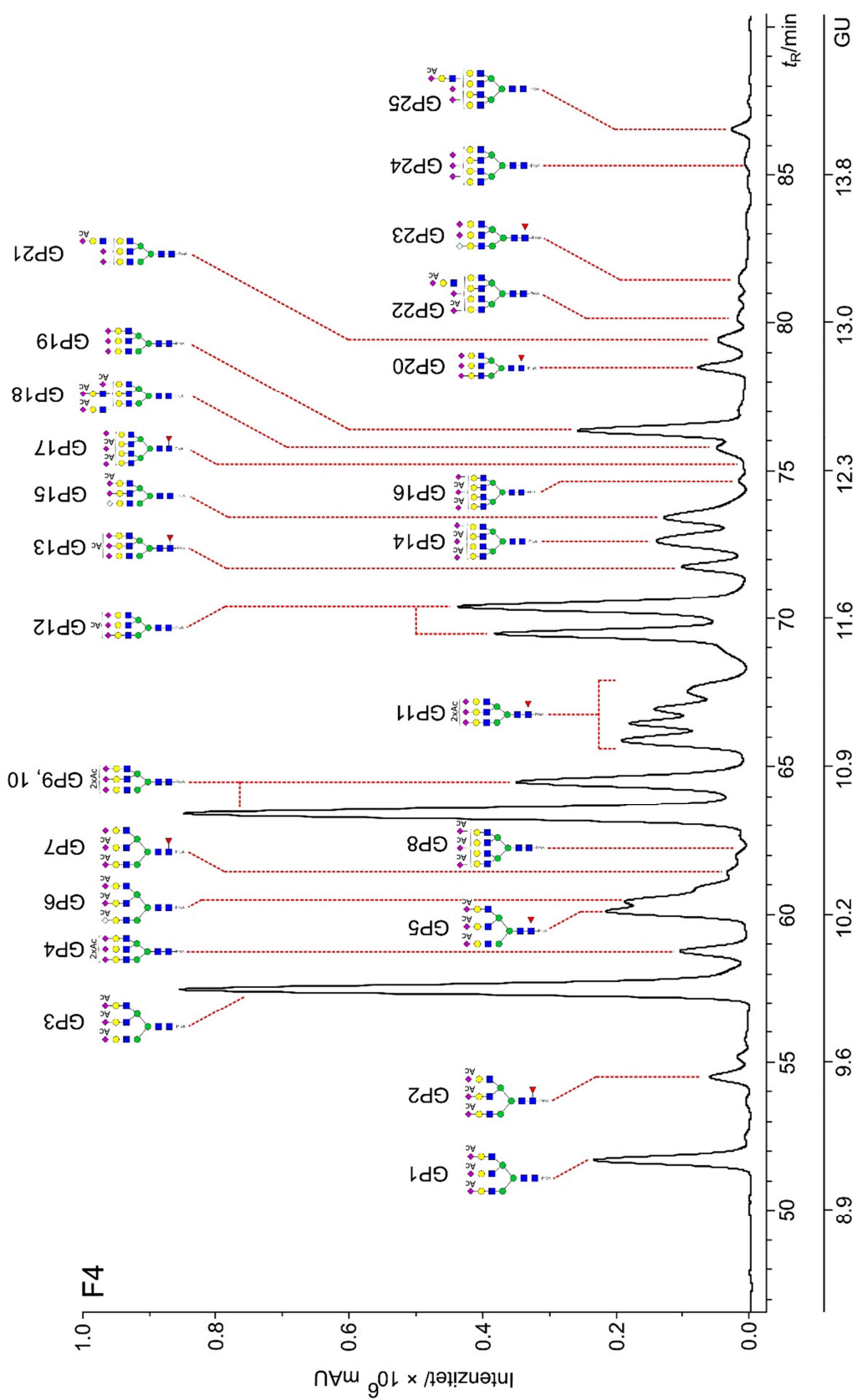
Slika 4.16. Relativni udjeli (%) dianionskih N-glikana u frakciji F3 prema tipu (A) i antenarnosti (B). Izvedena N-glikanska svojstva prikazana su kao zbrojeni relativni udjeli N-glikana sa zajedničkim strukturnim karakteristikama (C). **SF** – sržna fukozilacija; **AF** – afukozilacija; **S-O-Ac_{uk}** – ukupan udio sijaliniziranih O-acetiliranih N-glikana; **S-Neu5Ac** – sijalinizacija s Neu5Ac; **S-Neu5Gc** – sijalinizacija s Neu5Gc; **S-Neu5Ac₂** – sijalinizacija s Neu5Ac₂; **S-Neu5GcAc** – sijalinizacija s Neu5GcAc; **NGr** – N-glikani niskog stupnja grananja (mono- i diantenarni); **VGr** – N-glikani visokog stupnja grananja (tri- i tetraantenarni); **S-Neu5Gc/Neu5Ac** – omjer udjela N-glikana s Neu5Gc i Neu5Ac.

4.1.5 Trianionski N-glikani

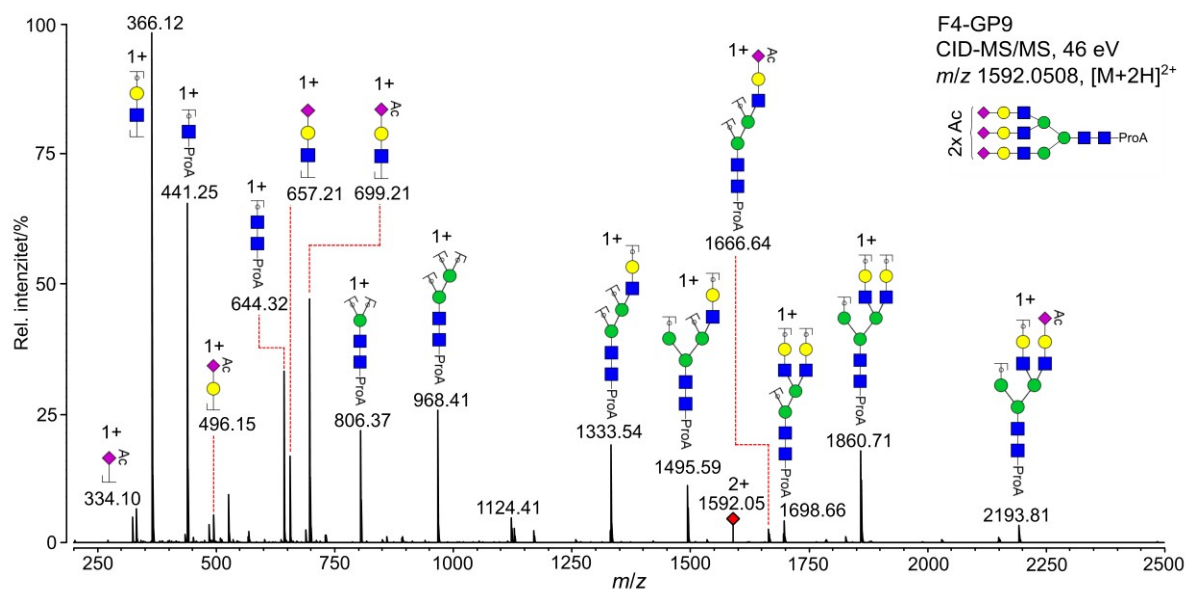
U trianionskoj frakciji anotirano je ukupno 25 N-glikana (F4-GP1-25) koji eluiraju u rasponu t_R 51.7-86.8 min, s vrijednostima GU 9.18-14.11. Strukture u ovoj frakciji su trisijalinizirane, uz iznimku nekoliko disijaliniziranih tetraantenara (F4-GP14, 16, 17, 22) koji koeluiraju iz tetraanionske frakcije F5 ili su sulfatirani što nije uspješno potvrđeno. Ako se izuzmu te najveće strukture, preostali N-glikani su triantenari s Neu5Ac ili Neu5Gc od kojih su jedna, dvije ili tri *O*-acetilirane. To je dobro vidljivo na primjeru N-glikana sastava H6N5S3 (F4-GP19) i njegovih strukturnih analoga s jednom (F4-GP12), dvije (F4-GP9) i tri (F4-GP3) Neu5Ac₂. Te su strukture udjelom i najzastupljenije (**Slika 4.20**). Također je uočljiv utjecaj porasta broja *O*-Ac-Sia na retentivnost N-glikana koja se na HILIC nepokretnoj fazi sve više smanjuje zbog povećane hidrofobnosti. Kao i u dianionskoj frakciji, prisutne su i „miješane“ strukture s dvije različite Sia (F4-GP6, 15, 23) (**Slika 4.17, Prilog 2D**).

Fragmentacijski spektri masa imaju sve već opisane karakteristike sijaliniziranih N-glikana, uz iznimku porasta naboja prekursorskih iona koji su često u formi Na-adukta – $[M+2Na]^{2+}$ ili $[M+Na+H]^{2+}$ – jer zbog većeg broja negativno nabijenih karboksilnih skupina iz Sia lakše koordiniraju alkaljske katione. Ovisno o broju Neu5Ac i Neu5Ac₂ u N-glikanu, uočeno je da se mijenja i omjer intenziteta oksonijevih iona m/z 657.2 i m/z 699.1 prema čemu se može procijeniti broj prisutnih *O*-Ac-Sia (**Slika 4.18**). Navedeno vrijedi i za parove oksonijevih iona iz Neu5Gc i Neu5GcAc, a efekt je prisutan i u fragmentacijskim spektrima tetrasijaliniziranih N-glikana iz F5 i ima potencijalnu primjenu u interpretaciji spektara masa (**Slika 4.19**).

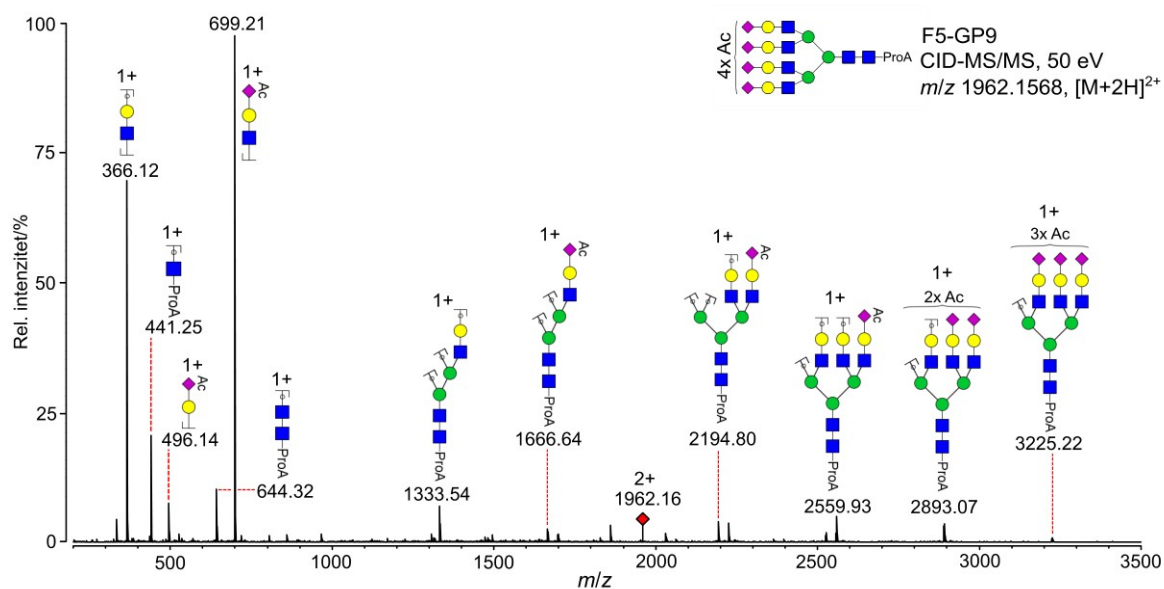
U frakciji F4 zastupljeni su samo kompleksni N-glikani s udjelom triantenara od 97.5 %, dok preostale čine tetraantenari. Sržna fukozilacija i afukozilacija gotovo su identične kao kod dianionskih N-glikana. Između izvedenih N-glikanskih svojstava izdvaja se vrlo visoka sijalinizacija s Neu5Ac₂ od gotovo 95 %. Zastupljenost Neu5Gc i Neu5GcAc je mala što se očituje i kroz omjer Neu5Gc/Neu5Ac od samo 0.06. Ukupan udio struktura sa sijalil-*N*-acetillaktozaminom (sijalil-LacNAc) koje su u ovoj frakciji nešto zastupljenije iznosi oko 1.6 % (**Slika 4.21**).



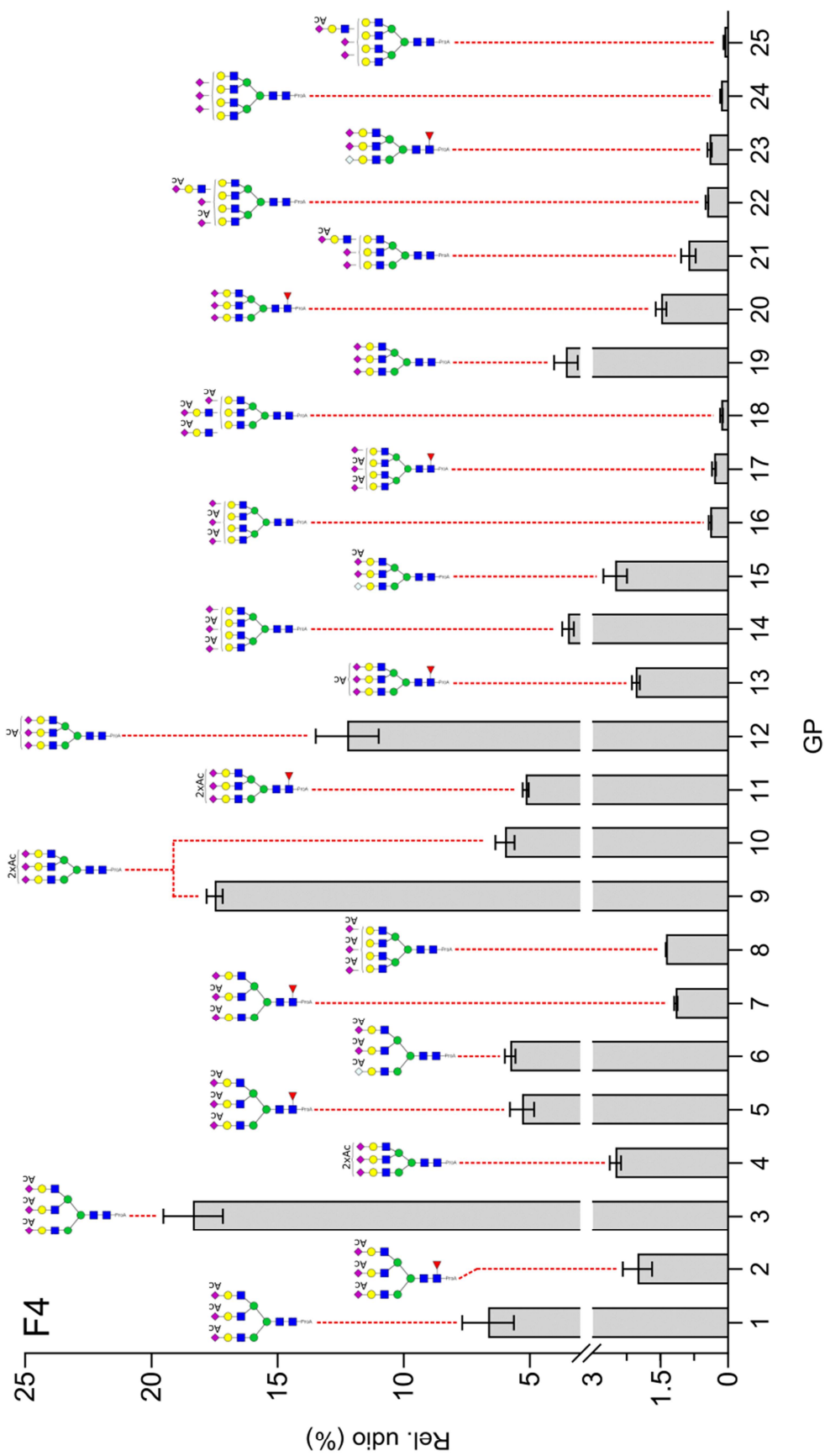
Slika 4.17. Anotirani kromatogram ProA-derivatiziranih trianionskih N-glikana iz frakcije F4 nakon odjeljivanja na HILIC koloni uz detekciju fluorescencije ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370 \text{ nm}$). Popis svih anotiranih N-glikana naveden je i u **Prilogu 2D**. **GU** – glukozne jedinice, **GP** – N-glikanski pik.



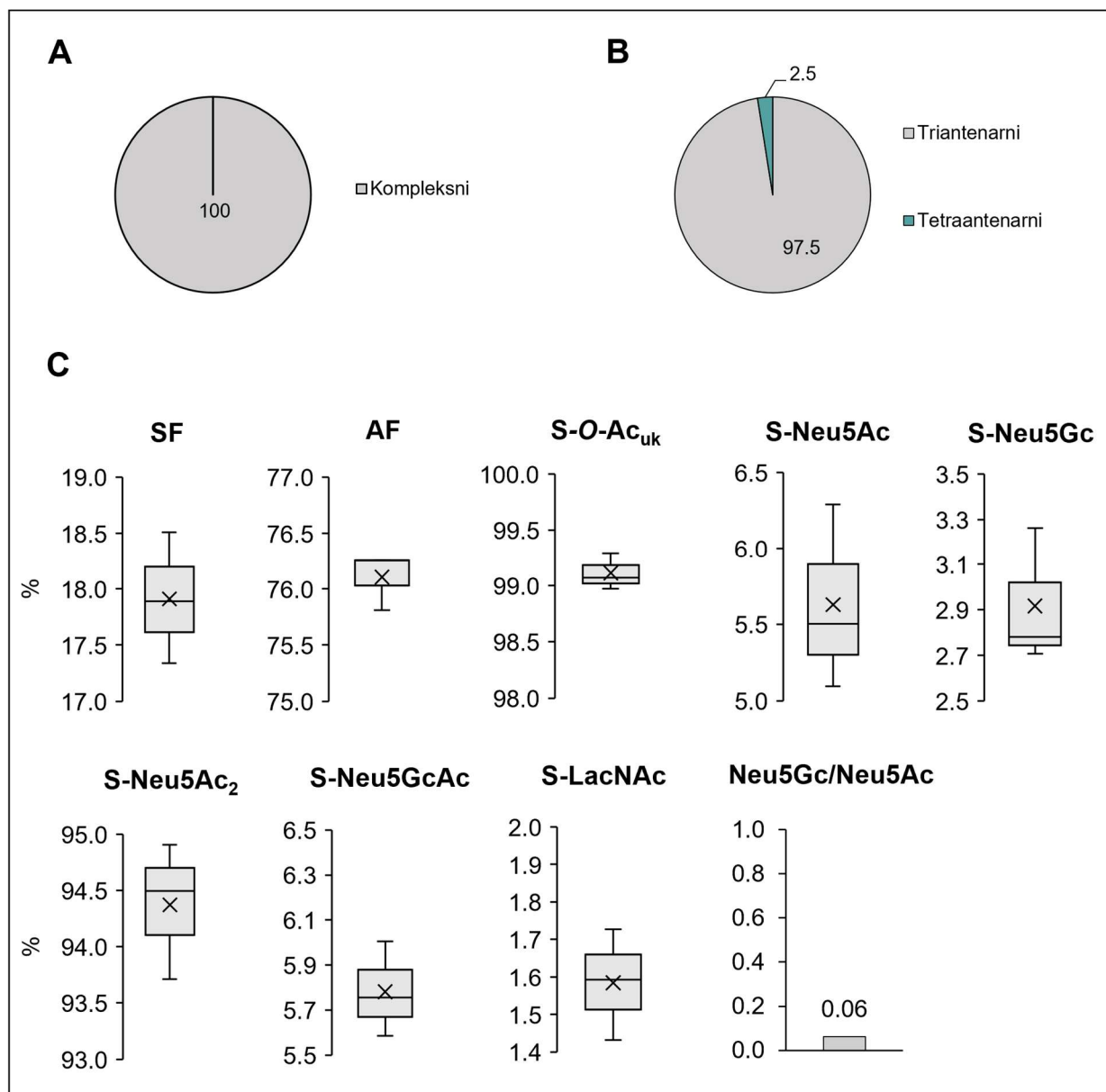
Slika 4.18. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa kompleksnog triantenarnog afukoziliranog N-glikana s $1 \times \text{Neu5Ac}$ i $2 \times \text{Neu5Ac}_2$, sastava H6N5S1S-Ac2. Prekursorni ion u spektru označen je crvenim kvadratićem.



Slika 4.19. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra masa kompleksnog tetraantenarnog afukoziliranog N-glikana s $4 \times \text{Neu5Ac}_2$, sastava H7N6S-Ac4. Prekursorni ion u spektru označen je crvenim kvadratićem.



Slika 4.20. Relativni udjeli (%) pojedinih triantenskih N-glikana u frakciji F4. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$). U slučaju izomernih N-glikana, jedna struktura je prikazana za dva ili više N-glikanska pika. Prikaz slijedi kromatogram na **Slici 4.17** i **Prilog 2D. GP** – N-glikanski pik.

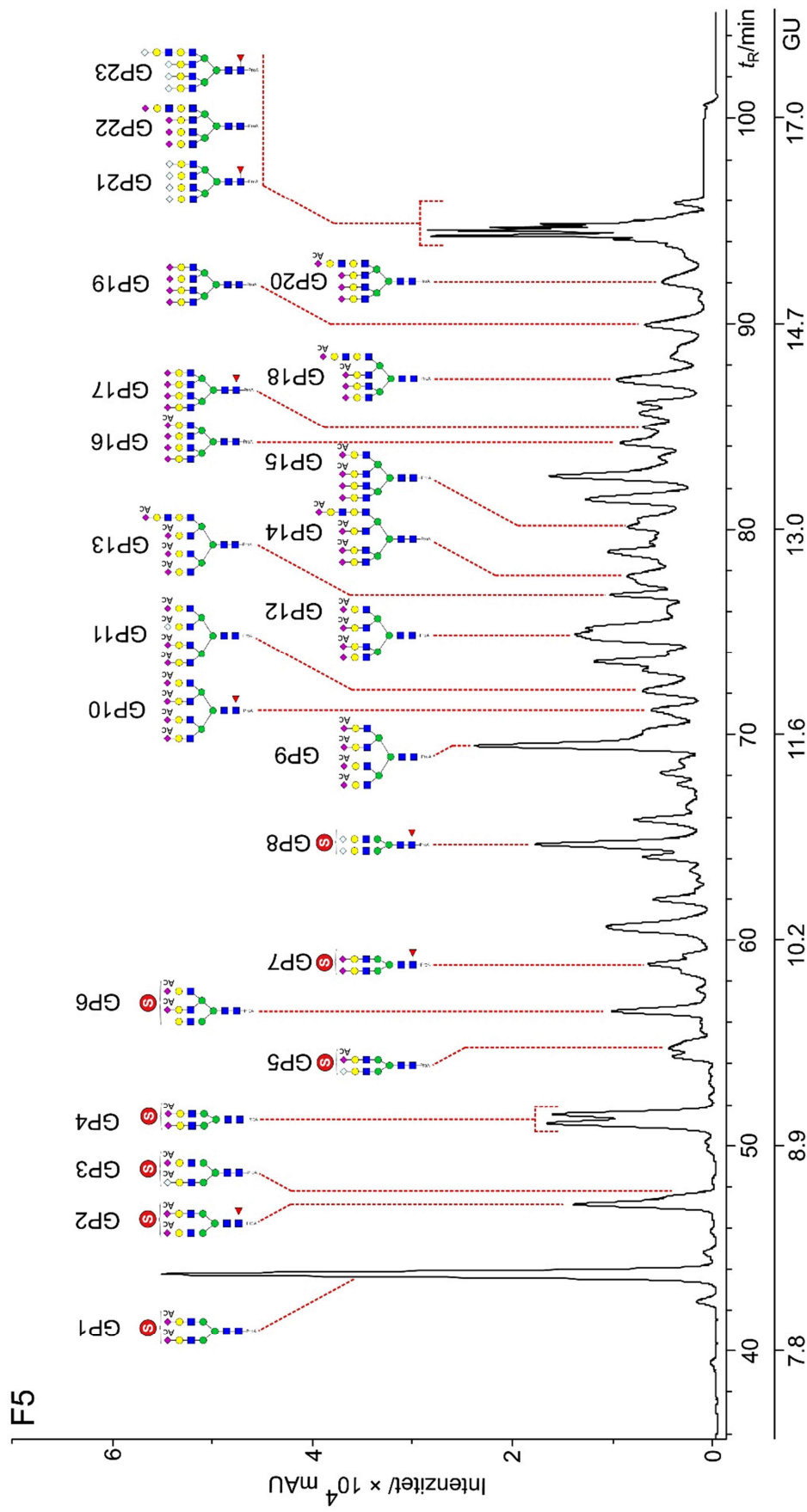


Slika 4.21. Relativni udjeli (%) triantennskih N-glikana u frakciji F4 prema tipu (**A**) i antenarnosti (**B**). Izvedena N-glikanska svojstva prikazana su kao zbrojeni relativni udjeli N-glikana sa zajedničkim strukturnim karakteristikama (**C**). **SF** – sržna fukozilacija; **AF** – afukozilacija; **S-O-Ac_{uk}** – ukupan udio sijaliniziranih *O*-acetiliranih N-glikana; **S-Neu5Ac** – sijalinizacija s Neu5Ac; **S-Neu5Gc** – sijalinizacija s Neu5Gc; **S-Neu5Ac₂** – sijalinizacija s Neu5Ac₂; **S-Neu5GcAc** – sijalinizacija s Neu5GcAc; **S-LacNAc** – ukupan udio N-glikana sa sijalil-*N*-acetillaktozaminom; **S-Neu5Gc/Neu5Ac** – omjer udjela N-glikana s Neu5Gc i Neu5Ac.

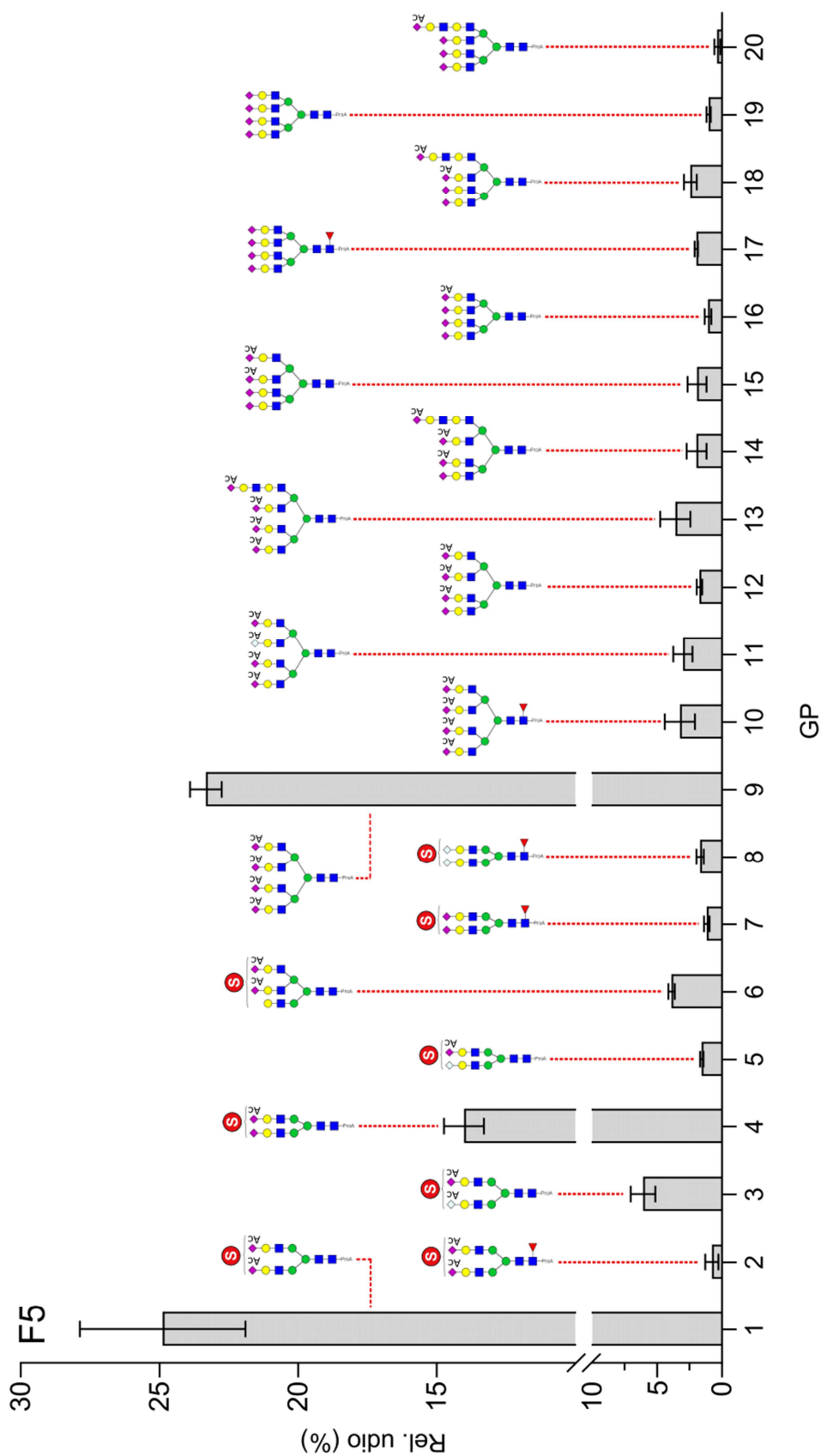
4.1.6 Tetraanionski N-glikani

U tetraanionskoj frakciji anotirana su ukupno 23 N-glikana (F5-GP1-20) koji eluiraju u rasponu t_R 43.8-94.8 min, s vrijednostima GU 8.23-15.67. Zbog slabih intenziteta signala u fragmentacijskim spektrima nije bilo moguće interpretirati većinu struktura niti anotirati sve pikove u kromatogramu fluorescencije. Ovu frakciju djelomično čine i sulfatirani trianionski N-glikani ($t_R \sim 42.0-66.0$ min) koji su disijalinizirani i koeluiraju s tetraanionskim N-glikanima na WAX koloni (F5-GP1-8). U ovoj frakciji nalaze se molekulskom masom najveći N-glikani u N-glikomu krvne plazme GŠ. To su tetrasijalinizirani tetraantenari s Neu5Ac ili Neu5Gc, te 1-4 *O*-Ac skupine; uglavnom bez sržne fukoze (F5-GP9-23). Neki od tih N-glikana dodatno su na antenama modificirani sijalil-LacNAc epitopom (npr. F5-GP13, 14) (**Slika 4.22**). Fragmentacijski spektri masa prate sve prethodno navedene karakteristike i prisutnost dijagnostičkih oksonijevih iona (**Slika 4.19**). Izuzme li se pojedinačni sulfatirani N-glikan sastava H5N4S-Ac2Sulph1 (F5-GP1) s udjelom od 25 %, najzastupljeniji je, s podjednakim udjelom, H7N6S-Ac4 (F5-GP9).

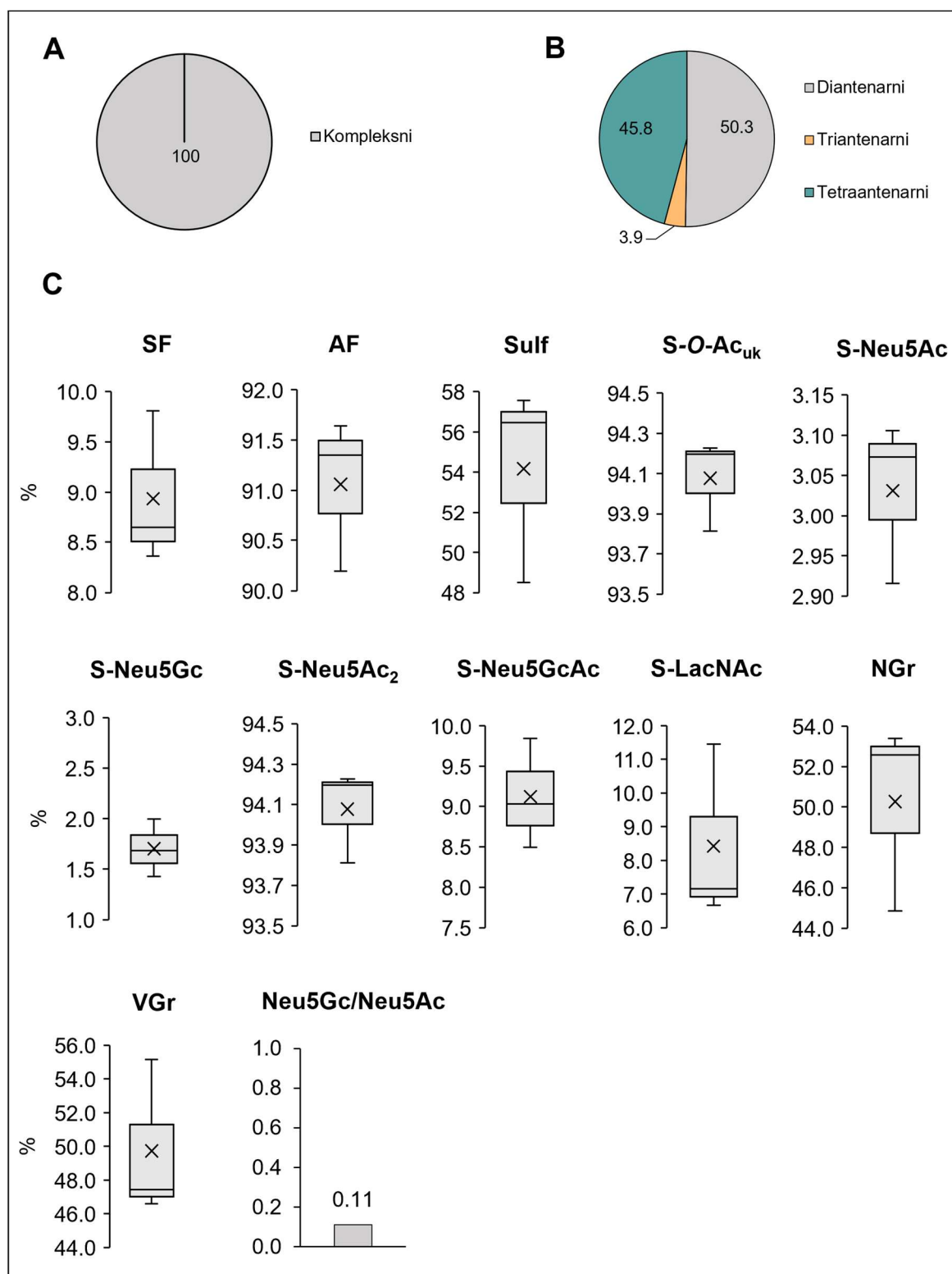
Svi N-glikani u frakciji F5 su kompleksnog tipa. Afukozilacija N-glikana je najviša među svim anionskim frakcijama i iznosi 91 %, a sulfatacija 54 %. N-glikana s ne-*O*-acetiliranim Sia gotovo i nema pa sijalinizacija s Neu5Ac₂ iznosi 94 %, a zastupljenost Neu5Gc u sijalinizaciji je ispod 3 %, odnosno ispod 10 % za Neu5GcAc. To je u skladu s niskim omjerom Neu5Gc/Neu5Ac od 0.11. Tetraanionska frakcija jedina je u kojoj N-glikani visokog stupnja grananja dosežu udio od 50 % (**Slika 4.24**).



Slika 4.22. Anotirani kromatogram ProA-derivatiziranih tetraantionskih N-glikana iz frakcije F5 nakon odjeljivanja na HILIC koloni uz detekciju fluorescencije ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/370$ nm). Pikovi F5-GP21-23 koeluiraju pa nisu integrirani već samo anotirani. Popis svih anotiranih N-glikana naveden je u **Prilogu 2E**. **GU** – glukozne jedinice, **GP** – N-glikanski pik.



Slika 4.23. Relativni udjeli (%) pojedinih tetraantionskih N-glikana u frakciji F5. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$). U slučaju izomernih N-glikana, jedna struktura je prikazana za dva ili više N-glikanska pika. Prikaz slijedi kromatogram na **Slici 4.22** i **Prilog 2E**. GP – N-glikanski pik.



Slika 4.24. Relativni udjeli (%) tetraanionskih N-glikana u frakciji F5 prema tipu (A) i antenarnosti (B).

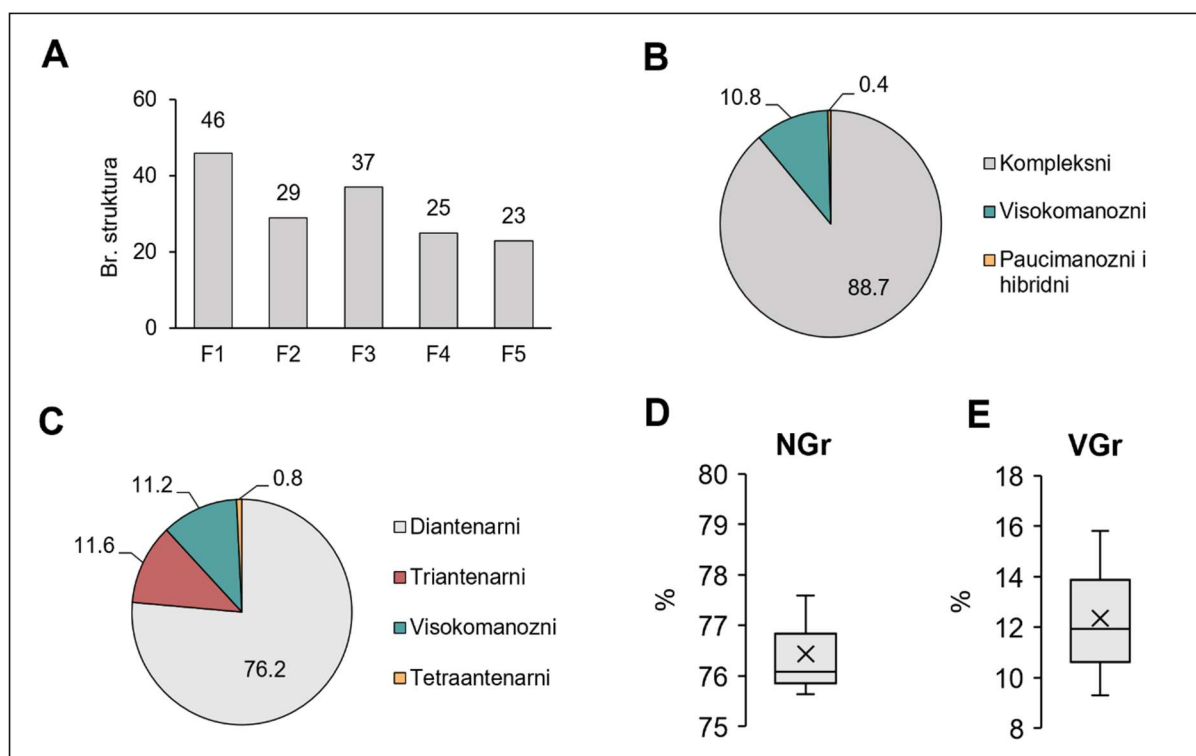
Slika 4.24 – nastavak. Podaci u tortnim dijagramima predstavljeni su kao srednja vrijednost ($n = 3$). Izvedena N-glikanska svojstva prikazana su kao zbrojeni relativni udjeli N-glikana sa zajedničkim strukturnim karakteristikama (C). **SF** – sržna fukozilacija; **AF** – afukozilacija; **S-O-Ac_{uk}** – ukupan udio sijaliniziranih O-acetiliranih N-glikana; **S-Neu5Ac** – sijalinizacija s Neu5Ac; **S-Neu5Gc** – sijalinizacija s Neu5Gc; **S-Neu5Ac₂** – sijalinizacija s Neu5Ac₂; **S-Neu5GcAc** – sijalinizacija s Neu5GcAc; **S-LacNAc** – ukupan udio N-glikana sa sijalil-N-acetil-laktozaminom; **NGr** – N-glikani niskog stupnja grananja (mono- i diantenarni); **VGr** – N-glikani visokog stupnja grananja (tri- i tetraantenarni); **S-Neu5Gc/Neu5Ac** – omjer udjela N-glikana s Neu5Gc i Neu5Ac.

4.1.7 Izvedena N-glikanska svojstva ukupnog N-glikoma

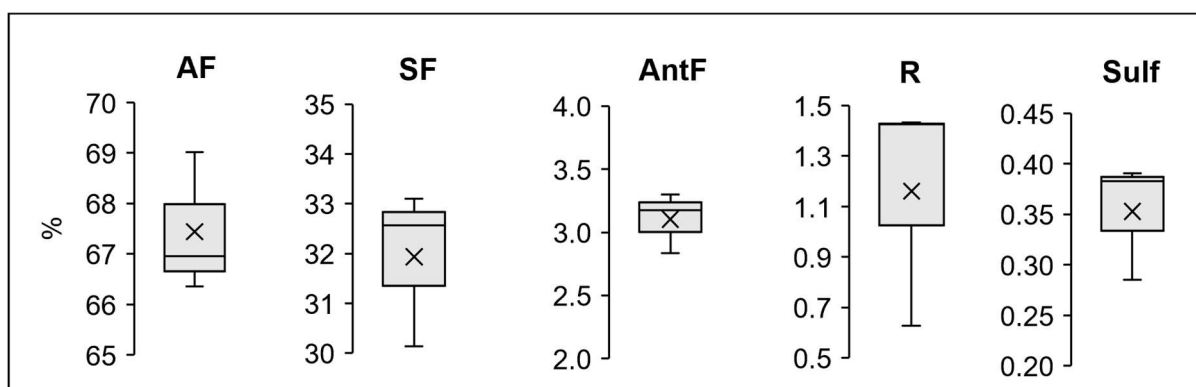
Izvedena N-glikanska svojstva ukupnog N-glikoma izračunata su iz zbroja površina integriranih kromatografskih pikova svih frakcija (F1-F5), uz aproksimaciju kao da se radilo o jedinstvenom kromatogramu jer su sve frakcije odjeljivane na HILIC koloni istom metodom. Za ukupan N-glikom udio pojedinih struktura nije izračunavan. Iako frakcionacija N-glikana prema naboju olakšava strukturnu analizu, tako dobiveni podaci otežavaju usporedbu N-glikoma različitih uzoraka. To vrijedi i za izvedena N-glikanska svojstva pojedinih frakcija koja ne odražavaju udjele strukturnih motiva ukupnog N-glikoma.

Ovim istraživanjem određeno je ukupno 160 različitih N-glikana koji čine N-glikom krvne plazme GŠ, i to najviše u neutralnoj frakciji (**Slika 4.25A**). Relativnim udjelom od 88.7 % najzastupljeniji su kompleksni N-glikani, zatim visokomanozni s 10.8 %, dok paucimanozni i hibridni zajedno čine tek 0.4 % N-glikoma (**Slika 4.25B**). Prema antenarnosti, diantenari sa 76.2 % čine više od dvije trećine svih struktura, a ostatak otpada na triantenare i visokomanozne N-glikane s gotovo podjednakim udjelom, te najmanje zastupljene tetraantenare s 0.8 % (**Slika 4.25C**). U skladu s tim su i N-glikani niskoga stupnja grananja (NGr) s udjelom od oko 76 % najzastupljeniji (**Slika 4.25D**).

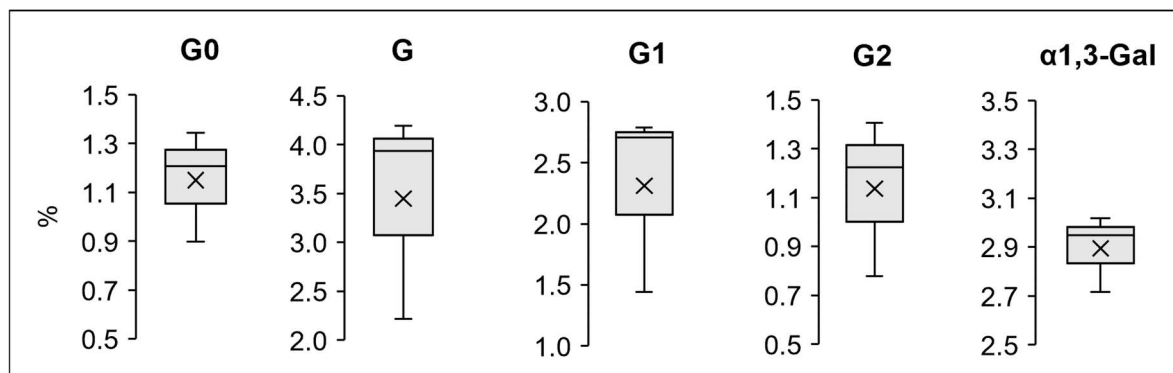
Afukozilirani N-glikani s udjelom od ~ 67 % su najzastupljeniji, a ostali su sržno (~ 32 %) ili antenarno fukozilirani. N-glikani s rasijecajućim GlcNAc su slabo zastupljeni, i to u neutralnoj frakciji. Sulfatirani N-glikani, iako prisutni u tetraanionskoj frakciji s udjelom većim od 50 %, u ukupnom N-glikomu čine udio od tek oko 0.35 % (**Slika 4.26**).



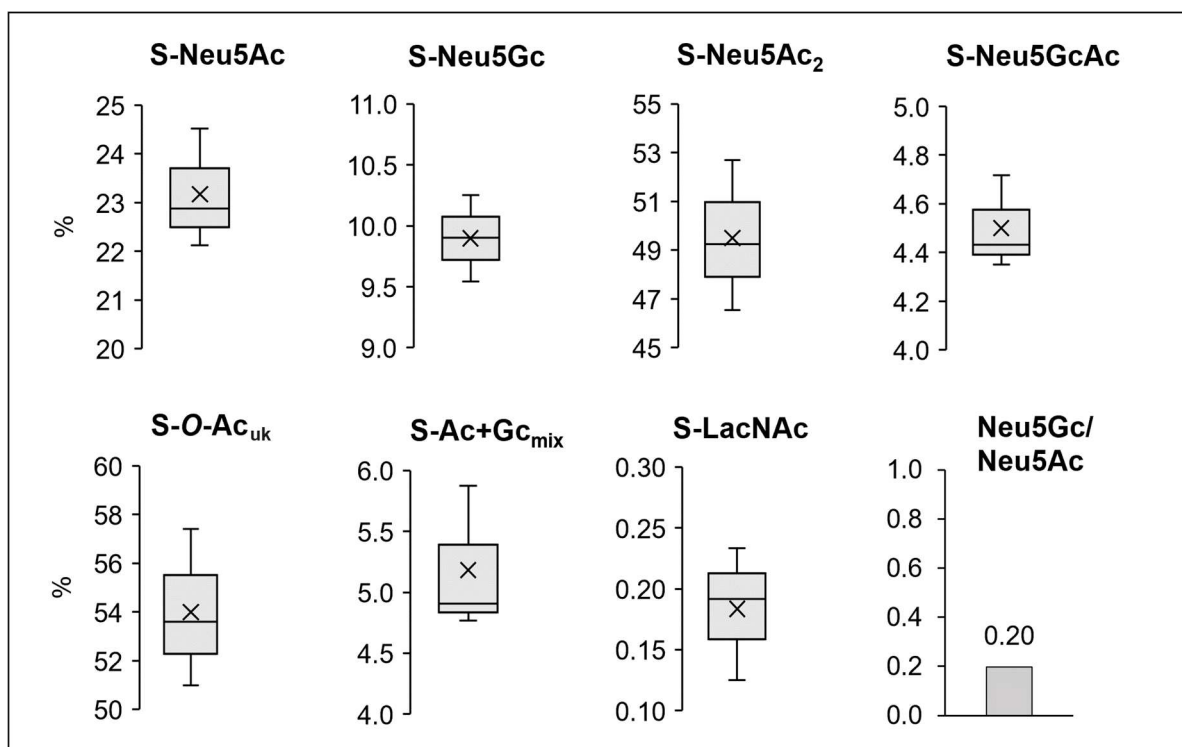
Slika 4.25. Broj anotiranih N-glikana po pojedinim frakcijama (A). Udio N-glikana prema tipu (B), antenarnosti (C) i niskom odnosno visokom stupnju grananja (D, E) u ukupnom N-glikomu.



Slika 4.26. Izvedena N-glikanska svojstva ukupnog N-glikoma (1). **AF** – afukozilacija; **SF** – sržna fukozilacija; **AntF** – antenarna fukozilacija; **R** – rasijecajući GlcNAc; **Sulf** – sulfatacija.



Slika 4.27. Izvedena N-glikanska svojstva ukupnog N-glikoma (2). **G0** – agalaktozilacija; **G** – ukupna galaktozilacija; **G1** – monogalaktozilacija; **G2** – digalaktozilacija; **α-Gal** – α-1,3-galaktozilacija.



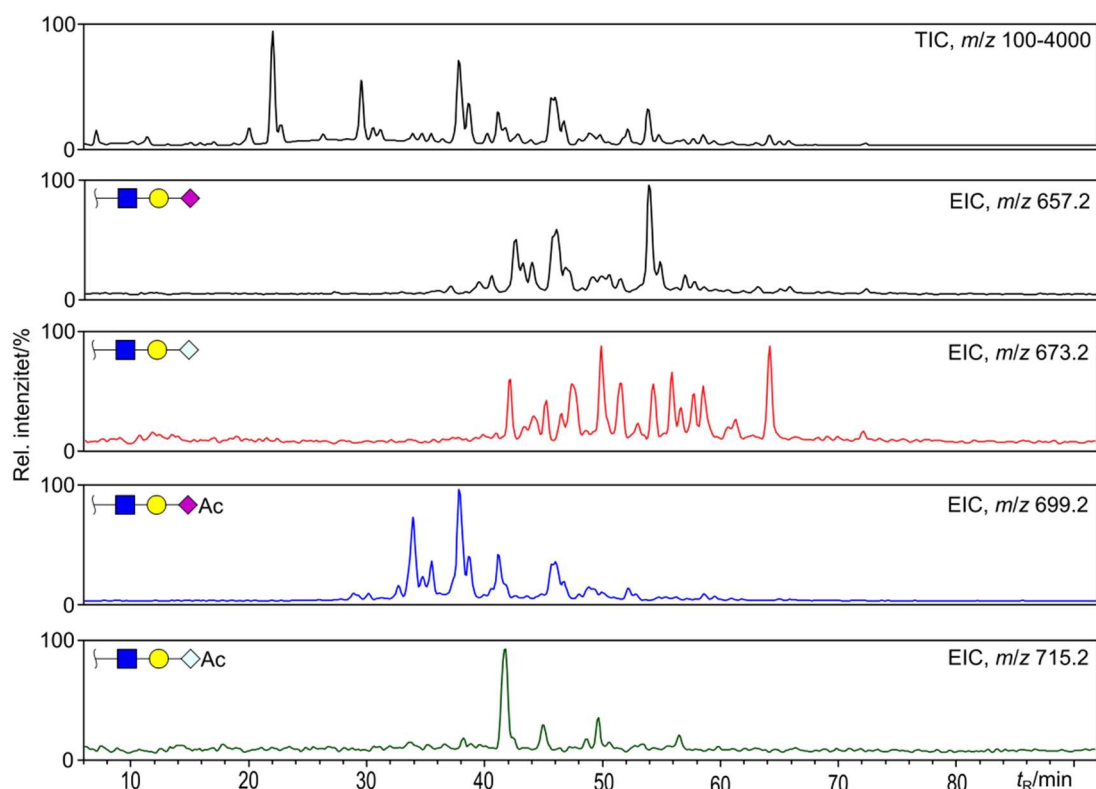
Slika 4.28. Izvedena N-glikanska svojstva ukupnog N-glikoma (3). **S-Neu5Ac** – sijalinizacija s Neu5Ac; **S-Neu5Gc** – sijalinizacija s Neu5Gc; **S-Neu5Ac₂** – sijalinizacija s Neu5Ac₂; **S-Neu5GcAc** – sijalinizacija s Neu5GcAc; **S-O-Ac_{uk}** – ukupan udio sijaliniziranih O-acetiliranih N-glikana; **S-Ac+Gc_{mix}** – udio „miješanih“ N-glikana s različitim Sia; **S-LacNAc** – ukupan udio N-glikana sa sijalil-N-acetil-laktozaminom; **Neu5Gc/Neu5Ac** – omjer udjela N-glikana s Neu5Gc i Neu5Ac.

Ukupna galaktozilacija (G) kompleksih N-glikana iznosi prosječno 3.5 %, a isto tako su udjelima od oko 2.5 %, odnosno 1.1 % slabo zastupljeni mono- (G1) i digalaktozilirani (G2) N-glikani. To indirektno upućuje na visoku sijalinizaciju N-glikana u N-glikomu. Zajedno s agalaktoziliranim (G0) kompleksnim N-glikanima, svi potječu iz neutralne frakcije F1.

Udio N-glikana s *O*-Ac-Sia povećavao se od mono- do tetraanionske frakcije, a u ukupnom N-glikomu čine prosječno 54 % svih određenih struktura. Od toga 50 % otpada na Neu5Ac₂, a 4 % na Neu5GcAc. Sijaloglikana s nemodificiranim Sia je udjelom manje; i to 23 % s Neu5Ac i 10 % s Neu5Gc. Uz to N-glikom sadrži i 5 % „miješanih“ sijaloglikana s dvije različite Sia; što uključuje i *O*-acetilirane i nemodificirane. Da je Neu5Ac udjelom zastupljenija, pokazuje i omjer od Neu5Gc/Neu5Ac od 0.20. Kako je Neu5Gc produkt hidroksilacije Neu5Ac, iz ovoga se omjera može zaključivati o biosintezi Sia u stanicama iz kojih potječu N-glikoproteini krvne plazme, kao i o ekspresiji CMAH u njima. U ovom istraživanju nije određivano jesu li Sia na N-glikanima α2,3- ili α2,6-vezane, već je daljnji naglasak stavljen na analizu pozicijskih izomera *O*-Ac-Sia.

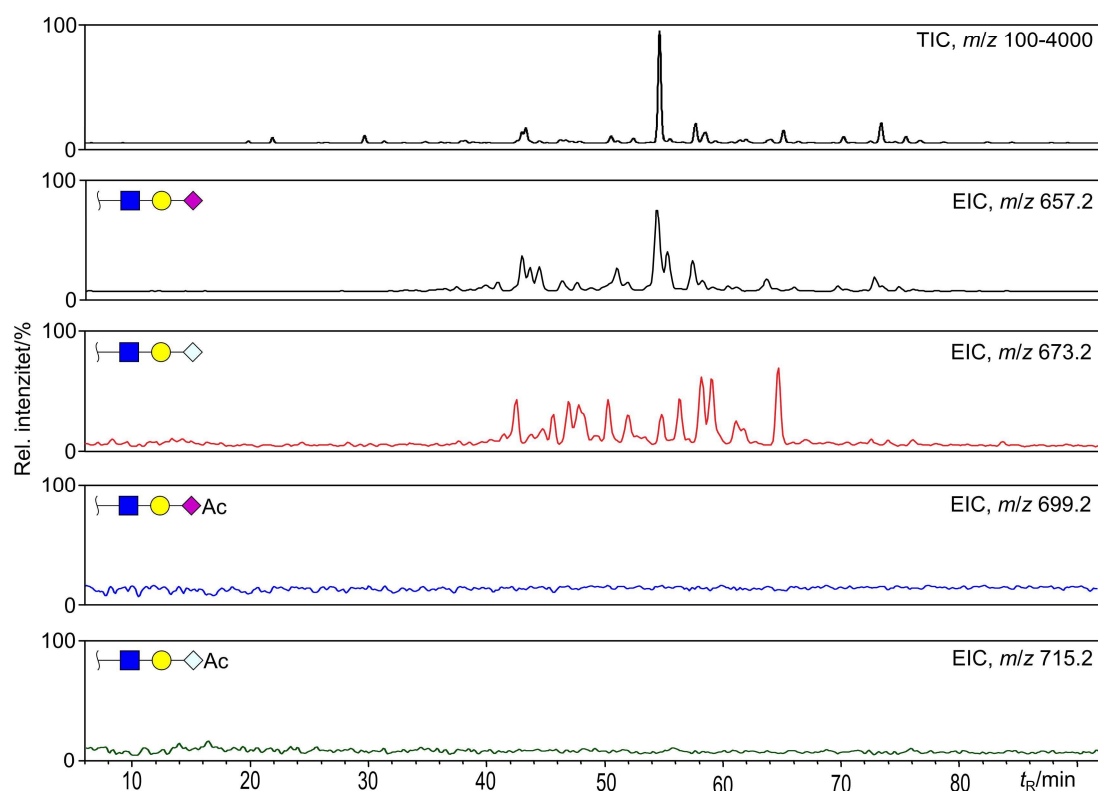
4.2 Određivanje položaja *O*-acetilne skupine u *O*-acetiliranim sijalinskim kiselinama na N-glikanima krvne plazme

Kao potvrdne analize provedene su najprije reakcije de-*O*-acetilacije Sia u baznim uvjetima; prvo na samim N-glikanima derivatiziranim s ProA. Iz kromatograma ukupne ionske struje (engl. *total ion current chromatogram*, TIC) iscrtani su kromatogrami odabranih (engl. *extracted ion chromatogram*, EIC) oksonijevih iona [Neu5Ac/Neu5Gc-Gal-GlcNAc ± Ac]⁺ (Slika 4.29). Nakon de-*O*-acetilacije signali *m/z* 699.2 i *m/z* 715.2 – dijagnostički za Neu5Ac₂ i Neu5GcAc – potpuno nestaju što potvrđuje da su na N-glikanima prisutne *O*-Ac-Sia (Slika 4.30). No, fragmentacijski spektri N-glikana ne daju nikakve informativne fragmentne ione prema kojima bi se mogla utvrditi točna pozicija *O*-acetilne skupine u molekuli Sia. Zato su pripremljeni DMBA- derivati Sia oslobođenih kiselinskom hidrolizom (Slika 4.31) i analizirani pomoću RP-UPLC-FLD-MS/MS. Svi analiti eluiraju s C₁₈ kolone u rasponu *t_R* 13.8-22.7 min, i to hidrofobnije *O*-Ac-Sia kasnije od svojih nemodificiranih hidrofilnijih analoga. Integracijom pikova u kromatogramu fluorescencije određen je i približni relativni udio pojedine Sia. Najzastupljenija Sia u krvnoj plazmi GŠ je Neu5Ac (50.9 %) (Slika 4.32).



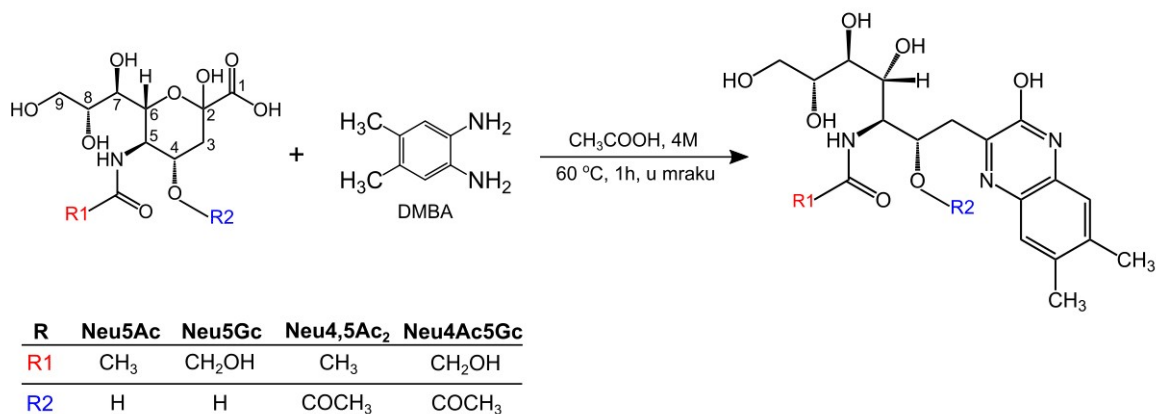
Slika 4.29. Kromatogram ukupne ionske struje (TIC) ProA-derivatiziranih nefracioniranih N-glikana nakon odjeljivanja na HILIC koloni i kromatogrami odabranih oksonijevih iona (EIC) karakterističnih za N-glikane s Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5Ac₂ i Neu5GcAc prije de-O-acetilacije s trietilaminom.

Fragmentacijski spektri za DMBA-Neu5Ac₂ i DMBA-Neu5GcAc interpretirani su prema literaturnim podacima (Baumann i sur., 2015.; Cavdarli i sur., 2019.; Kamerling i Gerwig, 2006.). Svi analiti u spektrima masa opaženi su kao protonirani adukti, [M+H]⁺. Mehanizmi fragmentacije prekursorskih iona za sve ove derivate vrlo su slični. Na primjeru Neu5Ac i Neu5Ac₂, karakteristična je eliminacija acilamida (NHAc), *m/z* 297.1, te dehidratacija, *m/z* 392.2, koja za Neu5Ac₂ na *m/z* 433.9 izostaje uz pojavu neutralnog gubitka HOAc na *m/z* 408.2 (Slika 4.33). Analogno je opaženo i za parove Neu5Gc/Neu4Ac5Gc, [M+H]⁺. Takav obrazac fragmentacije svojstven je samo za 4-O-acetilaciju Sia. Prema tome su sijalinske kiseline na N-glikanima proteina krvne plazme GŠ 4-O-acetilirane i radi se o Neu4,5Ac₂ i Neu4Ac5Gc.

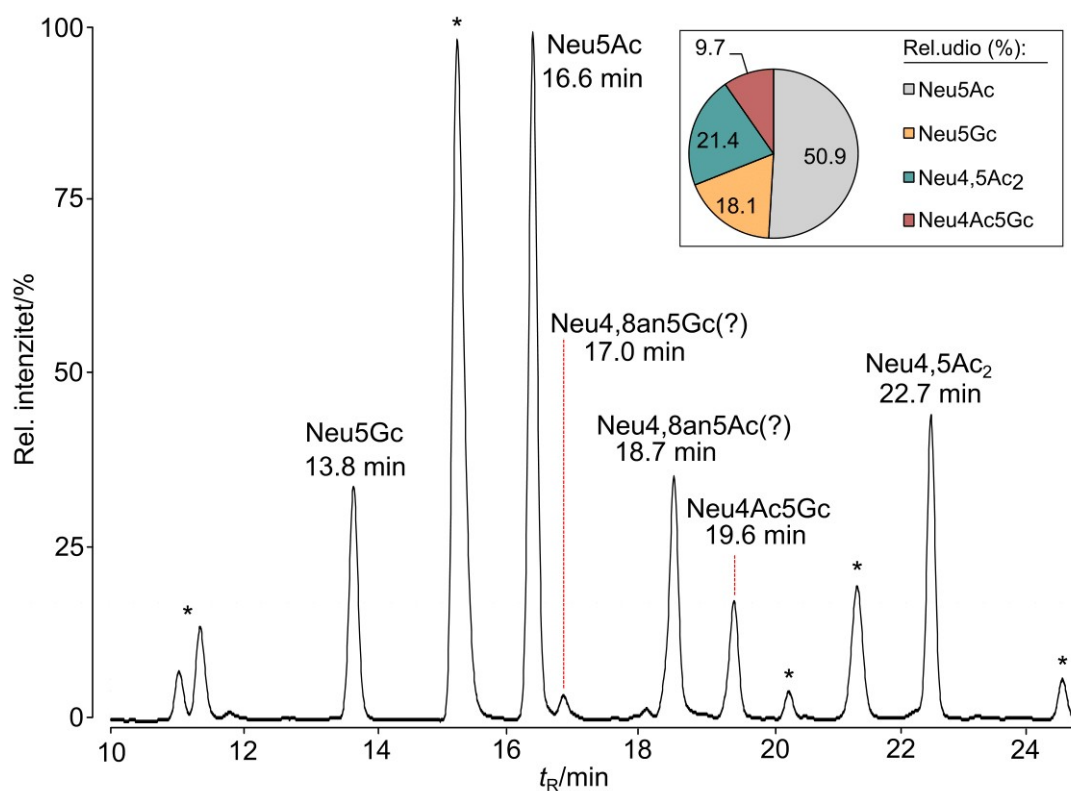


Slika 4.30. Kromatogram ukupne ionske struje (TIC) ProA-derivatiziranih nefrakcioniranih N-glikana nakon odjeljivanja na HILIC koloni i kromatogrami odabranih oksonijevih iona (EIC) karakterističnih za N-glikane s Neu5Ac, Neu5Gc, Neu5Ac₂ i Neu5GcAc **nakon** de-*O*-acetilacije s trietilaminom.

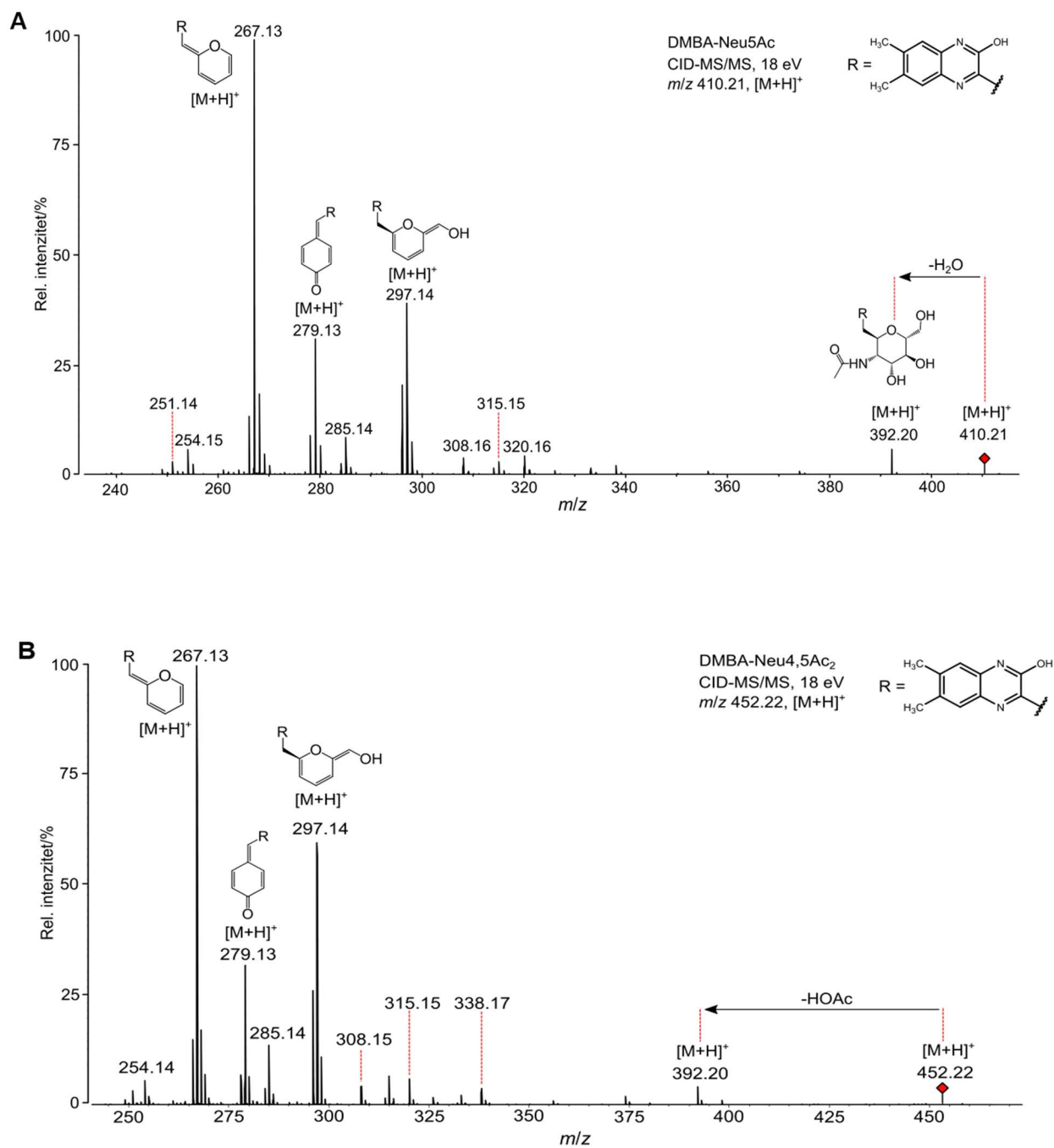
Potvrda *O*-acetilacije oslobođenih Sia provedena je na DMBA-derivatima na jednak način kao i za N-glikane. U kromatogramima fluorescencije i EIC kromatogramima opažen je nakon hidrolize nestanak signala za Neu4,5Ac₂ i Neu4Ac5Gc (Slika 4.34, Slika 4.35).



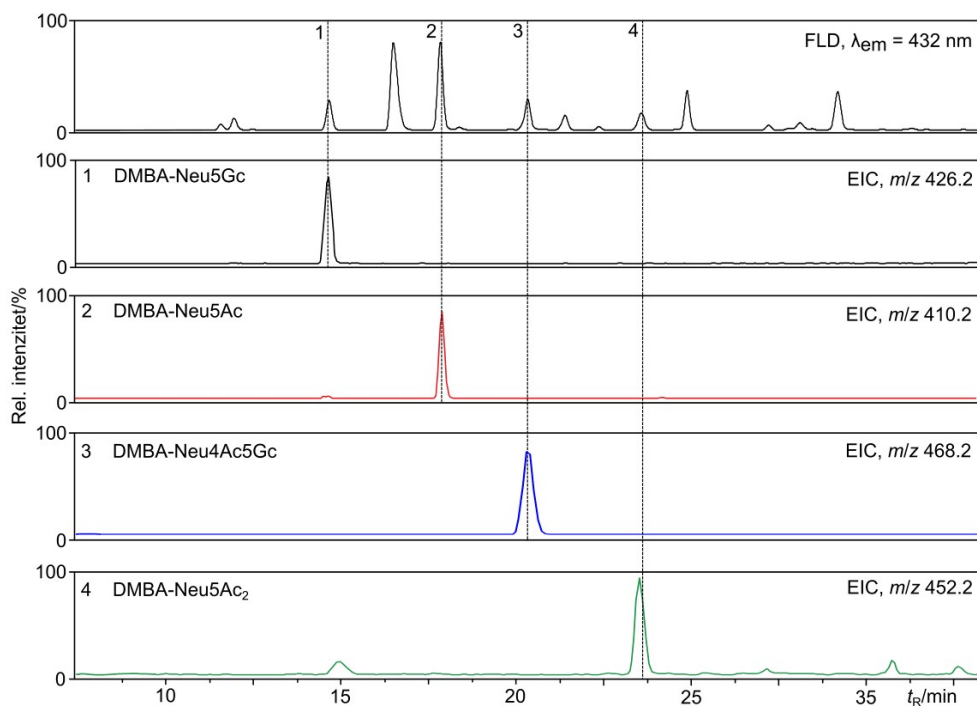
Slika 4.31. Shema reakcije derivatizacije oslobođenih sijalinskih kiselina – Neu5Ac, Neu5Gc, Neu4,5Ac₂ i Neu4Ac5Gc – s 4,5-dimetilbenzen-1,2-diaminom (DMBA).



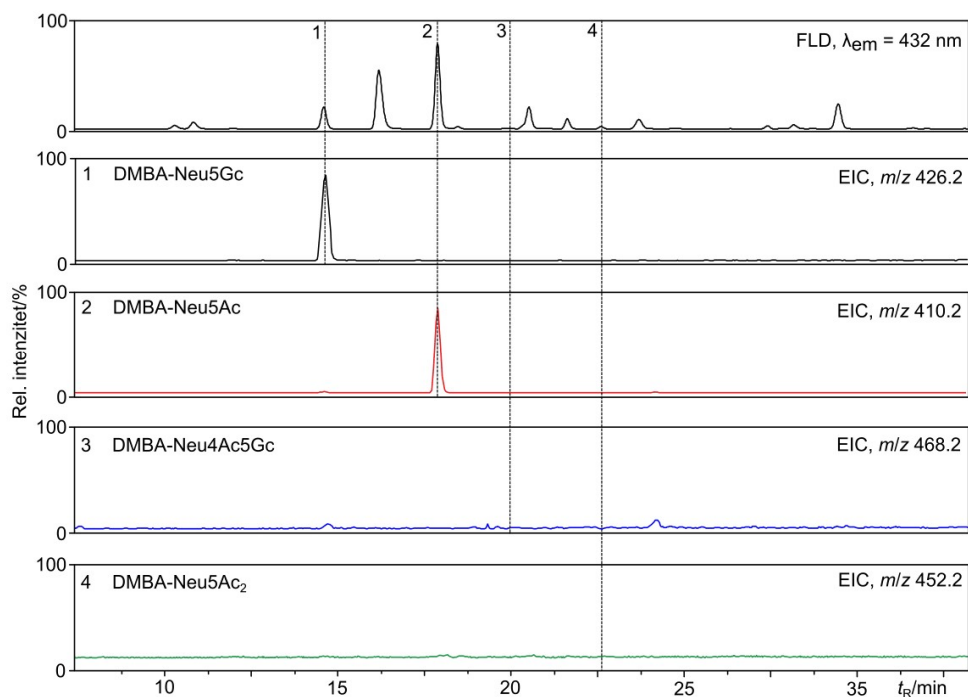
Slika 4.32. Kromatogram oslobođenih derivatiziranih sijalinskih kiselina nakon odjeljivanja na C₁₈ koloni uz detekciju fluorescencije ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 379/432$ nm). Pikovi označeni zvjezdicom (*) nisu uspješno identificirani. Za dva pika (?) je pretpostavljeno da se radi o anhidro-sijalinskim kiselinama. Umetnuti tortni dijagram prikazuje približne relativne udjele pojedinih Sia i njihovih 4-O-Ac-derivata ($n = 1$).



Slika 4.33. Primjeri anotiranih fragmentacijskih spektara DMBA-Neu5Ac (**A**) i DMBA-Neu4,5Ac₂ (**B**). Za 4-*O*-acetilaciju Sia karakterističan je neutralan gubitak molekule HOAc iz prekursorskoga iona, $[M+H-60]^+$, te izostanak $[M+H-18]^+$ koji nastaje neutralnim gubitkom molekule vode.



Slika 4.34. Kromatogram fluorescencije (FLD) i kromatogrami odabranih iona (EIC) DMBA-derivata Neu5Ac (2), Neu5Gc (1), Neu5Ac₂ (4) i Neu5GcAc (3), [M+H]⁺, prije de-O-acetilacije s trietilaminom.



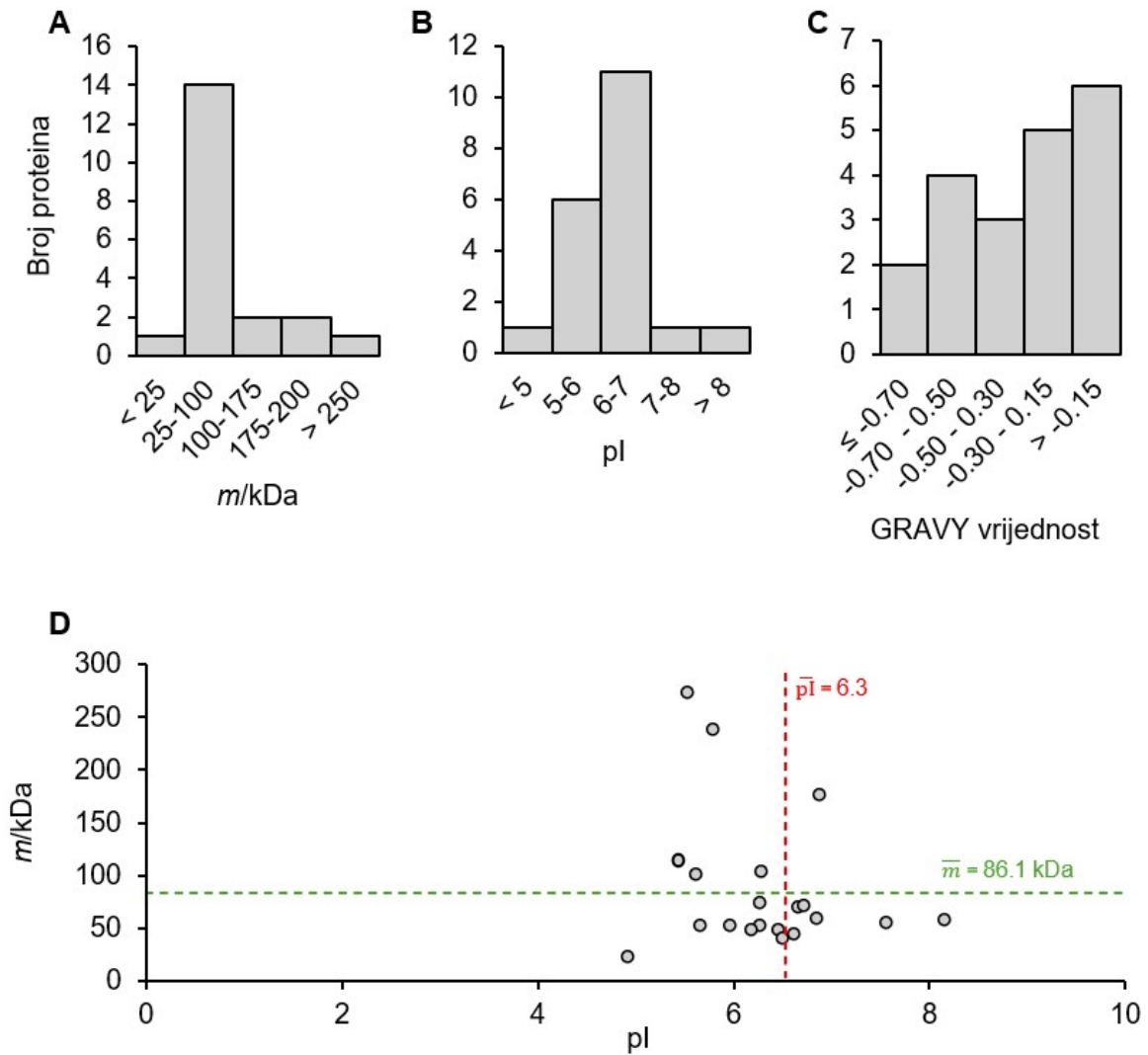
Slika 4.35. Kromatogram fluorescencije (FLD) i kromatogrami odabranih iona (EIC) DMBA-derivata Neu5Ac (2), Neu5Gc (1), Neu5Ac₂ (4) i Neu5GcAc (3), [M+H]⁺, nakon de-O-acetilacije s trietilaminom.

4.3 Analiza ishodišnih proteina s *O*-acetiliranim sijaloglikanima

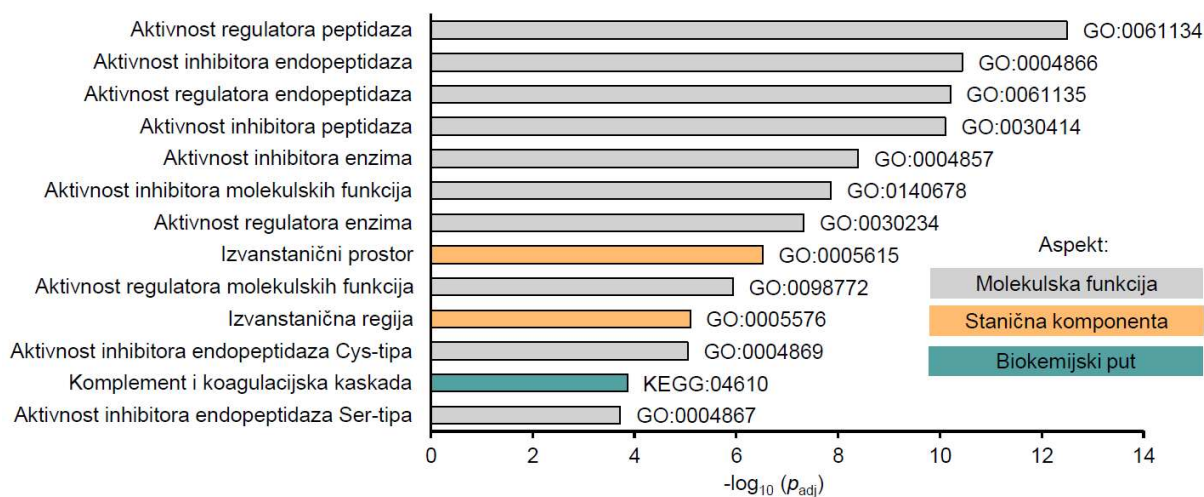
4.3.1 Rezultati neciljane glikoproteomske analize

Kako su se *O*-Ac-Sia izdvojile kao vodeći strukturni motiv N-glikoma krvne plazme GŠ, postavilo se pitanje s kojih proteina potječu *O*-acetilirani sijaloglikani. Neciljanom glikoproteomskom analizom najprije su iz sijaloglikopeptida afinitetno pročišćenih na TiO₂ identificirani proteini sa sijaliniziranim N-glikanima, bez obzira jesu li *O*-acetilirani ili ne. Enzimskom ugradnjom izotopa ¹⁸O u njihova N-glikozilacijska mjesta prilikom deglikozilacije potvrđeno je da su ona doista bila zautzeta sijaloglikanima koji se vežu na površinu TiO₂. Određeno je ukupno 19 takvih glikoproteina (**Prilog 3**). Među njima se po brojnosti izdvajaju inhibitori proteaza: alfa-2-HS-glikoprotein (fetuin-A, α₂-Heremans-Schmidtov glikoprotein, AHSG), alfa-1-antiproteinaza S (α₁-antitripsin, α₁AT), alfa-1-antikimotripsin (SERPINA3, α₁AC), alfa-2-makroglobulin (α₂M), teški lanci H3 i H4 inhibitora inter-alfa-tripsina (ITIH3, ITIH4), C1-inhibitor (C1-inh, SERPING1) i kininogen-1 (KNG1). Drugu skupinu čine faktori zgrušavanja: α- i β-lanac fibrinogena (FGA, FGB), te faktori zgrušavanja V (F5) i XIII (F13A1). Od ostalih glikoproteina određeni su apolipoprotein D (ApoD) koji sudjeluje u metabolizmu lipida, ceruloplazmin (CP); ključan za metabolizam bakra, fibronektin (FN1); protein izvanstaničnog matriksa i C-regija teškog lanca antitijela IgM; antitijela akutne faze. Preostali glikoproteini su pankreatska α-amilaza, inhibitor karbonatne dehidrataze i fosfatidilkolin-sterol *O*-aciltransferaza.

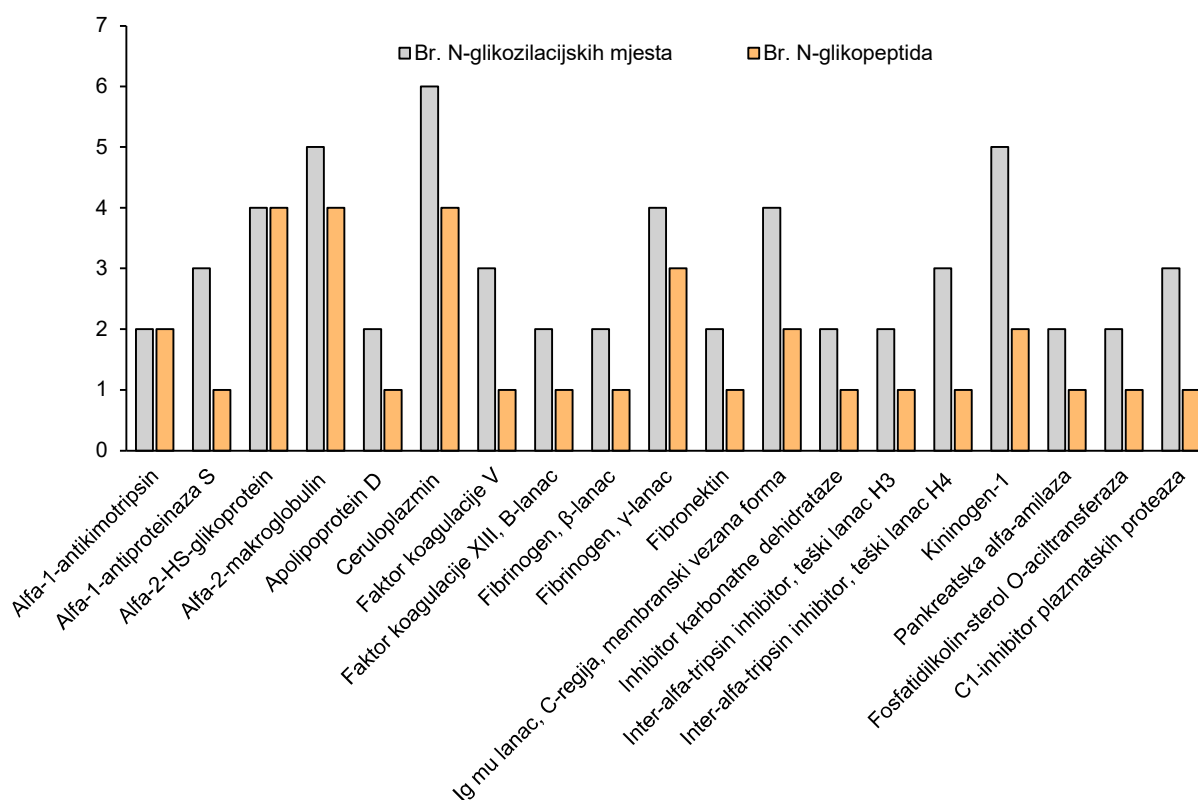
Na svim određenim glikoproteinima N-glikani zauzimaju ukupno 58 N-glikozilacijskih mjesta. Najviše ih je na CP, α₂M i KNG1. Za većinu glikoproteina određeno je da imaju po dva N-glikozilacijska mjesta, a samo KNG1 ih ima šest. Broj određenih glikopeptida za svaki protein razlikuje se od broja N-glikozilacijskih mjesta ukoliko ih je na jednom triptičkom glikopeptidu više (**Slika 4.38**).



Slika 4.36. Svojstva ishodišnih proteina N-glikoziliranih sijaloglikanima određenih neciljanom glikoproteomskom analizom. Raspodjele molekulske mase, izoelektrične točke i GRAVY vrijednosti prikazane su histogramima (A-C). Grafikon (D) prikazuje odnos izoelektrične točke i molekulske mase s njihovim prosječnim vrijednostima (iscrtkane linije). Svaka točka predstavlja jedan protein. Tablica s popisom pojedinačnih proteina navedena je u **Prilogu 3**.



Slika 4.37. Rezultati analize obogaćivanja genske ontologije za proteine određene neciljanom glikoproteomskom analizom i njihovi funkcionalni aspekti. Kao statistički značajne uzete su vrijednosti s $p < 0.01$.



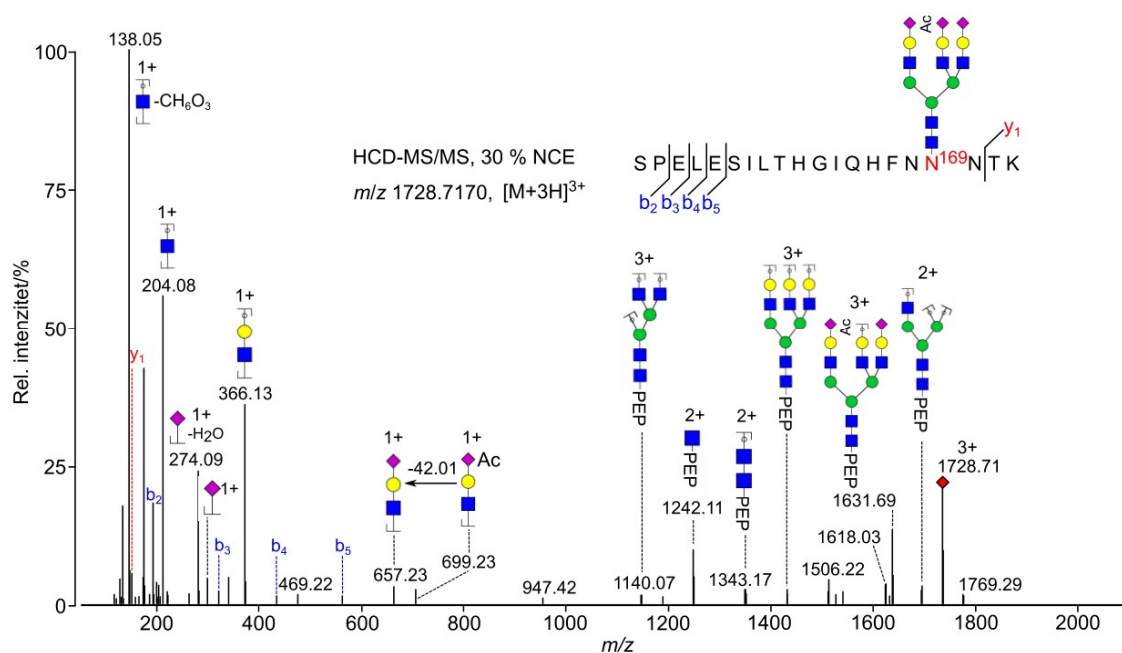
Slika 4.38. Broj glikopeptida i glikozilacijskih mjesta zauzetih sijaloglikanima određenih za pojedini glikoprotein neciljanom glikoproteomskom analizom. Tablica s popisom i svojstvima pojedinačnih proteina navedena je u **Prilogu 3**.

Osnovna fizikalno-kemijska svojstva ukazuju da se radi o glikoproteinima molekulske mase 21-272 kDa (**Prilog 3**), među kojima su najzastupljeniji oni u rasponu 25-100 kDa (**Slika 4.36A, D**). Srednja vrijednost teorijske pI je 6.3, a za većinu glikoproteina u rasponu je 5-7 (**Slika 4.36B, D**). GRAVY vrijednost za sve određene glikoproteine je negativna, s prosjekom -0.34, i rasponom -0.73 do -0.015 (**Slika 4.36C**). Vrijednosti GRAVY < 0 ukazuju na hidrofilne proteine.

Na temelju analize obogaćivanja genske ontologije glikoproteini su funkcionalno klasificirani (**Prilog 4**). Za aspekt molekulske funkcije najzastupljeniji su proteini vezani uz aktivnost regulacije ili inhibicije peptidaza ili endopeptidaza, te općenito uz aktivnost regulacije i inhibicije enzima. Obzirom na aspekt stanične komponente, statistički značajno su zastupljeni proteini izvanstaničnog prostora, odnosno regije. To također upućuje da se radi o sekretornim proteinima što proteini krvne plazme i jesu. U skupu određenih glikoproteina su zastupljeni faktori zgrušavanja, pa je posljedično u terminima genske ontologije obogaćen i biokemijski put komplementa i koagulacijske kaskade (KEGG: 04610) (**Slika 4.37**).

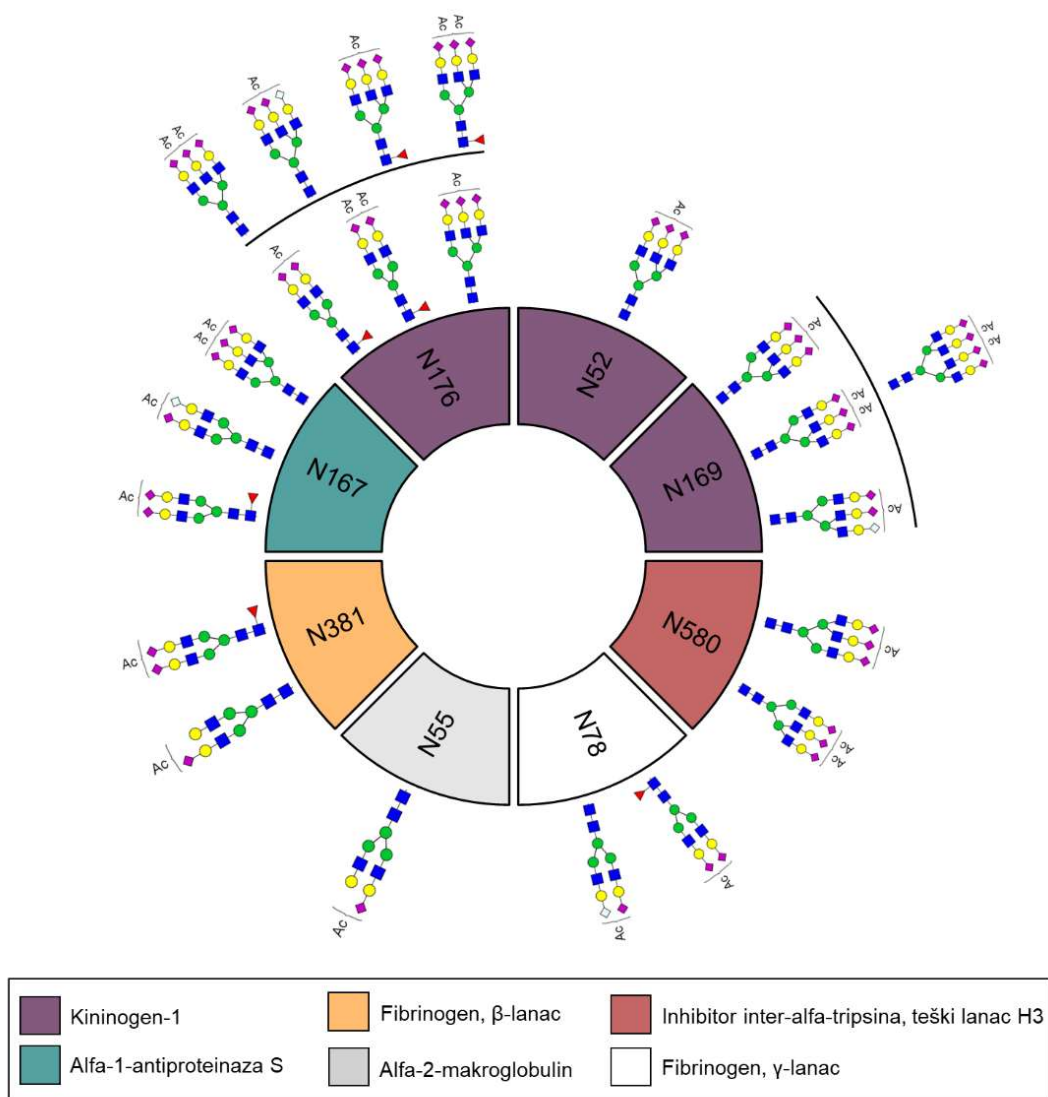
4.3.2 Rezultati ciljane glikoproteomske analize

Neciljani pristup ne pruža uvid u N-glikanske strukture već samo identificira njima zauzeta N-glikozilacijska mjesta. Afinitetno pročišćavanje na TiO₂ također nije selektivno za *O*-Ac-Sia već i za nemodificirane Sia. Stoga su u sljedećem koraku istraživanja strukturnom glikoproteomskom analizom otkriveni glikoproteini doista modificirani *O*-acetiliranim sijaloglikanima. Triptički glikopeptidi za ovu analizu nisu deglikozilirani pa je u fragmentacijskim spektrima dobivena i peptidna i glikanska sekvenca. *O*-acetilacija Sia potvrđena je prisutnošću istih dijagnostičkih oksonijevih iona kao i kod oslobođenih N-glikana (**Slika 4.39**). Fragmentacijski spektri nisu interpretirani ručno već automatski, pomoću računalnog programa Glyco-Decipher. Određeno je ukupno šest najzastupljenijih glikoproteina s *O*-acetiliranim sijaloglikanima: KNG1, α_1 AT, FGB, α_2 M, ITIH3 i γ -lanac fibrinogena (FGG) (**Prilog 5**). Za KNG1 određena su tri N-glikozilacijska mjesta, a za ostale proteine po jedno. Ujedno je KNG1 imao i najveću strukturnu raznolikost *O*-Ac sijaloglikana; ukupno osam različitih struktura, i to najviše na N176 i N169 (**Slika 4.40**).



Slika 4.39. Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra triptičkog glikopeptida iz kininogena-1 s triantenarnim *O*-acetiliranim N-glikanom sastava H6N5S2S-Ac1. Fragmentni ioni *b*- i *y*-serije peptidne okosnice označeni su u spektru slovima, a N-glikanski fragmenti grafički. **PEP** – peptid, **NCE** – normalizirana kolizijska energija.

Prema antenarnosti, to su dva diantenara, pet triantenara i jedan tetraantenar. Polovica određenih struktura su sržno fukozilirane, a sijalinizirane su s Neu5Ac i Neu5Ac₂. Neu5GcAc prisutna je samo na dva „miješana“ sijalinizirana N-glikana s KNG1, α_1 AT i FGG. Najmanja strukturalna raznolikost; jedan N-glikan sastava H5N4S-Ac1, utvrđena je na N-glikozilacijskom mjestu N55 u α_2 M.



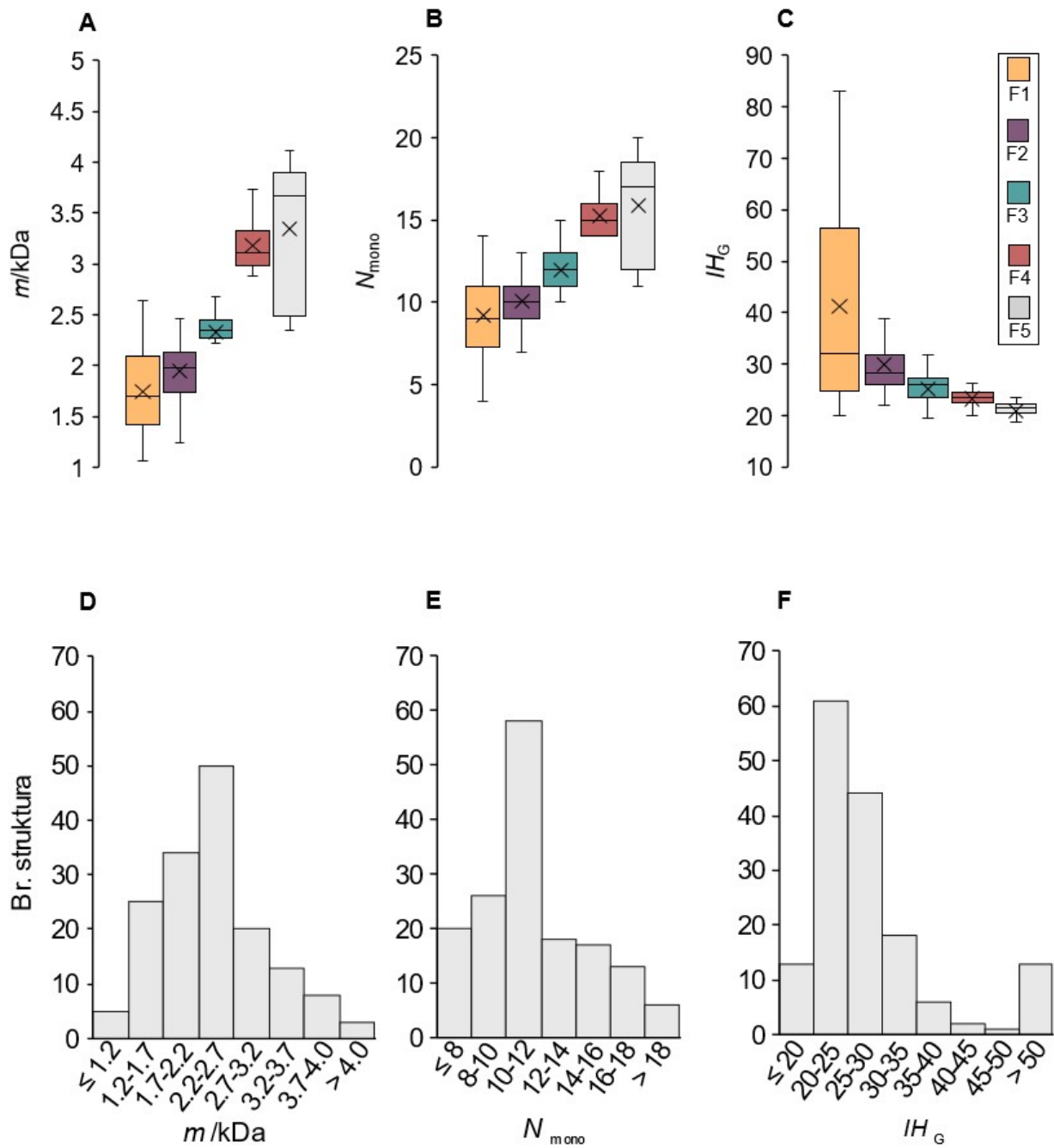
Slika 4.40. N-glikani sa *O*-Ac-Sia na pojedinim glikozilacijskim mjestima (N) svojih ishodišnih glikoproteina određeni ciljanom (strukturnom) glikoproteomskom analizom. Slika slijedi podatke prikazane tablično u **Prilogu 5** gdje su navedene pojedine aminokiselinske sekvence i sastav N-glikana.

4.4 N-glikanski kemijski prostor proteina krvne plazme

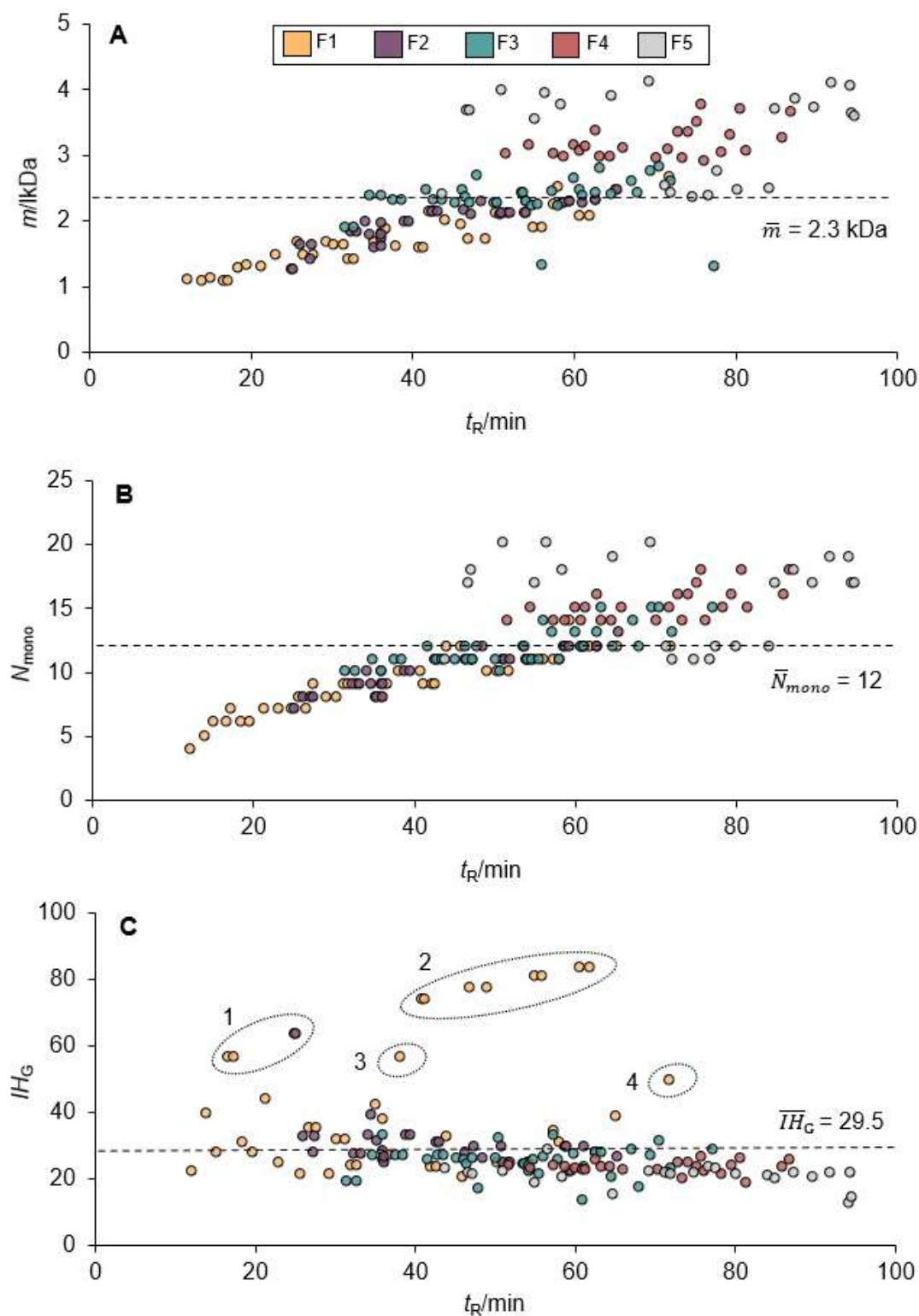
N-glikanski kemijski prostor N-glikoma krvne plazme GŠ opisan je s tri deskriptora: 1) molekulskom masom (m), 2) brojem monosaharida (N_{mono}) i 3) novopredloženim indeksom hidrofobnosti (IH_G) pojedinog N-glikana. Prema molekulskoj masi, najmanji N-glikan prisutan je u neutralnoj frakciji F1 (1.05 kDa), a najveći u tetraanionskoj frakciji F5 (4.11 kDa) u kojoj je i raspon vrijednosti najveći jer uz velike tetraantenare sadrži i manje sulfatirane diantenare. Opći trend pokazuje porast prosječne vrijednosti molekulske mase N-glikana od F1 prema F5 i slijedi porast izvedenog N-glikanskog svojstva VGr. (**Slika 4.41A**). Većina N-glikana u N-glikomu pripada skupini s molekulskom masom 1.2-3.2 kDa (**Slika 4.41D**).

Ukupan najmanji broj monosaharida je u paucimanoznim N-glikanima u F1 i iznosi šest do sedam, a najveći u tetrasijaliniziranim tetraantenarima u F5 sa 17-20 monosaharida. Prosječna vrijednost i ovdje raste od F1 prema F5 jer prati porast molekulske mase. Raspon vrijednosti je ponovno najveći za frakciju F5 koja sadrži veliku udio manjih diantenara. Gotovo 60 struktura pripada kategoriji s 10-12 monosaharida, koliko iznosi i prosječan broj za ukupan N-glikom (**Slika 4.41B, E**). Oba parametra, m i N_{mono} , vrlo slično utječu na retentivnost N-glikana na HILIC nepokretnoj fazi i prate raspone vremena zadržavanja u kromatogramima pojedinih frakcija (**Slika 4.42A, B i Slike 4.2, 4.8, 4.12, 4.17, 4.22**).

Indeks hidrofobnosti veće je vrijednosti za hidrofobnije, a manje za hidrofilnije N-glikane. Najveće vrijednosti i ujedno najveći raspon određeni su za neutralne N-glikane u F1 s prosječnim $IH_G \sim 40$. Maksimalne vrijednosti IH_G u toj frakciji dosežu 83.1. To znatno odstupa od prosječnog IH_G ukupnog N-glikoma koji iznosi 29.5, kao i od činjenice da većina N-glikana pripada kategoriji IH_G 20-30. (**Slika 4.41C, F**). Ti vrlo hidrofobni N-glikani su visokomanozni, hibridni i α 1,3-galaktozilirani i pripadaju kategoriji $IH_G > 50$. Ostali N-glikani imaju ujednačenu vrijednost IH_G čije smanjenje, tj. sve veća hidrofilnost, prati porast kromatografske retentivnosti (**Slika 4.42C, 1-4**). Najhidrofilniji N-glikani su ujedno oni s najvećim brojem Sia iz F4 i F5, a strukture s Neu5Gc hidrofilnije su od onih s Neu5Ac. Prisutnost *O*-acetilnih skupina na obje Sia povećava hidrofobnost, a ovisno o njihovom broju taj je odnos linearan (**Prilog 6**).



Slika 4.41. Molekulska masa (A), broj monosaharida u N-glikanu (B) i indeks hidrofobnosti N-glikana (C) u N-glikomu krvne plazme GŠ prikazani kutijastim dijagramima za pojedinačne frakcije F1-F5. Histogrami prikazuju raspodjelu vrijednosti za ukupan N-glikom, tj. u svim frakcijama zajedno (D-F).



Slika 4.42. Molekulska masa (A), ukupan broj monosaharida (B) i indeks hidrofobnosti N-glikana (C) u N-glikomu krvne plazme GŠ prikazani u odnosu na vrijeme zadržavanja za frakcije F1-F5. Jedna točka predstavlja jedan N-glikan. **1** – $\text{Man}_{4-5}\text{GlcNAc}_2$; **2** – $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$; **3** – hibridni N-glikan F1-GP24, **4** – N-glikan F1-GP46 s $3 \times \alpha\text{-Gal}$ epitopa.

5. RASPRAVA

5.1 Sastav i strukturna obilježja N-glikoma krvne plazme

U ovom istraživanju strukturnom analizom N-glikoma krvne plazme GŠ određeno je ukupno 160 različitih N-glikana i njihovi relativni udjeli. Time je potvrđen prvi dio postavljene deskriptivne hipoteze prema kojoj su proteini krvne plazme GŠ N-glikozilirani. To je u skladu s činjenicom da je proces N-glikozilacije u eukariota evolucijski visoko očuvan; posebno u proteina sklonih pogrešnom smatanju (Duran-Romaña i sur., 2024.). Proteini s N-glikoziliranim Asn evoluiraju sporije od neglikoziliranih, a time je istovremeno evolucijski očuvan i aminokiselinski sekvon Asn-X-Ser/Thr ($X \neq \text{Pro}$), te zajednička pentasaharidna srž N-glikana (Toustou i sur., 2022.). S funkcionalnog aspekta, pokazano je da su N-glikozilirani Asn gotovo uvijek dostupni otapalu (engl. *solvent accessibility*), a neglikozilirani Asn u istom sekvonu nisu pa se stoga uzima da N-glikani koji ih zauzimaju nužno moraju imati ulogu u međumolekulskim interakcijama (Park i Zhang, 2011.). Zbog visokog selekcijskog pritiska su i cijeli N-glikoproteomi u različitim filogenetskim skupinama bolje očuvani od svojih podležećih, nemodificiranih proteoma (Zielinska i sur., 2012.).

Ukupan broj N-glikana u N-glikomu krvne plazme je konačan, ali teško odrediv i usporediv s drugim podacima zbog različitih glikoanalitičkih metoda i velikog dinamičkog raspona koncentracija glikoproteina. Pristupom 2D-LC-MS postignuto je zadovoljavajuće kromatografsko odjeljivanje vrlo složene smjese derivatiziranih N-glikana; najprije prema naboju, a zatim prema hidrofobnosti. Takva metodologija standardna je za dubinske, sveobuhvatne analize N-glikoma ili za nepoznate uzorke. Primjenjivana je i za analizu N-glikana ljudskog seruma kojom je određeno 212 N-glikana uključujući strukturne izomere te rijetke sulfatirane i *O*-acetilirane strukture (Smith i sur., 2021.). Reiding i sur. (2016.) odredili su N-glikomu mišje krvne plazme 56 N-glikana, uključujući derivatizaciju α 2,3- i α 2,6-vezanih Sia, a Otaki i sur. (2022.) 25 N-glikana u serumu kao dio atlasa N-glikozilacije različitih tkiva. U N-glikomu krvnog seruma štakora, Gao i sur. (2015.) su strukturnom analizom odredili 282 N-glikana koristeći vrlo osjetljivu tehniku kromatografije na fluidičkom mikročipu s PGC kao nepokretnom fazom koja omogućuje dobro odjeljivanje izomera. Za N-glikom GŠ strukturni izomeri poput pozicije Gal na Man α 1,3/6 anteni ili α 2,3/6 glikozidne veze Sia nisu određivani.

5.1.1 N-glikomi krvne plazme štakora, miša i golokrtičastog štakora se razlikuju

5.1.1.1 Brojnost i grananje N-glikana

Sama brojnost struktura u N-glikomima nije biološki značajna, već su to strukturni motivi N-glikana i njihovi udjeli. N-glikomi krvne plazme ili seruma miša i štakora su dobro istraženi (Gao i sur., 2015.; Reiding i sur., 2016.; Stadlmann i sur., 2024.) i dijele s N-glikomom krvne plazme GŠ određene sličnosti i razlike. Iako su u tim istraživanjima korištene različite metodologije, podaci su u velikoj mjeri usporedivi. Prema tipu N-glikana, mišji serum sadrži 93.9 % kompleksnih, 3.2 % visokomanoznih i 2.8 % hibridnih N-glikana (Otaki i sur., 2022.). U N-glikomu štakorskog seruma također je ~ 95 % kompleksnih te po ~ 2.5 % hibridnih i visokomanoznih N-glikana (Adeniyi i sur., 2024.; Gao i sur., 2015.). U slučaju GŠ, kompleksnih N-glikana je manje, 88.7 %, a visokomanoznih gotovo 11 %. Uz to, u slučaju miša utvrđeno je da postoje i razlike između različitih sojeva i spolova (Reiding i sur., 2016.), što za GŠ u ovom istraživanju nije uzeto u obzir. Udjeli pojedinih tipova N-glikana indirektno ukazuju na obradu N-glikana u ER i GA te na aktivnost glikozidaza i glikoziltransferaza. Kako glikomski pristup ne uzima u obzir ishodišne proteine već ukupne N-glikane oslobođene s njih, nije moguće lokalizirati stanice u kojima se sintetiziraju proteini krvne plazme glikozilirani manje obrađenim N-glikanima.

Prema antenarnosti, u mišjem serumu najzastupljeniji su diantenari s 91.4 %, zatim monoantenari, 3.3 %, dok preostali udio čine tri- i tetraantenari (Otaki i sur., 2022.). Za N-glikom štakorskog seruma autori navode ~ 95 % diantenara i ~ 5 % monoantenara, dok tri- i tetraantenari zajedno čine < 0.1 % relativnog udjela. Uz to navode i identificiranih dvadesetak sijaliniziranih triantenarnih i šest tetraantenarnih N-glikana (Gao i sur., 2015.). Kako su analizu proveli samo pretragom spektara masa prema unaprijed, iz sastava N-glikana izračunatih očekivanih m/z vrijednosti, nedostaje točna potvrda struktura na temelju MS/MS spektara. Za N-glikom krvne plazme GŠ, udio diantenara je znatno niži, 76.2 %, praćen sličnim ukupnim udjelom N-glikana niskog stupnja grananja (NGr) od 77 %. Udio triantenara i prateće izvedeno N-glikansko svojstvo VGr su za GŠ vrlo visoki; 11.6 % i 13 %, uz podjednako nizak udio tetraantenara kod sva tri N-glikoma (< 1 %).

U N-glikomu ljudske krvne plazme tri- i tetraantenari potječu pretežno s proteina akutne faze; AGP, KNG1 i histidinom bogatog glikoproteina (engl. *histidine-rich glycoprotein*, HRG) važnog za angiogenezu i zgrušavanje krvi (Clerc i sur., 2016.). Za KNG1 iz krvne plazme GŠ su upravo takvi N-glikani potvrđeni strukturnom glikoproteomskom analizom (**Slika 4.40**).

5.1.1.2 Rasijecanje N-glikana

Grananje N-glikana u višeantenne strukture biosintetski je vezano uz rasijecajući GlcNAc čiji transfer na β 1,4-vezanu sržnu Man, kataliziran s MGAT3, najčešće blokira taj proces (**Slika 2.4**). Udio N-glikana s rasijecajućim GlcNAc u N-glikomu krvne plazme GŠ je vrlo nizak, oko 0.23 %, i to samo uz prisutnost u neutralnoj N-glikanskoj frakciji. Stoga ukupan udio ovakvih struktura (izvedeno N-glikansko svojstvo R) za ukupan N-glikom nije ni izračunavan, no upućuje na vrlo slabu aktivnost ovog enzima u GŠ. U slučaju mišjeg seruma, udio rasječenih sržno fukoziliranih diantenara također je općenito nizak; prosječno 0.74 % u mužjaka i 0.14 % u ženki četiri različita soja (Reiding i sur., 2016.). Gao i sur. (2015.) u svom istraživanju uopće ne navode prisutnost rasječenih N-glikana u N-glikomu štakorskog seruma. Naime, bez fragmentacijskih spektara nije moguće utvrditi razliku između, primjerice, diantenara s rasijecajućim GlcNAc i triantenara sastava H3N5 (F1-GP13/GP16) jer se radi o izobarnim strukturama. U ljudskoj krvnoj plazmi glavni ishodišni proteini N-glikana s rasijecajućim GlcNAc su antitijela IgM i IgG (Clerc i sur., 2016.). Ranija istraživanja navodila su kako N-glikom mišjeg IgG uopće ne sadrži rasječene N-glikane (Raju i sur., 2000.), što je kasnije opovrgnuto (de Haan i sur., 2017.; Krištić i sur., 2018.), a njihova prisutnost potvrđena je i na štakorskom IgG (Habazin i sur., 2021.). Stoga je moguće da su i u slučaju GŠ antitijela iz krvne plazme glikozilirana ovakvim N-glikanima.

5.1.1.3 Fukozilacija N-glikana

Fukozilacija N-glikana je za N-glikom krvne plazme GŠ promatrana kao sržna (SF) i antenarna (AntF), a preostali su afukozilirani N-glikani (AF). Za GŠ, izvedeno N-glikansko svojstvo AF je 67 %, SF 32 %, dok je AntF ~ 3 %. U N-glikomu krvnog seruma miša ukupna fukozilacija iznosi 10-50 %, općenito je povišena kod ženki i ovisna o soju te za soj Swiss Webster u nekih jedinki prelazi 50 %. U istom istraživanju Reiding i sur. (2016.) ne navode prisutnost antenarne fukozilacije.

Kako je za analizu korištena tehnika MALDI-MS, autori nisu mogli provesti fragmentaciju i razlikovati izobarne N-glikane. Otaki i sur. (2022.) za mišji serum navode udjele od ~ 50 % i 49 % za afukozilirane i monofukozilirane N-glikane, dok ostatak otpada na difukozilirane N-glikane i to ne u serumu već u tkivu bubrega. Nadalje, u N-glikomu štakorskog seruma ukupna afukozilacija je oko 75 % (Gao i sur., 2015.) što je prema udjelu bliže vrijednostima za GŠ. Načini izračunavanja izvedenih N-glikanskih svojstava nisu strogo definirani pa su Adeniyi i sur. (2024.) za N-glikom štakorskog seruma naveli ukupnu fukozilaciju od ~ 50 % i „sijalofukozilaciju“ (sijalinizirane fukozilirane N-glikane) od ~ 25 %. Strukture s antenarnom (α 1,3-vezanom) fukozom su u N-glikomu GŠ identificirane samo na neutralnim N-glikanima (**Slika 4.2**). U N-glikomu ljudske krvne plazme antenarna fukozilacija javlja se na tri- i tetraantenarima i to češće na antenama s α 2,3-vezanim Sia. Tako se formira tetrasaharidni epitop sijalil-Lewis^X (sLeX), a N-glikani koji ga posjeduju potječu pretežno s AGP (Clerc i sur., 2016.). Iako se antenarna fukozilacija identificira prema dijagnostičkom oksonijevu ionu m/z 512.2, lako se može zamijeniti sa sijalinizacijom jer su kombinacije monosaharida Hex1Neu5Ac1-R i Fuc1Neu5Gc1-R, izobarne, a Neu5Ac1-R i Fuc2-R gotovo izobarne ($\Delta m = 1.0$ Da).

5.1.1.4 Sulfatacija N-glikana

Sulfatirani N-glikani u N-glikomu krvne plazme GŠ zastupljeni su ukupnim udjelom (Sulf) od 0.35 %. Sulfatacija kao postglikozilacijska modifikacija N- i O-glikana i proteoglikana se odvija u GA transferom sulfatne skupine s 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfata (PAPS) na supstrate GlcNAc, GalNAc, Gal ili Man posredstvom sulfotferaza (Honke i Taniguchi, 2002.). N-glikani su sulfatirani na C-3 i C-6 Gal, ili C-6 GlcNAc, široko su rasprostranjeni i sudjeluju u procesima biološkog prepoznavanja putem glikan-protein interakcija (Huang i sur., 2024.). 6-O sulfatacija GlcNAc je najčešća i katalizirana je GlcNAc-6-O-sulfotferazom 1 (Huang i sur., 2022.). Otkriveni su primjerice na ljudskom antitijelu IgG (Wang i sur., 2017.) i u N-glikomu krvnog seruma (Feleke i sur., 2024.) te imaju biomarkerski potencijal za autoimune bolesti i rak. Sulfatirani N-glikani otkriveni su i u mijelinu mišjeg perifernog živčanog sustava (Yoshimura i sur., 2017.), ali u N-glikomima krvne plazme miša i drugih glodavaca do sada nisu opisani. Ishodišni proteini za devet sulfatiranih N-glikana iz anionskih frakcija F3 i F5 u N-glikomu krvne plazme GŠ (**Slika 4.12**, **Slika 4.22**) nisu određivani pa nije moguće niti pretpostavljati o njihovoj ulozi.

Takve strukture redovito su prisutne u vrlo niskim udjelima, a labilnost i negativni naboj sulfatne skupine otežava pripremu uzoraka i analizu; posebno ako su prisutne i gotovo izobarne fosfatne skupine ($\Delta m = 0.0095$ Da). Zato analitičke tehnike u sulfoglikomici zahtijevaju veće količine uzorka i složene protokole koji uključuju pročišćavanje sulfatiranih glikana na ionskim izmjenjivačima, derivatizaciju putem permetilacije i znanja za interpretaciju spektara masa (Kenny i sur., 2011.).

5.1.1.5 Galaktozilacija i α -Gal epitop N-glikana

Udio agalaktoziliranih kompleksnih N-glikana (G0) je vrlo nizak, ~ 1.2 %, a isto tako i galaktoziliranih (G), s ukupnim prosječnim udjelom od ~ 3.5 %. Od galaktoziliranih strukturnih motiva izdvaja se α -1,3 galaktozilacija koja je potvrđena na N-glikanima mišjeg antitijela IgG (de Haan i sur., 2017.), no ne i u N-glikomima krvne plazme ili seruma miša i štakora. Epitop α -Gal (Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R) zbog mutacije gena *GGT1* i neaktivnosti α -galaktoziltransferaze nije prisutan na glikanima ljudskih glikoproteina. Zbog toga je imunogen i na njega reagiraju anti- α -Gal antitijela što onemogućava ksenotransplantaciju ali je i uzrok alergija na meso, mlijeko ili ugriz krpelja pod skupnim nazivom α -Gal sindroma (Galili, 2005.). Nadalje, α -Gal epitop nije prisutan u čovjekolikih i majmuna Starog svijeta no kod svih ostalih sisavaca jest. Ovim istraživanjem potvrđen je i na N-glikanima GŠ, a preostaje otkriti koji su mu ishodišni proteini.

5.1.1.6 Sijalinizacija N-glikana

Galaktozilirani N-glikani su supstrat za daljnju sijalinizaciju koja u N-glikomu krvne plazme GŠ prelazi 90 % i uključuje N-glikane s Neu5Ac, Neu5Gc, Neu4,5Ac₂ i Neu4Ac5Gc. Od toga udjela 54 % sijaliniziranih N-glikana je i *O*-acetilirano (S-*O*-Ac_{uk}), a oko 5 % su „miješane“ strukture s dvije različite Sia za koje se ovdje predlaže novi naziv ***heterosijalinizirani N-glikani***. Četiri heterosijalinizirana N-glikana opisana su i u N-glikomu štakorskog seruma (Gao i sur., 2015.) te jedan u mišjem (Chaze i sur., 2013.). Ukupna sijalinizacija N-glikoma štakorskog seruma iznosi ~ 80 % (Gao i sur., 2015.), a mišjeg ~ 65 - 80 % (Otaki i sur., 2022.; Stadlmann i sur., 2024.). Reiding i sur. (2016.) su izračunavali izvedena N-glikanska svojstva drugačije i uz razlikovanje derivatiziranih α 2,3/6-vezanih Sia pa podaci nisu usporedivi.

Dodatan uzrok opaženih razlika su soj, dob i spol kao i različite analitičke metodologije. N-glikomi krvne plazme GŠ i štakora sadrže i Neu5Ac i Neu5Gc s omjerom relativnih udjela N-glikana koji ih sadrže 80:20 (Gao i sur., 2015.). To ih izdvaja od mišjeg N-glikoma u kojem je prisutna gotovo isključivo Neu5Gc, dok je Neu5Ac prisutna tek u tragovima s udjelom ~ 0.05 % (Hua i sur., 2013.; Raju i sur., 2000.). Sijalinizacija u N-glikomu ljudske krvne plazme kreće se u rasponu 80-85 % (Zhang i sur., 2024.), a najviše je disijaliniziranih N-glikana (58.4 %) koje prate mono- (24.5 %), tri- (14.8 %) i tetrasijalinizirani (2.2 %) (Knežević i sur., 2009.). Jednak obrazac imaju i udjeli mono- do tetraanionskih N-glikana u krvnoj plazmi GŠ (**Slika 4.1**). Za štakorski N-glikom disijaliniziranih N-glikana je ~ 80 %, a mono-, tri- i tetrasijalinizirani ih po udjelima slijede jednakim redosljedom (Raju i sur., 2000.). Na razini oslobođenih Sia, serum ili plazma štakora/miša/GŠ sadrži 45.4/1.9/50.5 % Neu5Ac i 2.7/95.2/18.1 % Neu5Gc. Uz to je ukupnih oslobođenih Sia više u štakora ($173 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) nego u miša ($72 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) (Morimoto i sur., 2001.) Za GŠ apsolutna kvantifikacija Sia u krvnoj plazmi nije provedena.

5.2 Sijalinske kiseline na N-glikanima su 4-*O*-acetilirane

Strukturni motiv koji se najviše ističe u N-glikomu krvne plazme GŠ su 4-*O*-acetilirane sijalinske kiseline. N-glikana s Neu4,5Ac₂ je znatno više (50 %) od onih s Neu4Ac5Gc (4.5 %) što je u skladu s relativnim udjelima oslobođenih Sia i djelomično s izvedenim N-glikanskim svojstvom Neu5Gc/Neu5Ac koje niskim omjerom od 0.2 ukazuje na dominantnost sijalinizacije s Neu5Ac. U krvnom serumu štakora prisutno je oko 60 % *O*-Ac-Sia (Gao i sur., 2015.), a u mišjem 2-6 % gdje je udio i opet ovisan o soju i spolu (Reiding i sur., 2016.). U tim istraživanjima autori nisu proveli strukturnu analizu Sia za potvrdu točne pozicije *O*-Ac skupine. Ipak, Morimoto i sur. (2001.) su ranije odredili Neu5,9Ac₂ ($40.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) uz tragove Neu5,7(8)Ac₂ u štakorskom te Neu4Ac5Gc ($1.9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) i Neu5,9Ac₂ u mišjem serumu. To je u skladu s opažanjima 7- i 9-*O*-Ac Sia na lizosomalnim i staničnim membranama jetre štakora (Butor i sur., 1993.). Iako u obje ove vrste Neu4,5Ac₂ nije prisutna u serumu, nađena je u tkivima podjezične i podčeljusne žlijezde štakora, odnosno debelog crijeva, dušnika, jetre i mozga miša (Morimoto i sur., 2001.; Rinninger i sur., 2006.). 4- i 9-*O*-Ac Sia su u miša najvjerojatnije endogeni supstrati ciljani hemaglutinin-esterazama mišjih koronavirusa tipa II (Aamelfot i sur., 2014.; Rinninger i sur., 2006.).

Ostali organizmi u kojih je u različitim tkivima nađena Neu4,5Ac₂ su konj, magarac, kunić, zamorčić ali i južnoamerička zmija otrovnica *Bothrops moojeni* (Viperidae) te neke vrste riba poput atlantskog lososa iz reda pastrvki (Salmoniformes) (Aamelfot i sur., 2014.). Infektivni virus anemije lososa (engl. *infectious salmon anemia virus*, ISAV) (Orthomyxoviridae) također prilikom infekcije svojom acetilesteraznom aktivnošću de-*O*-acetilira Neu4,5Ac₂ kao supstrat (Hellebø i sur., 2004.). Nadalje, Neu4,5Ac₂ nađena je u serumu (32 %) i jetri (10 %) zamorčića (*C. porcellus*) koji je filogenetski blizak golokrtičastom štakoru. Uz to su u serumu prisutne još Neu5Ac (61 %), Neu5Gc (7 %) te tragovi Neu4Ac5Gc (Iwersen i sur., 1998.). To ukazuje na aktivnost 4-SOAT u jetri zamorčića, no unatoč uspješnoj solubilizaciji i potvrdi aktivnosti ovaj enzim do danas nije potpuno pročišćen i molekularno okarakteriziran (Iwersen i sur., 2003.). U krvnoj plazmi GŠ relativni udjeli oslobođenih Sia su slični kao u zamorčića, s razlikom da je udio Neu5Gc i Neu4Ac5Gc znatno viši, što potencijalno ukazuje na pojačanu aktivnost enzima CMAH u GŠ. Isto tako nije poznato katalizira li taj enzim 4-*O*-acetilaciju Neu5Gc i postoji li preferencija za CMP-Neu5Ac kao supstratom nad CMP-Neu5Gc što je slučaj u 9-*O*-acetilacije katalizirane s CASD1 (Barnard i sur., 2019.; Baumann i sur., 2015.). Aktivnost 4-SOAT i drugih sijalat-*O*-acetiltransferaza u tkivima GŠ nije poznata.

Nasuprot glodavcima, u ljudskoj krvnoj plazmi je prisutna mala količina Neu5,9Ac₂ u masenoj koncentraciji od prosječno 0.32 mg dL⁻¹ (Cheeseman i sur., 2023.; Visser i sur., 2021.). Ipak, raznolikost *O*-Ac-Sia u čovjeka je potencijalno mnogo veća, jer je na membranama eritrocita dokazana prisutnost 10 različitih derivata Sia uključujući *O*-sulfatirane, *O*-laktilirane i *O*-metilirane Sia, a među njima i Neu4,5Ac₂ (Bulai i sur., 2003.). To je istraživanje provedeno na razini oslobođenih, ukupnih Sia i ne pruža uvid u sijalinizaciju samih N-glikana. Kratkokljuni ježak (*Tachyglossus aculeatus*) i čudnovati kljunaš (*Ornithorhynchus anatinus*) koji pripadaju redu jednootvora (Monotremata), imaju također Neu4,5Ac₂ na oligosaharidima u mlijeku i to pretežno u formi sijalil-laktoze. Pretpostavlja se da 4-*O*-Ac Sia štite kisele oligosaharide iz mlijeka od razgradnje bakterijskim sijalidazama (Kamerling i sur., 1982.; Messer, 1974.; Urashima i sur., 2014.). U ženki-matica GŠ laktacija je cjeloživotna i mlijeko je vrlo niske kalorijske vrijednosti s malo ugljikohidrata (5.7 %), no sastav oligosaharida nije poznat (Hood i sur., 2014.).

Premda se 4-*O*-acetilacija Sia smatra rijetkom, treba uzeti u obzir manjak istraživanja i nepouzdanost starijih podataka. N-glikozilacija i sijalinizacija su inter- i intraspecijski i tkivno-specifične te vremenski varijabilne. Stoga je moguće da su u GŠ 4-*O*-Ac Sia zastupljene u krvnoj plazmi, ali ne i u ostalim tkivima gdje mogu prevladavati drugi derivati Sia.

5.3 Inhibitori proteaza su glavni ishodišni proteini N-glikana s 4-*O*-Ac Sia

Nedavno objavljena glikoproteomska analiza mišjeg seruma otkrila je da je čak 41 protein modificiran s 39 različitih N-glikana s *O*-Ac-Sia na 61 N-glikozilacijskom mjestu. Najzastupljeniji su diantenari sastava H5/6N4/5G-Ac1/2 i triantenari sastava H6N5G-Ac2/3, a prisutna je isključivo Neu5GcAc. Za razliku od GŠ gdje su otkrivene samo mono-*O*-acetilirane Sia, u mišjem serumu prisutne su i di-*O*-acetilirane i to kao Neu5GcAc₂ na devet glikopeptida iz α_1 AC. Točnu poziciju *O*-acetilne skupine na Sia autori iz fragmentacijskih spektara N-glikopeptida nisu mogli odrediti. Analizom obogaćivanja genske ontologije otkriveno je da *O*-Ac-Sia na glikopeptidima potječu sa sekretornih proteina i to najviše inhibitora peptidaza i endopeptidaza Ser i Cys-tipa, a u manjoj mjeri proteina uključenih u humoralnu i staničnu imunost. Najviše jedinstvenih *O*-Ac-sijaloglikopeptida, 45, određeno je za inhibitor serinskih proteaza A3K (SERPINA3K), murinoglobulin-1 (MUG1), α_1 AT, KNG1 i Tf (Shen i sur., 2023.).

Za GŠ je uspješno identificirano znatno manje glikoproteina s *O*-Ac-Sia na N-glikanima, svega šest (**Slika 4.40**). Za preostalih 13 od ukupno 19 sijaloglikoproteina (**Prilog 3**) može se tvrditi da sadrže sijaloglikane jer su afinitetno pročišćeni vezanjem na TiO₂, no *O*-acetilacija Sia se ne može potvrditi. Za sveobuhvatniju glikoproteomsku analizu bilo bi potrebno dodatno optimizirati polazišnu količinu uzorka, pročišćavanje, kromatografsko odjeljivanje i postavke fragmentacije u spektrometru masa. Neovisno o tome, inhibitori proteaza kao ishodišni proteini s *O*-Ac-Sia na N-glikanima su zajednički objema vrstama.

5.3.1 N-glikozilacija inhibitora proteaza

Proteaze (proteinaze) su enzimi koji kataliziraju razgradnju proteina do (poli)peptida i aminokiselina hidrolizom peptidnih veza. Prema mjestu djelovanja dijele se na endo- i egzopeptidaze, a prema katalitičkom aminokiselinskom ostatku u katalitičkoj trijadi na serinske, cisteinske, treoninske, aspartatne i glutamatne proteaze, te metaloproteaze i asparaginske peptidne liaze (López-Otín i Bond, 2008.). Osim što su ključne za katabolizam proteina, proteaze sudjeluju u molekularnom signaliziranju, modulaciji protein-protein interakcija i sintezi drugih biomolekula pa reguliraju zgrušavanje krvi, upalu, autofagiju, apoptozu, angiogenezu, diferencijaciju stanica itd. Skup proteaza stanice ili tkiva naziva se degradom, a jedan od mehanizama njegove regulacije je putem proteinskih endogenih inhibitora, tj. inhibitora proteaza (Puente i López-Otín, 2004.). Inhibitori proteaza su često N-glikozilirani što utječe na njihovu funkciju. Glikoproteomskom analizom određeno je sedam inhibitora proteaza u krvnoj plazmi GŠ (Slika 4.38.).

U skupinu inhibitora serinskih proteaza (serpina) pripadaju α_1 AT, α_1 AC, C1-inh, ITIH3 i ITIH4. Fetuin-A i KNG1 su inhibitori cisteinskih proteaza, dok α_2 M ima širu specifičnost i inhibira Ser-, Thr- i metaloproteaze. To se preklapa s rezultatima glikoproteomske analize krvnog seruma miša u kojem su Shen i sur. (2023.) također odredili KNG1 i α_1 AT, no SERPINA3K i MUG1 koji su u miša glikozilirani N-glikanima s *O*-Ac-Sia, u krvnoj plazmi GŠ nisu određeni. Ipak, kako je mišji MUG1 jednolančani protein iz porodice α_2 -makroglobulina (Overbergh i sur., 1994.), moguće je da je to isti protein identificiran kao α_2 M u GŠ, što zahtijeva dodatnu potvrdu. U glodavaca su ovi proteini slabo istraženi, te se o funkciji može zaključivati prema homolognim proteinima u čovjeka.

Najvažniji inhibitor proteaza u serumu je α_1 AT koji se sintetizira pretežno u jetri i inhibira neutrofilnu elastazu u plućima čija prekomjerna aktivnost dovodi do razgradnje elastina i propadanja vezivnog tkiva. Uz to je i protein akutne faze i prilikom upale ili ozljede sudjeluje u aktivaciji neutrofila (Janciauskiene i sur., 2018.). Serpini su u optoku krvi prisutni u metastabilnom stanju i prolaze promjene konformacije prilikom vezanja na proteaze. Sijalinizirani di- i triantenarni N-glikani na tri N-glikozilacijskih mjesta ne povećavaju stabilnost α_1 AT, ali sprečavaju njegovu agregaciju, produljuju vrijeme poluživota i mijenjaju se tijekom upale; posebno udio sržne fukoze i epitopa sLeX (McCarthy i sur., 2014.).

Sličnu ulogu ima i α_1 AC koji inhibira aktivnost kimotripsina i katepsina G te je važan u protuupalnom i antivirusnom odgovoru, a njegova je ekspresija pojačana u Alzheimerovoj bolesti i nekim vrstama raka (de Mezer i sur., 2023.). Serpin α_1 AC ima šest N-glikozilacijskih mjesta zauzetih također sijaliniziranim di- i triantenarima. Udio struktura visokog stupnja grananja i epitopa sLeX se povećava tijekom upale i sepse, no sami utjecaj N-glikozilacije na stabilnost i vrijeme poluživota α_1 AC nije poznat (Čaval i sur., 2021.). Molekulskim modeliranjem i spektrometrijom masa intaktnih proteinskih kompleksa, otkriveno je da sržna fukozilacija i povišeno grananje N-glikana potiču, a antenarna fukozilacija blokira interakcije α_1 AT s elastazom odnosno α_1 AC s kimotripsinom (Wu i sur., 2023.).

Fetuin-A pripada nadporodici cistatina; cisteinskih inhibitora metaloproteaza, papaina, katepsina i kaspaza, no inhibitorna sposobnost mu je dvojbena. Sintetizira se u hepatocitima i adipocitima, a najviše ga ima u fetalnoj i neonatalnoj krvi. Sudjeluje u metabolizmu kalcija, osteogenezi, endocitozi i upalnom odgovoru (Chekol Abebe i sur., 2022.). Ljudski fetuin-A ima dva N-glikozilacijska mjesta zauzeta uglavnom sijaliniziranim di- i triantenarima čija se sržna fukozilacija povećava u sepsi (Lin i sur., 2019.), no detaljnijih istraživanja o utjecaju N-glikozilacije na funkciju fetuina-A nema.

Porodica inhibitora inter-alfa-tripsina ($I\alpha I$) su proteinski kompleksi koji sadrže proteoglikan bikunin (laki lanac) sastavljen od hondroitin-sulfata (HS) i sržnog proteina. Teški lanci su vezani na HS ali interspecijski varijabilni. Kod čovjeka postoje dva, HC1 i HC2, kodirana genima *ITIH1* i *ITIH2* uz polimorfizme *ITIH3-5*. Transesterifikacijom HC s hijaluronskom kiselinom (HA) nastaje SHAP-HA kompleks (engl. *serum-derived hyaluronan-associated protein*) važan u održavanju integriteta izvanstaničnog matriksa bogatog s HA kao i u upalnim procesima gdje je medijator aktivacije leukocita (Zhuo i sur., 2004.). U krvnoj plazmi GŠ identificirani su glikoproteini ITIH3 i ITIH4, a na N-glikozilacijskom mjestu N580 u ITIH3 i triantenarni trisijalinizirani N-glikani s 1-2 Neu5Ac₂. Ljudski ITIH4 ima pet N-glikozilacijskih mjesta zauzetih kompleksnim sijaliniziranim N-glikanima. Diantenari su pretežno sržno, a triantenari antenarno fukozilirani, no uloga i promjene N-glikozilacije kod ovih proteina nisu poznate (Chandler i sur., 2014.).

Jedini inhibitor proteaza iz GŠ čija glikozilacija je djelomično istraživana je α_2 M. U ljudskoj krvnoj plazmi tetramerni α_2 M je među najvećim proteinima (~ 720 kDa) akutne faze.

Inhibira plazmin, kalikrein i trombin pa zaustavlja fibrinolizu i koagulaciju, a uz to je i transportni protein jer veže faktore rasta, citokine i inzulin. Ljudski α_2M ima osam N-glikozilacijskih mjesta, a šest je zauzeto gotovo isključivo sijaliniziranim diantenarima (Lin i sur., 2012.). Thieme i sur. (2015.) pročistili su dimerni α_2M (~ 360 kDa) iz krvne plazme GŠ, pokazali da je taj protein jače eksprimiran u jetri GŠ nego miša i bioinformatičkom analizom odredili 10 potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta. Među njima je i N55 čije postojanje je u ovom doktorskom radu i potvrđeno. Uz to, proteolitička aktivnost krvne plazme GŠ manja je za oko 40 % nego ljudske, što prati i približno dvostruko veća koncentracija α_2M u krvnoj plazmi GŠ. Autori nisu proveli strukturnu analizu N-glikana s α_2M GŠ, ali, primjerice, di- i triantenarni N-glikani s α_2M iz seruma konja i zamorčića koji sadrže Neu4,5Ac₂ ključni su za inhibiciju infekcije ljudskim virusom influence A, podtipa H3N2. N-glikan sastava H5N4S-Ac1 (F2-GP14, 15) potvrđen je glikoproteomskom analizom na i N-glikozilacijskom mjestu N55 α_2M krvne plazme GŠ (Slika 4.40), što se poklapa s literaturnim podacima za α_2M zamorčića (Hanaoka i sur., 1989.). Vezanjem proteaze, α_2M prelazi u aktivirani oblik (α_2M^*) za koji je pokazano da modulira adheziju, migraciju i rast tumorskih stanica što zajedno s visokim koncentracijama u krvnoj plazmi tijekom cijelog životnog vijeka GŠ vjerojatno doprinosi otpornosti na kancerogenezu (Kurz i sur., 2017.).

5.3.3 Potencijalna uloga *O*-Ac-Sia u N-glikomu krvne plazme golokrtičastog štakora

Niti za jedan inhibitor proteaza u ljudskoj krvnoj plazmi nije trenutno poznato da je modificiran N-glikanima s *O*-Ac-Sia. Do sada je to bilo potvrđeno za miša (Shen i sur., 2023.) i u ovom istraživanju za GŠ. Kako je *O*-acetilacija Sia u N-glikomu štakorskog seruma također opsežna (Gao i sur., 2015.), moguće je da se radi o sličnim ishodišnim proteinima. Na razini istraživanja glikomike, na oslobođenim ukupnim N-glikanima moguće je odrediti samo *mikroheterogenost* (sastav i strukturu), dok glikoproteomika pruža uvid u *makroheterogenost* (broj i raspored glikozilacijskih mjesta), *mikroheterogenost* po svakom glikozilacijskom mjestu i sami identitet proteina. N-glikom krvne plazme GŠ ovdje je istraživan na glikomskoj razini, a glikoproteomskim i sijalomskim pristupom detaljnije je analizirana samo *O*-acetilacija Sia kao glavni strukturni motiv.

Bez funkcionalnih istraživanja metodama glikanskih nizova (engl. *glycan array*) i molekuskog modeliranja interakcija sijaloglikana s proteinima moguće je samo pretpostavljati o ulozi *O*-acetilacije Sia. Pri tome se nameću pitanja:

- 1) Imaju li mnogobrojni N-glikani s *O*-Ac-Sia u N-glikomu krvne plazme sličnu ulogu bez obzira s kojeg proteina potječu ili je
- 2) njihova uloga različita za svaki pojedini protein koji je njima N-glikoziliran?

Uloga mnogih opisanih N-glikana nije poznata jer nije otkrivena ili je rezultat metastabilnog stanja u evoluciji glikana u kojem se oni trenutno i dalje sintetiziraju, ali će uskoro izgubiti funkciju ili steći novu. Uloge N-glikana su utemeljene na: 1) strukturnim i fizikalno-kemijskim svojstvima i 2) na prepoznavanju putem receptora koji razlikuju vlastite (engl. *self*) od stranih (engl. *non-self*) oligosaharida. Receptori vlastitih oligosaharida su uglavnom lektini, a stranih mikrobnih toksini, adhezini i hemaglutinini. To je u vezi s činjenicom da je raznolikost glikana najveća na nereducirajućim krajevima gdje se nalaze i Sia. Diverzifikacija N-glikana pokretana je egzo- i endogenim selekcijskim pritiscima, pa iako N-glikani dijele zajedničke strukturne osobine, veza između strukturne raznolikosti i filogenetskih odnosa često ne postoji i rezultat je prošlih i trenutnih adaptacija (Gagneux i Varki, 1999.).

Iako nije poznato da je GŠ prenositelj zoonoza, mnogi glodavci su rezervoari patogenih virusa i bakterija (hantavirus, *Leptospira* sp.) i domaćini ektoparazitnih vektora koji prenose Lajmsku boreliozu, tularemiju i sl., ali sami su na većinu njih otporni. Zbog načina života i prehrane glodavci su neprekidno izloženi patogenima, a posebno GŠ zbog neprekidnog kopanja tla zubima. Moguće je da 4-*O*-acetilacija Sia na N-glikanima raznih proteina ima zaštitnu, stabilizirajuću ulogu jer sprečava desijalinizaciju neuraminidazama. Druga mogućnost je da veliki udio sijaliniziranih N-glikana djeluje kao mamac za različite viruse koji za njih ostanu vezani. Upravo takvu funkciju imaju primjerice N-glikani glikoforina A; proteina na staničnim membranama eritrocita. Iako se virusi u eritrocitima ne mogu replicirati, vežu se za Sia N-glikana i uklanjaju (engl. *erythrocyte viral trap*), ali isti N-glikani mogu zamijeniti ulogu i od mamca postati receptor; primjerice za uzročnika malarije *Plasmodium* sp. (Burzyńska i sur., 2021.; Gagneux i Varki, 1999.; Jaskiewicz i sur., 2019.). Iz toga slijedi da je jedan od mogućih egzogenih pokretača diverzifikacije N-glikoma krvne plazme neprekidna izloženost patogenima. Za proteine GŠ iz skupine inhibitora proteaza otkriveno je da dijele strukturni motiv 4-*O*-acetilacije Sia kojima su sijalinizirani slični N-glikani. Drži se da isti N-glikani prisutni na istim proteinima, stanicama ili tkivima u različitim vrstama nužno imaju važnu, sličnu funkciju koja se neprekidnim adaptacijama dalje ne može diverzificirati i ostaje očuvana (Gagneux i Varki, 1999.; Springer i Gagneux, 2013.).

5.4 Svojstva N-glikanskog kemijskog prostora proteina krvne plazme kao temelj funkcionalnih istraživanja

U većini istraživanja glikoma različitih bioloških uzoraka prevladava samo pristup strukturne analize i kvantifikacije bez pokušaja da se opišu fizikalno-kemijska svojstva prisutnih glikana. Glikani su idealni medijatori mnogih bioloških interakcija jer od svih PTM proteina imaju najveću strukturnu raznolikost i često su organizirani u tzv. glikosinapse (Hakomori, 2002.) i saharidne otočiće (engl. *saccharide patches*) (Cohen i Varki, 2014.) koji na proteinima ili površinama membrana stvaraju jedinstvene fenotipe i mjesta su brojnih biofizičkih interakcija. Velika brojnost glikana također kompenzira niske asocijacijske konstante (K_a) koje, ipak, u slučaju pogrešne interakcije omogućuju reverzibilnost procesa vezanja (Cohen, 2015.). N-glikani nisu rigidne već fleksibilne strukture koje mogu zauzeti veliki konformacijski prostor omeđen rasponima torzijskih (diedarskih) kuteva ϕ , ψ i ω zatvorenih ravninama glikozidnih veza između monosaharida. To posebno vrijedi za strukture sa 7-12 ili više monosaharida (Rogals i sur., 2022.).

Promjene mikroheterogenosti N-glikozilacije proteina krvne plazme utječu na interakcije protein-protein i interakcije proteina s malim molekulama. Primjerice, fukozilacija i pojačano grananje N-glikana smanjuju afinitet AGP prema antikoagulansu varfarinu zbog steričkih smetnji u veznom mjestu. Sličan učinak opažen je za stvaranje kompleksa haptoglobin-hemoglobin (Hp-Hb) pri čemu fukozilacija stabilizira kompleks, ali N-glikani višeg stupnja grananja smanjuju afinitet Hp za Hb (Wu i sur., 2018.).

Desijalinizacija destabilizira terciarnu strukturu glikoproteina ili interakciju sijaliniziranih N-glikana s ligandima pa tako nastali asijaloglikoproteini gube svoju funkciju. Gubitak Sia uzrokuje otvaranje i povećanu fleksibilnost oligosaharidnih lanaca što se očituje kroz promjene diedarskih kuteva u molekuli di- i triantenarnih N-glikana. Dodatno kretanje lanca u regiji pentasaharidne srži potencirano je i gubitkom sržne fukoze N-glikana. Desijalinizacijom se mijenja površina zauzeta N-glikanom na proteinu što utječe na međumolekulske interakcije i konformaciju proteina (Guillot i sur., 2016.). Obzirom na izraženu sijalinizaciju N-glikoma krvne plazme GŠ, zamisliv je glikoproteostatski mehanizam kojim *O*-acetilacija Sia pruža zaštitu od desijalinizacije osiguravajući tako još veću stabilnost i dulje vrijeme poluživota plazmatskih sijaloglikoproteina.

N-glikani se poopćeno smatraju hidrofilnim biomolekulama, no ovisno o sastavu mogu imati diferencirane intramolekulske gradijente polarnosti, a neki su vrlo hidrofobni (Lu i sur., 2012.). Indeks hidrofobnosti N-glikana koji je predložen u ovom istraživanju ukazuje na hidrofilan karakter N-glikoma krvne plazme GŠ ($\overline{IH_G} = 29.5$) upravo zbog visokog udjela Neu5Ac i Neu5Gc te njihovih mono-*O*-Ac derivata Neu4,5Ac₂ i Neu4Ac5Gc. No, sama *O*-acetilna skupina povisuje vrijednosti IH_G što se slaže s podacima da su *O*-Ac-Sia hidrofobnije od neacetiliranih analoga (Visser i sur., 2021.). Najviše, i do četiri puta od prosjeka, vrijednosti IH_G određene su za asijalinizirane strukture s manjom raznolikošću monosaharida (visokomanozni N-glikani) koje su i najhidrofobnije (**Slika 4.42C**). Praktičnu vrijednost ovog indeksa treba dodatno provjeriti i usporediti s predviđenim vrijednostima $\log P$ za N-glikane. Daljnje primjene IH_G mogle bi se proširiti kombiniranjem s mjerenjima ili modeliranjima K_a kako bi se utvrdila korelacija između hidrofobnosti N-glikana i afiniteta protein-glikan interakcija. Nedostatak IH_G je što ne uzima u obzir da sijaloglikani imaju karboksilne skupine koje ioniziraju pa je raspodjela i udio ioniziranih i neioniziranih formi funkcija pH-vrijednosti. Zbog struktura koje vrijednostima IH_G jako odstupaju od prosjeka ovaj indeks ne pokazuje dobru linearnu korelaciju s vremenima zadržavanja u kromatogramu. To ipak nije slučaj za sijaloglikane sa i bez *O*-Ac-Sia gdje se iz t_R može direktno predvidjeti stupanj *O*-acetilacije sijaloglikana (**Prilog 6**). Uz poboljšanja bilo bi moguće razviti model za direktno određivanje IH_G iz t_R . Sličan model razvijen je za glikopeptide, a izražava hidrofobnost putem „acetonitrilnih jedinica“, tj. postotka ACN u pokretnoj fazi u određenom t_R (Ang i sur., 2019.).

5.5 Glikobiološki aspekt golokrtičastog štakora kao modelnog organizma

N-glikomi krvne plazme GŠ i čovjeka znatno se razlikuju i to treba uzeti u obzir prilikom translacije rezultata proteomskih i glikobioloških istraživanja. Najveću razliku čini opsežna *O*-acetilacija sijaloglikana te prisutnost za čovjeka imunogenih Neu5Gc i α -Gal epitopa na N-glikanima. Istovremeno, N-glikom GŠ dijeli sličnosti s mišjim, a posebno štakorskim N-glikomom što upućuje na nužnost daljnjih istraživanja glikobiologije glodavaca kako bi se razjasnio evolucijski aspekt N-glikozilacije. Proteom GŠ još uvijek nije potpuno anotiran i većina informacija o proteinima još uvijek potječe iz transkriptomike, a posebno je malo informacija o PTM.

Prostorna i vremenska dinamika biosinteze proteina u različitim tkivima može kod GŠ biti različita i ovisiti o fiziologiji, ekologiji i etologiji koje su kod ove vrste potpuno drugačije nego kod čovjeka. Golokrtičasti štakor svoju popularnost modelnog organizma trenutno više duguje neobičnom izgledu i načinu života nego molekularnim aspektima dugovječnosti koji se tek počinju otkrivati. Stoga se veći translacijski potencijal očekuje tek sveobuhvatnim „multi-omics“ analizama koje će uključiti ekspresijsku proteomiku, metabolomiku i PTM-omiku svih organa u životinja različite dobi i organizaciju tih podataka u atlase. Kolonijalni način života i zahtjevan uzgoj u zatočeništvu trenutno su najveća prepreka proizvodnji srođenih sojeva GŠ i žrtvovanja većeg broja životinja za opsežnija istraživanja.

5.5.1 Nedostaci provedenog istraživanja

Za strukturnu analizu N-glikoma koja je uključivala složeni i vremenski zahtjevan pristup 2D-LC vezan s ESI-Qq-TOF hibridnom tandemnom spektrometrijom masa opravdano je bilo analizu provesti na jednom uzorku krvne plazme. Nakon frakcionacije N-glikana prema naboju uspješno je anotirano mnogo više struktura nego što bi to inače bilo moguće, a to je bio i primarni cilj istraživanja. Ipak, GŠ je biogerontološki modelni organizam pa bi glikomsku analizu prvenstveno trebalo proširiti na jedinke različite dobi i spola kako bi se utvrdile promjene u N-glikomu tijekom starenja. Rad na glikomici krvne plazme mogao bi se nastaviti analizom strukturnih izomera N-glikana, sulfatiranih N-glikana, O-glikana, derivatizacijom α 2,3/6-vezanih Sia, apsolutnom kvantifikacijom oslobođenih Sia, glikoproteomskom analizom ukupnih proteina krvne plazme itd.

6. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem potvrđena je postavljena hipoteza da su proteini krvne plazme GŠ N-glikozilirani, kao i da se razlikuju od onih u miša, štakora i čovjeka. Postignuti su svi postavljeni ciljevi istraživanja i na temelju rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- 1) Iz jednog uzorka krvne plazme mužjaka GŠ starosti 14 mj. enzimskom deglikozilacijom su sa denaturiranih proteina oslobođeni N-glikani, derivatizirani s fluoroformom ProA te pristupom 2D-LC najprije frakcionirani prema naboju. N-glikani iz neutralne i anionskih frakcija odijeljeni su zatim na HILIC nepokretnoj fazi. Analiza je provedena na vezanom analitičkom sustavu UPLC-FLD-Qq-TOF-MS.
- 2) Interpretacijom fragmentacijskih spektara masa određeno je ukupno 160 različitih N-glikana kao i njihovi relativni udjeli u N-glikomu krvne plazme. Prema tipu, najzastupljeniji su kompleksni, a prema antenarnosti diantenarni N-glikani. Od sijalinskih kiselina prisutne su Neu5Ac i Neu5Gc te visoki udio N-glikana s njihovim mono-*O*-acetiliranim derivatima.
- 3) Uobičajeni koncept N-glikoma proširen je pojmom glikanskog kemijskog prostora koji uzima u obzir fizikalno-kemijska svojstva N-glikana. Predložen je i indeks hidrofobnosti N-glikana (IH_G) kao novi deskriptor prema kojem je N-glikom krvne plazme GŠ hidrofilan zbog visoke sijalinizacije, a čine ga strukture s prosječno 12 monosaharida i prosječnom molekulskom masom od 2.3 kDa. Pokazano je i da *O*-acetilacija Sia utječe na njihovu hidrofobnost.
- 4) Strukturnom analizom oslobođenih Sia određeno je da su *O*-acetilirane na C-4 te se radi o Neu4,5Ac₂ i Neu4Ac5Gc. 4-*O*-Ac Sia prisutne su i kod zamorčiča (*C. porcellus*) koji je filogenetski blizak GŠ.
- 5) Glikoproteomskom analizom otkriveno je da N-glikani s 4-*O*-Ac Sia uglavnom potječu s inhibitora proteaza u krvnoj plazmi što se poklapa s ishodišnim proteinima takvih N-glikana u krvnoj plazmi miša (*M. musculus*).

- 6) Zbog prisutnosti Neu5Ac i Neu5Gc N-glikom krvne plazme GŠ sličniji je onom štakora (*R. norvegicus*) s kojim dijeli visoku sijalinizaciju i *O*-acetilaciju ali ne i 4-*O*-acetilaciju Sia. Predložena je potencijalna po proteine zaštitna i stabilizirajuća uloga opsežne *O*-acetilacije Sia u N-glikomu krvne plazme što je potrebno potvrditi budućim istraživanjima.

U ovom doktorskom radu po prvi je puta opisan glikobiološki aspekt golokrtičastog štakora i nadporodice afričkih krtičastih štakora. Strukturna raznolikost N-glikoma je uspješno određena, a funkcionalnim studijama preostaje otkriti u kojoj je mjeri dugovječnost ove vrste povezana i sa glikozilacijom proteina kao jednom od najsloženijih posttranslacijskih modifikacija.

7. POPIS LITERATURE

- Aamelfot M, Dale OB, Weli SC, Koppang EO, i Falk K (2014) The *in situ* distribution of glycoprotein-bound 4-*O*-Acetylated sialic acids in vertebrates. *Glycoconj. J.* 31: 327–335.
- Adamczyk B, Struwe WB, Ercan A, Nigrovic PA, i Rudd PM (2013) Characterization of fibrinogen glycosylation and its importance for serum/plasma N-glycome analysis. *J. Proteome Res.* 12: 444–454.
- Adeniyi M, Gutierrez Reyes CD, Chávez-Reyes J, Marichal-Cancino BA, Solomon J, Fowowe M, i sur. (2024) Serum N-Glycan changes in rats chronically exposed to glyphosate-based herbicides. *Biomolecules* 14: 1077.
- Al-attar R, Childers CL, Nguyen VC, Pamentier ME, i Storey KB (2020) Differential protein phosphorylation is responsible for hypoxia-induced regulation of the Akt/mTOR pathway in naked mole rats. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 242: 110653.
- Alonso JM, Arroyuelo A, Garay PG, Martin OA, i Vila JA (2018) Finite dimension: a mathematical tool to analyse glycans. *Sci. Rep.* 8: 4426.
- Anderson NL i Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 1: 845–867.
- Andziak B, O'Connor TP, Qi W, DeWaal EM, Pierce A, Chaudhuri AR, i sur. (2006) High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* 5: 463–471.
- Ang E, Neustaeter H, Spicer V, Perreault H, i Krokhn O V. (2019) Retention time prediction for glycopeptides in reversed phase chromatography for glycoproteomic applications. *Anal. Chem.* 91: 13360-13366
- Angata T i Varki A (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem. Rev.* 102: 439–469.
- Arriagada C, Silva P, i Torres VA (2019) Role of glycosylation in hypoxia-driven cell migration and invasion. *Cell Adhes. Migr.* 13: 13–22.
- Asensio JL, Ardá A, Cañada FJ, i Jiménez-Barbero J (2013) Carbohydrate-aromatic interactions. *Acc. Chem. Res.* 46: 946–954.
- Azpurua J, Ke Z, Chen IX, Zhang Q, Ermolenko DN, Zhang ZD, i sur. (2013) Naked mole-rat has increased translational fidelity compared with the mouse, as well as a unique 28S ribosomal RNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 17350–17355.
- Barb AW, Brady EK, i Prestegard JH (2009) Branch-specific sialylation of IgG-Fc glycans by ST6Gal-I. *Biochemistry* 48: 9705–9707.
- Barker AJ, Koch U, Lewin GR, i Pyott SJ (2021) Hearing and vocalizations in the naked mole-rat. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 157-195.
- Barnard KN, Wasik BR, Laclair JR, Buchholz DW, Weichert WS, Alford-Lawrence BK, i sur. (2019) Expression of 9-*O*- and 7,9-*O*-acetyl modified sialic acid in cells and their effects on influenza viruses. *mBio* 10: e02490-19.
- Baumann AMT, Bakkens MJG, Buettner FFR, Hartmann M, Grove M, Langereis MA, i sur. (2015) 9-*O*-Acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. *Nat. Commun.* 6: 1–12.

- Bhide GP i Colley KJ (2017) Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochem. Cell Biol.* 147: 149–174.
- Brieno-Enríquez MA, Faykoo-Martinez M, Goben M, Grenier JK, McGrath A, Prado AM, i sur. (2023) Postnatal oogenesis leads to an exceptionally large ovarian reserve in naked mole-rats. *Nat. Commun.* 14: 1–17.
- Brubaker DK i Lauffenburger DA (2020) Translating preclinical models to humans. *Science* 367: 742–743.
- Buffenstein R i Craft W (2021) The idiosyncratic physiological traits of the naked mole-rat; a resilient animal model of aging, longevity, and healthspan. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 221–254.
- Buffenstein R, Kang J, i Biney A (2007) Glucose tolerance and insulin sensitivity in an extremely long-living rodent, the naked mole-rat. *FASEB J.* 21: A1423–A1423.
- Buffenstein R, Park T, Hanes M, i Artwohl JE (2012) Naked mole-rat. U: Suckow MA, Stevens A, Wilson, RP (ur.): *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents.* Academic Press, 1055–1074.
- Buffenstein R, Amoroso V, Andziak B, Avdieiev S, Azpurua J, Barker AJ, i sur. (2022) The naked truth: a comprehensive clarification and classification of current ‘myths’ in naked mole-rat biology. *Biol. Rev.* 97: 115–140.
- Bulai T, Bratosin D, Pons A, Montreuil J, i Zanetta JP (2003) Diversity of the human erythrocyte membrane sialic acids in relation with blood groups. *FEBS Lett.* 534: 185–189.
- Burda H, Honeycutt RL, Begall S, Locker-Grütjen O, i Scharff A (2000) Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 47: 293–303.
- Burzyńska P, Sobala ŁF, Mikołajczyk K, Jodłowska M, i Jaśkiewicz E (2021) Sialic acids as receptors for pathogens. *Biomolecules* 11.
- Butor C, Diaz S, i Varki A (1993) High level *O*-acetylation of sialic acids on N-linked oligosaccharides of rat liver membranes. Differential subcellular distribution of 7- and 9-*O*-acetyl groups and of enzymes involved in their regulation. *J. Biol. Chem.* 268: 10197–10206.
- Byrd-Leotis L, Gao C, Jia N, Mehta AY, Trost J, Cummings SF, i sur. (2019) Antigenic pressure on H3N2 influenza virus drift strains imposes constraints on binding to sialylated receptors but not phosphorylated glycans. *J. Virol.* 93.
- Čaval T, Lin YH, Varkila M, Reiding KR, Bonten MJM, Cremer OL, i sur. (2021) Glycoproteoform profiles of individual patients’ plasma alpha-1-antichymotrypsin are unique and extensively remodeled following a septic episode. *Front. Immunol.* 11: 1.
- Cavdarli S, Dewald JH, Yamakawa N, Guérardel Y, Terme M, Le Doussal JM, i sur. (2019) Identification of 9-*O*-acetyl-*N*-acetylneuraminic acid (Neu5,9Ac2) as main *O*-acetylated sialic acid species of GD2 in breast cancer cells. *Glycoconj. J.* 36: 79–90.
- Ceroni A, Dell A, i Haslam SM (2007) The GlycanBuilder: A fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures. *Source Code Biol. Med.* 2.
- Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, i Haslam SM (2008) GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* 7: 1650–1659.

- Chandler KB, Brnakova Z, Sanda M, Wang S, Stalnaker SH, Bridger R, i sur. (2014) Site-specific glycan microheterogeneity of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain h4. *J. Proteome Res.* 13: 3314–3329.
- Chaze T, Slomianny MC, Milliat F, Tarlet G, Lefebvre-Darroman T, Gourmelon P, i sur. (2013) Alteration of the serum N-glycome of mice locally exposed to high doses of ionizing radiation. *Mol. Cell. Proteomics* 12: 283–301.
- Cheeseman J, Badia C, Elgood-Hunt G, Gardner RA, Trinh DN, Monopoli MP, i sur. (2023) Elevated concentrations of Neu5Ac and Neu5,9Ac2 in human plasma: potential biomarkers of cardiovascular disease. *Glycoconj. J.* 40: 645–654.
- Chekol Abebe E, Tilahun Muche Z, Behaile T/Mariam A, Mengie Ayele T, Mekonnen Agidew M, Teshome Azezew M, i sur. (2022) The structure, biosynthesis, and biological roles of fetuin-A: A review. *Front. Cell Dev. Biol.* 10: 945287.
- Chen YJ, Wing DR, Guile GR, Dwek RA, Harvey DJ, i Zamze S (1998) Neutral N-glycans in adult rat brain tissue - Complete characterisation reveals fucosylated hybrid and complex structures. *Eur. J. Biochem.* 251: 691–703.
- Cheng H, Sebaa R, Malholtra N, Lacoste B, El Hankouri Z, Kirby A, i sur. (2021) Naked mole-rat brown fat thermogenesis is diminished during hypoxia through a rapid decrease in UCP1. *Nat. Commun.* 2021 121 12: 1–14.
- Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, i Wuhrer M (2016) Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj. J.* 33: 309–343.
- Coen CW, Bennett NC, Holmes MM, i Faulkes CG (2021) Neuropeptidergic and neuroendocrine systems underlying eusociality and the concomitant social regulation of reproduction in naked mole-rats: a comparative approach. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 59–103.
- Cohen M (2015) Notable aspects of glycan-protein interactions. *Biomolecules* 5: 2056–2072.
- Cohen M i Varki A (2014) Modulation of glycan recognition by clustered saccharide patches. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 308: 75–125.
- Colley KJ, Varki A, Haltiwanger RS, i Kinoshita T (2022) Cellular organization of glycosylation. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH (ur.): *Essentials of Glycobiology* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th ed., Chapter 4, PMID: 35536940.
- Cooper CA, Gasteiger E, i Packer NH (2001) GlycoMod - A software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* 1: 340–349.
- Dang L, Jia L, Zhi Y, Li P, Zhao T, Zhu B, i sur. (2019) Mapping human N-linked glycoproteins and glycosylation sites using mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 114: 143–150.
- de-Freitas-junior JCM, Andrade-Da-costa J, Silva MC, i Pinho SS (2017) Glycans as regulatory elements of the insulin/IGF system: Impact in cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 1921.
- Delaney MA, Nagy L, Kinsel MJ, i Treuting PM (2013) Spontaneous histologic lesions of the adult naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): a retrospective survey of lesions in a zoo population. *Vet. Pathol.* 50: 607–621.
- Delaney MA, Ward JM, Walsh TF, Chinnadurai SK, Kerns K, Kinsel MJ, i sur. (2016) Initial case reports of cancer in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Vet. Pathol.* 53: 691–696.
- Delaney MA, Imai DM, i Buffenstein R (2021) Spontaneous disease and pathology of naked mole-rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 353–380.

- Dennis JC, Stilwell NK, Smith TD, Park TJ, Bhatnagar KP, i Morrison EE (2020) Is the mole rat vomeronasal organ functional? *Anat. Rec.* 303: 318–329.
- Deuker MM, Lewis KN, Ingaramo M, Kimmel J, Buffenstein R, i Settleman J (2020) Unprovoked stabilization and nuclear accumulation of the naked mole-rat p53 protein. *Sci. Rep.* 10: 1–11.
- Deutsch EW, Omenn GS, Sun Z, Maes M, Pernemalm M, Palaniappan KK, i sur. (2021) Advances and utility of the human plasma proteome. *J. Proteome Res.* 20: 5241.
- Dotz V i Wuhrer M (2019) N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Lett.* 593: 2966–2976.
- Du J, Zhang Q, Li J, i Zheng Q (2020) LC-MS in combination with DMBA derivatization for sialic acid speciation and distribution analysis in fish tissues. *Anal. Methods* 12: 2221–2227.
- Duran-Romaña R, Houben B, De Vleeschouwer M, Louros N, Wilson MP, Matthijs G, i sur. (2024) N-glycosylation as a eukaryotic protective mechanism against protein aggregation. *Sci. Adv.* 10: 31.
- Edrey YH, Hanes M, Pinto M, Mele J, i Buffenstein R (2011) Successful aging and sustained good health in the naked mole-rat: a long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research. *ILAR J.* 52: 41–53.
- Fang Z, Qin H, Mao J, Wang Z, Zhang N, Wang Y, i sur. (2022) Glyco-Decipher enables glycan database-independent peptide matching and in-depth characterization of site-specific N-glycosylation. *Nat. Commun.* 13: 1–15.
- Faulkes CG i Bennett NC (2021) Social evolution in African mole-Rats – a comparative overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 1-33.
- Faulkes CG, Bennett NC, Bruford MW, O'Brien HP, Aguilar GH, i Jarvis JUM (1997) Ecological constraints drive social evolution in the African mole-rats. *Proceedings. Biol. Sci.* 264: 1619–1627.
- Feleke DG, Montalban BM, Gizaw ST, i Hinou H (2024) Sulfated N-glycans upregulation in sera predicts early-stage breast cancer in patients. *MedRxiv* 2024.03.27.24305000.
- Fuster MM i Esko JD (2005) The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* 5: 526–542.
- Gagneux P i Varki A (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9: 747–755.
- Galili U (2005) The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol. Cell Biol.* 83: 674–686.
- Gao WN, Yau LF, Liu L, Zeng X, Chen DC, Jiang M, i sur. (2015) Microfluidic chip-LC/MS-based glycomic analysis revealed distinct N-glycan profile of rat serum. *Sci. Rep.* 5: 12844.
- Garapati K, Jain A, Madden BJ, Mun DG, Sharma J, Budhraj R, i sur. (2024) Defining albumin as a glycoprotein with multiple N-linked glycosylation sites. *J. Transl. Med.* 22: 454.
- Gudelj I, Baciarello M, Ugrina I, De Gregori M, Napolioni V, Ingelmo PM, i sur. (2016) Changes in total plasma and serum N-glycome composition and patient-controlled analgesia after major abdominal surgery. *Sci. Rep.* 6: 1–12.
- Guillot A, Dauchez M, Belloy N, Jonquet J, Duca L, Romier B, i sur. (2016) Impact of sialic acids on the molecular dynamic of bi-antennary and tri-antennary glycans. *Sci. Reports* 2016 6: 1–12.

- de Haan N, Reiding KR, Krištić J, Ederveen ALH, Lauc G, i Wuhrer M (2017) The N-glycosylation of mouse immunoglobulin G (IgG)-fragment crystallizable differs between IgG subclasses and Strains. *Front. Immunol.* 8: 31.
- Habazin S, Mlinarević D, Balog M, Bardak A, Gaspar R, Szűcs KF, i sur. (2021) High-throughput rat immunoglobulin G N-glycosylation profiling revealed subclass-specific changes associated with chronic stress. *J. Proteomics* 245: 104293.
- Hägglund P, Bunkenborg J, Elortza F, Jensen ON, i Roepstorff P (2004) A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J. Proteome Res.* 3: 556–566.
- Hakomori SI (2002) The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 225–232.
- Hanaoka K, Pritchett TJ, Takasaki S, Kochibe N, Sabesan S, Paulson JC, i sur. (1989) 4-O-Acetyl-N-acetylneuraminic acid in the N-linked carbohydrate structures of equine and guinea pig α 2-macroglobulins, potent inhibitors of influenza virus infection. *J. Biol. Chem.* 264: 9842–9849.
- Hansen M, Rubinsztein DC, i Walker DW (2018) Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19: 579–593.
- Harding JJ i Crabbe MJC (1992) Post-translational modifications of proteins. 1st Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Harduin-Lepers A (2023) The vertebrate sialylation machinery: structure-function and molecular evolution of GT-29 sialyltransferases. *Glycoconjugate J.* 404: 473–492.
- Hebert DN, Lamriben L, Powers ET, i Kelly JW (2014) The intrinsic and extrinsic effects of N-linked glycans on glycoproteostasis. *Nat. Chem. Biol.* 10: 902–910.
- Heinze I, Bens M, Calzia E, Holtze S, Dakhovnik O, Sahm A, i sur. (2018) Species comparison of liver proteomes reveals links to naked mole-rat longevity and human aging. *BMC Biol.* 16: 1–18.
- Hellebø A, Vilas U, Falk K, i Vlasak R (2004) Infectious salmon anemia virus specifically binds to and hydrolyzes 4-O-acetylated sialic acids. *J. Virol.* 78: 3055–3062.
- Hipp MS, Kasturi P, i Hartl FU (2019) The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20: 421–435.
- Hirata T i Kizuka Y (2021) N-Glycosylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1325: 3-24.
- Hofsteenge J, Müller DR, de Beer T, Löffler A, Richter WJ, i Vliegenthart JFG (1994) New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* 33: 13524–13530.
- Holmes MM i Goldman BD (2021) Social behavior in naked mole-rats: individual differences in phenotype and proximate mechanisms of mammalian eusociality. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 35–58.
- Holtze S, Braude S, Lemma A, Koch R, Morhart M, Szafranski K, i sur. (2018) The microenvironment of naked mole-rat burrows in East Africa. *Afr. J. Ecol.* 56: 279–289.
- Honke K i Taniguchi N (2002) Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Med. Res. Rev.* 22: 637–654.
- Hood WR, Kessler DS, i Oftedal OT (2014) Milk composition and lactation strategy of a eusocial mammal, the naked mole-rat. *J. Zool.* 293: 108–118.

- Hua S, Jeong HN, Dimapasoc LM, Kang I, Han C, Choi JS, i sur. (2013) Isomer-specific LC/MS and LC/MS/MS profiling of the mouse serum N-glycome revealing a number of novel sialylated N-glycans. *Anal. Chem.* 85: 4636–4643.
- Huang K, Li C, Zong G, Prabhu SK, Chapla DG, Moremen KW, i sur. (2022) Site-selective sulfation of N-glycans by human GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase 1 (CHST2) and chemoenzymatic synthesis of sulfated antibody glycoforms. *Bioorg. Chem.* 128: 106070.
- Huang K, Bashian EE, Zong G, Nycholat CM, McBride R, Gomozkova M, i sur. (2024) Chemoenzymatic synthesis of sulfated N-glycans recognized by Siglecs and other glycan-binding proteins. *JACS Au* 4: 2966–2978.
- Ikeno Y, Hubbard GB, Lee S, Cortez LA, Lew CM, Webb CR, i sur. (2009) Reduced incidence and delayed occurrence of fatal neoplastic diseases in growth hormone receptor/binding protein knockout mice. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 64: 522–529.
- Issaq HJ, Xiao Z, i Veenstra TD (2007) Serum and plasma proteomics. *Chem. Rev.* 107: 3601–3620.
- Iwersen M, Vandamme-Feldhaus V, i Schauer R (1998) Enzymatic 4-*O*-acetylation of *N*-acetylneuraminic acid in guinea-pig liver. *Glycoconj. J.* 15: 895–904.
- Iwersen M, Dora H, Kohla G, Gasa S, i Schauer R (2003) Solubilisation and properties of the sialate-4-*O*-acetyltransferase from guinea pig liver. *Biol. Chem.* 384: 1035–1047.
- Janciauskiene S, Wrenger S, Immenschuh S, Olejnicka B, Greulich T, Welte T, i sur. (2018) The multifaceted effects of Alpha1-Antitrypsin on neutrophil functions. *Front. Pharmacol.* 9: 333492.
- Jarvis JUM (1981) Eusociality in a mammal: Cooperative breeding in naked mole-rat colonies. *Science* 212: 571–573.
- Jaskiewicz E, Jodłowska M, Kaczmarek R, i Zerka A (2019) Erythrocyte glycoporphins as receptors for Plasmodium merozoites. *Parasites and Vectors* 12: 317.
- Jennings MP, Day CJ, i Atack JM (2022) How bacteria utilize sialic acid during interactions with the host: snip, snatch, dispatch, match and attach. *Microbiol. (United Kingdom)* 168: 1157.
- Ji Y, Sasmal A, Li W, Oh L, Srivastava S, Hargett AA, i sur. (2021) Reversible *O*-acetyl migration within the sialic acid side chain and its influence on protein recognition. *ACS Chem. Biol.* 16: 1951–1960.
- Johansen K, Lykkeboe G, Weber RE, i Maloiy GMO (1976) Blood respiratory properties in the naked mole rat *Heterocephalus glaber*, a mammal of low body temperature. *Respir. Physiol.* 28: 303–314.
- Kamerling JP i Gerwig GJ (2006) Structural analysis of naturally occurring sialic acids. *Methods Mol. Biol.* 347: 69–91.
- Kamerling JP, Dorland L, van Halbeek H, Vliegenthart JFG, Messer M, i Schauer R (1982) Structural studies of 4-*O*-acetyl- α -*N*-acetylneuraminy-(2→3)-lactose, the main oligosaccharide in echidna milk. *Carbohydr. Res.* 100: 331–340.
- Keenan EK, Zachman DK, i Hirschey MD (2021) Discovering the landscape of protein modifications. *Mol. Cell* 81: 1868–1878.
- Kenny D, A. Hayes C, Jin C, i G. Karlsson N (2011) Perspective and review of mass spectrometric based sulfoglycomics of N-linked and O-linked oligosaccharides. *Curr. Proteomics* 8: 278–296.

- Keser T, Tijardović M, Gornik I, Lukić E, Lauc G, Gornik O, i sur. (2021) High-throughput and site-specific N-glycosylation analysis of human alpha-1-acid glycoprotein offers a great potential for new biomarker discovery. *Mol. Cell. Proteomics* 20: 100044.
- Kim EB, Fang X, Fushan AA, Huang Z, Lobanov A V., Han L, i sur. (2011) Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* 479: 223–227.
- Klein A i Roussel P (1998) O-Acetylation of sialic acids. *Biochimie* 80: 49–57.
- Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, i sur. (2009) Variability, heritability and environmental determinants of human plasma n-glycome. *J. Proteome Res.* 8: 694–701.
- Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Adler P, Vilo J, i Peterson H (2023) G:Profiler - interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Res.* 51: W207–W212.
- Kornfeld R i Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 631–664.
- Kosova AA, Kutuzov MM, Evdokimov AN, Ilina ES, Belousova EA, Romanenko SA, i sur. (2019) Poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair synthesis in the extracts of naked mole rat, mouse, and human cells. *Aging (Albany, NY).* 11: 2852–2873.
- Kriehoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, i Weg-Remers S (2017) Cancer – an overview. *Med. Monatsschr. Pharm.* 40: 48–54.
- Krištić J, Zaytseva OO, Ram R, Nguyen Q, Novokmet M, Vučković F, i sur. (2018) Profiling and genetic control of the murine immunoglobulin G glycome. *Nat. Chem. Biol.* 14: 516–524.
- Kronewitter SR, Marginean I, Cox JT, Zhao R, Hagler CD, Shukla AK, i sur. (2014) Polysialylated N-glycans identified in human serum through combined developments in sample preparation, separations, and electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 86: 8700–8710.
- Kumagai T, Palacios A, Casadevall A, García MJ, Toro C, Tiemeyer M, i sur. (2019) Serum IgM glycosylation associated with tuberculosis infection in mice. *MSphere* 4: e00684-18.
- Kurz S, Thieme R, Amberg R, Groth M, Jahnke HG, Pieroh P, i sur. (2017) The anti-tumorigenic activity of A2M—A lesson from the naked mole-rat. *PLoS One* 12: e0189514.
- Larsen MR, Jensen SS, Jakobsen LA, i Heegaard NHH (2007) Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 1778–1787.
- Lee J, Ha S, Kim M, Kim SW, Yun J, Ozcan S, i sur. (2020) Spatial and temporal diversity of glycome expression in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117: 28743–28753.
- Lee JM, Hammarén HM, Savitski MM, i Baek SH (2023) Control of protein stability by post-translational modifications. *Nat. Commun.* 14: 1–16.
- Lewis KN i Buffenstein R (2016) The naked mole-rat: a resilient rodent model of aging, longevity, and healthspan. U: Kaeberlein MR, Martin GM (ur.), *Handbook of the biology of aging*, 8th Ed., Academic Press, 179–204.
- Lin Y-H, Zhu J, Meijer S, Franc V, i Heck AJR (2019) Glycoproteogenomics: A frequent gene polymorphism affects the glycosylation pattern of the human serum fetuin/ α -2-HS-glycoprotein. *Mol. Cell. Proteomics* 18: 1479–1490.

- Lin Z, Lo A, Simeone DM, Ruffin MT, i Lubman DM (2012) An N-glycosylation analysis of human alpha-2-macroglobulin using an integrated approach. *J. Proteomics Bioinform.* 31: 127–134.
- Liu T, Qian WJ, Gritsenko MA, Camp DG, Monroe ME, Moore RJ, i sur. (2005) Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 4: 2070–2080.
- Loewa A, Feng JJ, i Hedtrich S (2023) Human disease models in drug development. *Nat. Rev. Bioeng.* 1: 545–559.
- Lombard J (2016) The multiple evolutionary origins of the eukaryotic N-glycosylation pathway. *Biol. Direct* 11: 1–31.
- López-Otín C i Bond JS (2008) Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 283: 30433–30437.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, i Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194.
- Lovegrove BG i Wissel C (1988) Sociality in molerats: Metabolic scaling and the role of risk sensitivity. *Oecologia* 74: 600–606.
- Lu D, Yang C, i Liu Z (2012) How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: A molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B* 116: 390–400.
- Lutermann H (2022) Socializing in an infectious world: the role of parasites in social evolution of a unique rodent family. *Front. Ecol. Evol.* 10: 879031.
- Mancera-Arteu M, Giménez E, Sancho J, i Sanz-Nebot V (2020) Alterations in the glycan profile of mouse transferrin: new insights in collagen-induced arthritis. *J. Proteome Res.* 19: 1750–1759.
- Maresch D i Altmann F (2016) Isotype-specific glycosylation analysis of mouse IgG by LC-MS. *Proteomics* 16: 1321–1330.
- Marie AL, Gao Y, i Ivanov AR (2024) Native N-glycome profiling of single cells and ng-level blood isolates using label-free capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Nat. Commun.* 15: 1–17.
- del Marmol D, Holtze S, Kichler N, Sahm A, Bihin B, Bourguignon V, i sur. (2021) Abundance and size of hyaluronan in naked mole-rat tissues and plasma. *Sci. Rep.* 11.
- Maurice P, Baud S, Bocharova O V., Bocharov E V., Kuznetsov AS, Kawecki C, i sur. (2016) New insights into molecular organization of human neuraminidase-1: transmembrane topology and dimerization ability. *Sci. Rep.* 6: 1–19.
- McCarthy C, Saldova R, Wormald MR, Rudd PM, McElvaney NG, i Reeves EP (2014) The role and importance of glycosylation of acute phase proteins with focus on alpha-1-antitrypsin in acute and chronic inflammatory conditions. *J. Proteome Res.* 13: 3131–3143.
- Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, i Shakin-Eshleman SH (1998) The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* 37: 6833–6837.
- Messer M (1974) Identification of *N*-acetyl-4-*O*-acetylneuraminyl lactose in echidna milk. *Biochem. J.* 139: 415–420.

- de Mezer M, Rogaliński J, Przewoźny S, Chojnicki M, Niepolski L, Sobieska M, i sur. (2023) SERPINA3: stimulator or inhibitor of pathological changes. *Biomedicines* 11.
- Momčilović A, De Haan N, Hipgrave Ederveen AL, Bondt A, Koeleman CAM, Falck D, i sur. (2020) Simultaneous immunoglobulin A and G glycopeptide profiling for high-throughput applications. *Anal. Chem.* 92: 4518–4526.
- Morimoto N, Nakano M, Kinoshita M, Kawabata A, Morita M, Oda Y, i sur. (2001) Specific distribution of sialic acids in animal tissues as examined by LC-ESI-MS after derivatization with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene. *Anal. Chem.* 73: 5422–5428.
- Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, i Nandi SK (2022) Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab. Anim. Res.* 38.
- Nakano M, Mishra SK, Tokoro Y, Sato K, Nakajima K, Yamaguchi Y, i sur. (2019) Bisecting GlcNAc is a general suppressor of terminal modification of N-glycan. *Mol. Cell. Proteomics* 18: 2044–2057.
- Narayan V, McMahon M, O'Brien JJ, McAllister F, i Buffenstein R (2021) Insights into the molecular basis of genome stability and pristine proteostasis in naked mole-rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 287–314.
- Noel M, Cummings RD, i Mealer RG (2023) N-glycans show distinct spatial distribution in mouse brain. *Glycobiology* 33: 935–942.
- Oh HSH, Rutledge J, Nachun D, Pálovics R, Abiose O, Moran-Losada P, i sur. (2023) Organ aging signatures in the plasma proteome track health and disease. *Nature* 624: 164–172.
- Oka K, Fujioka S, Kawamura Y, Komohara Y, Chujo T, Sekiguchi K, i sur. (2022) Resistance to chemical carcinogenesis induction via a dampened inflammatory response in naked mole-rats. *Commun. Biol.* 5: 287.
- Oka K, Yamakawa M, Kawamura Y, Kutsukake N, i Miura K (2023) The naked mole-rat as a model for healthy aging. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 11: 207–226.
- Olsen EHN, Rahbek-Nielsen H, Thøgersen IB, Roepstorff P, i Enghild JJ (1998) Posttranslational modifications of human inter-alpha-inhibitor: identification of glycans and disulfide bridges in heavy chains 1 and 2. *Biochemistry* 37: 408–416.
- Otaki M, Hirane N, Natsume-Kitatani Y, Nogami Itoh M, Shindo M, Kurebayashi Y, i sur. (2022) Mouse tissue glycome atlas 2022 highlights inter-organ variation in major N-glycan profiles. *Sci. Rep.* 12: 17804.
- Overbergh L, Hilliker C, Lorent K, Van Leuven F, i Van den Berghe H (1994) Identification of four genes coding for isoforms of murinoglobulin, the monomeric mouse α 2-macroglobulin: Characterization of the exons coding for the bait region. *Genomics* 22: 530–539.
- Palmisano G, Lendal SE, Engholm-Keller K, Leth-Larsen R, Parker BL, i Larsen MR (2010) Selective enrichment of sialic acid-containing glycopeptides using titanium dioxide chromatography with analysis by HILIC and mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 5: 1974–1982.
- Pamenter ME, Uysal-Onganer P, Huynh KW, Kraev I, i Lange S (2019) Post-translational deimination of immunological and metabolic protein markers in plasma and extracellular vesicles of naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Int. J. Mol. Sci.* 20: 5378.
- Park SS (2019) Post-glycosylation modification of sialic acid and its role in virus pathogenesis. *Vaccines* 7: 171.

- Park C i Zhang J (2011) Genome-wide evolutionary conservation of N-glycosylation sites. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2351–2357.
- Park DI, Štambuk J, Razdorov G, Pučić-Baković M, Martins-De-Souza D, Lauc G, i sur. (2018) Blood plasma/IgG N-glycome biosignatures associated with major depressive disorder symptom severity and the antidepressant response. *Sci. Rep.* 8: 179.
- Park TJ, Reznick J, Peterson BL, Blass G, Omerbašić D, Bennett NC, i sur. (2017) Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* 356: 307–311.
- Patterson BD i Upham NS (2014) A newly recognized family from the Horn of Africa, the Heterocephalidae (Rodentia: Ctenostryca). *Zool. J. Linn. Soc.* 172: 942–963.
- Peng W, Zhao J, Dong X, Banazadeh A, Huang Y, Hussien A, i sur. (2018) Clinical application of quantitative glycomics. *Expert Rev. Proteomics* 15: 1007–1031.
- Pérez VI, Buffenstein R, Masamsetti V, Leonard S, Salmon AB, Mele J, i sur. (2009) Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 3059–3064.
- Peters TJ (1987) Intracellular precursor forms of plasma proteins: their functions and possible occurrence in plasma. *Clin. Chem.* 33: 1317–1325.
- Pride H, Yu Z, Sunchu B, Mochnick J, Coles A, Zhang Y, i sur. (2015) Long-lived species have improved proteostasis compared to phylogenetically-related shorter-lived species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457: 669–675.
- Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, i sur. (2011) High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol. Cell. Proteomics* 10: M111.010090.
- Puente XS i López-Otín C (2004) A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res.* 14: 609–622.
- Putnam FW (1975) *The plasma proteins: structure, function, and genetic control*. Volume I. 1st Ed, Elsevier Science.
- Raju TS, Briggs JB, Borge SM, i Jones AJS (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: Evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10: 477–486.
- Rappsilber J, Mann M, i Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 28: 1896–1906.
- Reiding KR, Hipgrave Ederveen AL, Rombouts Y, i Wührer M (2016) Murine Plasma N-Glycosylation Traits Associated with Sex and Strain. *J. Proteome Res.* 15: 3489–3499.
- Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, i Novak J (2019) Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 15: 346–366.
- Rinniger A, Richet C, Pons A, Kohla G, Schauer R, Bauer HC, i sur. (2006) Localisation and distribution of *O*-acetylated *N*-acetylneuraminic acids, the endogenous substrates of the hemagglutinin-esterases of murine coronaviruses, in mouse tissue. *Glycoconj. J.* 23: 73–84.
- Rodriguez KA, Edrey YH, Osmulski P, Gaczynska M, i Buffenstein R (2012) Altered composition of liver proteasome assemblies contributes to enhanced proteasome activity in the exceptionally long-lived naked mole-rat. *PLoS One* 7: e35890.

- Rodriguez KA, Valentine JM, Kramer DA, Gelfond JA, Kristan DM, Nevo E, i sur. (2016) Determinants of rodent longevity in the chaperone-protein degradation network. *Cell Stress Chaperones* 21: 453–466.
- Rogals MJ, Eletsky A, Huang C, Morris LC, Moremen KW, i Prestegard JH (2022) Glycan Conformation in the Heavily Glycosylated Protein, CEACAM1. *ACS Chem. Biol.* 17: 3527–3534.
- Ruby JG, Smith M, i Buffenstein R (2024) Five years later, with double the demographic data, naked mole-rat mortality rates continue to defy Gompertzian laws by not increasing with age. *GeroScience* 46: 5321-5341.
- Rudman N, Gornik O, i Lauc G (2019) Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Lett.* 593: 1598–1615.
- Sato C i Kitajima K (2013) Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. *J. Biochem.* 154: 115–136.
- Schaller J (2008) Human blood plasma proteins structure and function. 1st Ed. John Wiley & Sons.
- Schauer R i Kamerling JP (2018) Exploration of the sialic acid world. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 75: 1-213
- Schenk S, Schoenhals GJ, de Souza G, i Mann M (2008) A high confidence, manually validated human blood plasma protein reference set. *BMC Med. Genomics* 1: 41.
- Schiller B, Hykollari A, Yan S, Paschinger K, i Wilson IBH (2012) Complicated N-linked glycans in simple organisms. *Biol. Chem.* 393: 661–673.
- Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, i Clausen H (2020) Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 729–749.
- Schuhmacher L-N, Husson Z, Smith SJ, i Smith ESJ (2015) The naked mole-rat as an animal model in biomedical research: current perspectives. *Open Access Anim. Physiol.* 7: 137–148.
- Seluanov A, Hine C, Azpurua J, Feigenson M, Bozzella M, Mao Z, i sur. (2009) Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 19352–19357.
- Shaw L i Schauer R (1988) The biosynthesis of *N*-Glycoloylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of *N*-acetylneuraminic acid. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 369: 477–486.
- Shen J, Jia L, Dang L, Su Y, Zhang J, Xu Y, i sur. (2021) StrucGP: de novo structural sequencing of site-specific N-glycan on glycoproteins using a modularization strategy. *Nat. Methods* 18: 921–929.
- Shen J, Zhu B, Chen Z, Jia L, i Sun S (2023) Precision Characterization of site-Specific *O*-acetylated sialic acids on N-glycoproteins. *Anal. Chem.* 95: 1995–2003.
- Shen X, Wang C, Zhou X, Zhou W, Hornburg D, Wu S, i sur. (2024) Nonlinear dynamics of multi-omics profiles during human aging. *Nat. Aging* 2024 1–16.
- Shepard A i Kissil JL (2020) The use of non-traditional models in the study of cancer resistance—the case of the naked mole rat. *Oncogene* 39: 5083–5097.

- Šimurina M, de Haan N, Vučković F, Kennedy NA, Štambuk J, Falck D, i sur. (2018) Glycosylation of immunoglobulin G associates with clinical features of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 154: 1320-1333.
- Smith M i Buffenstein R (2021) Managed care of naked mole-rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1319: 381–407.
- Smith ESJ, Omerbašić D, Lechner SG, Anirudhan G, Lapatsina L, i Lewin GR (2011) The molecular basis of acid insensitivity in the African naked mole-rat. *Science* 334: 1557–1560.
- Smith J, Millán-Martín S, Mittermayr S, Hilborne V, Davey G, Polom K, i sur. (2021) 2-Dimensional ultra-high performance liquid chromatography and DMT-MM derivatization paired with tandem mass spectrometry for comprehensive serum N-glycome characterization. *Anal. Chim. Acta* 1179: 338840.
- Šoić D, Keser T, Štambuk J, Kifer D, Pociot F, Lauc G, i sur. (2022) High-throughput human complement C3 N-glycoprofiling identifies markers of early onset type 1 diabetes mellitus in children. *Mol. Cell. Proteomics* 21.
- Springer SA i Gagneux P (2013) Glycan evolution in response to collaboration, conflict, and constraint. *J. Biol. Chem.* 288: 6904–6911.
- Stadlmann J, Helm J, Mereiter S, Oliveira T, Gattinger A, Markovitz D, i sur. (2024) Non-targeted isomer-sensitive N-glycome analysis reveals new layers of organ-specific diversity in mice. *Nat Commun.* 15: 9725.
- Stanley P, Taniguchi N, i Aebi M (2017) N-Glycans, U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH (ur.): *Essentials of glycobiology* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th ed., Chapter 9.
- Stumpo KA i Reinhold VN (2010) The N-glycome of human plasma. *J. Proteome Res.* 9: 4823–4830.
- Szafrański K, Wetzel M, Holtze S, Büntjen I, Lieckfeldt D, Ludwig A, i sur. (2022) The mating pattern of captive naked mole-rats is best described by a monogamy model. *Front. Ecol. Evol.* 10: 855688.
- Takashima S, Tsuji S, i Tsujimoto M (2002) Characterization of the second type of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Gal β 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially: genomic analysis of human sialyltransferase genes. *J. Biol. Chem.* 277: 45719–45728.
- Takasugi M, Firsanov D, Tomblin G, Ning H, Ablueva J, Seluanov A, i sur. (2020) Naked mole-rat very-high-molecular-mass hyaluronan exhibits superior cytoprotective properties. *Nat. Commun.* 11: 1–10.
- Tanaka-Okamoto M, Hanzawa K, Murakami H, Mukai M, Takahashi H, Omori T, i sur. (2022) Occurrence of a D-arabinose-containing complex-type free-N-glycan in the urine of cancer patients. *Sci. Reports* 2022 121 12: 1–10.
- Tanaka K, Aoki-Kinoshita KF, Kotera M, Sawaki H, Tsuchiya S, Fujita N, i sur. (2014) WURCS: The Web3 unique representation of carbohydrate structures. *J. Chem. Inf. Model.* 54: 1558–1566.
- Taylor KR, Milone NA, i Rodriguez CE (2017) Four cases of spontaneous neoplasia in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*), a putative cancer-resistant species. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 72: 38–43.

- Thieme R, Kurz S, Kolb M, Debebe T, Holtze S, Morhart M, i sur. (2015) Analysis of alpha-2 macroglobulin from the long-lived and cancer-resistant naked mole-rat and human plasma. *PLoS One* 10: e0130470.
- Tomblin G, Gigas J, Macoretta N, Zacher M, Emmrich S, Zhao Y, i sur. (2020) Proteomics of long-lived mammals. *Proteomics* 20: 1800416.
- Toustou C, Walet-Balieu ML, Kiefer-Meyer MC, Houdou M, Lerouge P, Foulquier F, i sur. (2022) Towards understanding the extensive diversity of protein N-glycan structures in eukaryotes. *Biol. Rev.* 97: 732–748.
- Traving C i Schauer R (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1330–1349.
- Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, Petrović T, Deriš H, Wuhner M, i sur. (2022) High-throughput glycomic methods. *Chem. Rev.* 122: 15865–15913.
- Urashima T, Inamori H, Fukuda K, Saito T, Messer M, i Oftedal OT (2014) 4-*O*-Acetyl-sialic acid (Neu4,5Ac2) in acidic milk oligosaccharides of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) and its evolutionary significance. *Glycobiology* 25: 683–697.
- Varki A (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology* 27: 3–49.
- Varki A i Kornfeld S (2022) Historical Background and Overview. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH (ur.): *Essentials of glycobiology* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th ed., Chapter 1.
- Varki A, Cummings RD, Aebi M, Packer NH, Seeberger PH, Esko JD, i sur. (2015) Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology* 25: 1323–1324.
- Varki A, Schnaar RL, i Schauer R (2017) Sialic acids and other nonulosonic acids. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH (ur.): *Essentials of glycobiology* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th ed., Chapter 15.
- Visser EA, Moons SJ, Timmermans SBPE, de Jong H, Boltje TJ, i Büll C (2021) Sialic acid *O*-acetylation: from biosynthesis to roles in health and disease. *J. Biol. Chem.* 297: 100906.
- Vreeker GCM, Nicolardi S, Bladergroen MR, Van Der Plas CJ, Mesker WE, Tollenaar RAEM, i sur. (2018) Automated plasma glycomics with linkage-specific sialic acid esterification and ultrahigh resolution MS. *Anal. Chem.* 90: 11955–11961.
- de Vroome SW, Holst S, Gironde MR, van der Burgt YEM, Mesker WE, Tollenaar RAEM, i sur. (2018) Serum N-glycome alterations in colorectal cancer associate with survival. *Oncotarget* 9: 30610–30623.
- Wallace EN, West CA, McDowell CT, Lu X, Bruner E, Mehta AS, i sur. (2024) An N-glycome tissue atlas of 15 human normal and cancer tissue types determined by MALDI-imaging mass spectrometry. *Sci. Rep.* 14: 489.
- Wang F, Xie B, Wang B, i Troy FA (2015) LC-MS/MS glycomic analyses of free and conjugated forms of the sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in human throat cancers. *Glycobiology* 25: 1362–1374.
- Wang JR, Gao WN, Grimm R, Jiang S, Liang Y, Ye H, i sur. (2017) A method to identify trace sulfated IgG N-glycans as biomarkers for rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* 8: 1–14.

- Watanabe Y, Aoki-Kinoshita KF, Ishihama Y, i Okuda S (2021) GlycoPOST realizes FAIR principles for glycomics mass spectrometry data. *Nucleic Acids Res.* 49: D1523–D1528.
- Watarai A, Arai N, Miyawaki S, Okano H, Miura K, Mogi K, i sur. (2018) Responses to pup vocalizations in subordinate naked mole-rats are induced by estradiol ingested through coprophagy of queen's feces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115: 9264–9269.
- Wen J, Xiao J, Rahdar M, Choudhury BP, Cui J, Taylor GS, i sur. (2014) Xylose phosphorylation functions as a molecular switch to regulate proteoglycan biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 15723–15728.
- Woo J i Zhang Q (2023) A streamlined high-throughput plasma proteomics platform for clinical proteomics with improved proteome coverage, reproducibility, and robustness. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 34: 754–762.
- Wu D, Struwe WB, Harvey DJ, Ferguson MAJ, i Robinson C V. (2018) N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115: 8763–8768.
- Wu D, Guo M, i Robinson C V. (2023) Connecting single-nucleotide polymorphisms, glycosylation status, and interactions of plasma serine protease inhibitors. *Chem* 9: 665–681.
- Yamamura Y, Kawamura Y, Oiwa Y, Oka K, Onishi N, Saya H, i sur. (2021) Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells in the subventricular zone of the naked mole-rat brain. *Inflamm. Regen.* 41.
- Yin H, An M, So P kin, Wong MYM, Lubman DM, i Yao Z (2018) The analysis of alpha-1-antitrypsin glycosylation with direct LC-MS/MS. *Electrophoresis* 39: 2351–2361.
- York WS, Agravat S, Aoki-Kinoshita KF, McBride R, Campbell MP, Costello CE, i sur. (2014) MIRAGE: The minimum information required for a glycomics experiment. *Glycobiology* 24: 402–406.
- Yoshimura T, Hayashi A, Handa-Narumi M, Yagi H, Ohno N, Koike T, i sur. (2017) GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. *Sci. Rep.* 7: 1–10.
- Zaytseva OO, Jansen BC, Hanić M, Mrčela M, Razdorov G, Stojković R, i sur. (2018) MIgGGly (mouse IgG glycosylation analysis) - a high-throughput method for studying Fc-linked IgG N-glycosylation in mice with nanoUPLC-ESI-MS. *Sci. Rep.* 8: 13688.
- Zaytseva OO, Freidin MB, Keser T, Štambuk J, Ugrina I, Šimurina M, i sur. (2020) Heritability of human plasma N-glycome. *J. Proteome Res.* 19: 85–91.
- Zhang H, Li X jun, Martin DB, i Aebersold R (2003) Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 21: 660–666.
- Zhang Z, Tian X, Lu JY, Boit K, Ablueva J, Zakusilo FT, i sur. (2023) Increased hyaluronan by naked mole-rat Has2 improves healthspan in mice. *Nature* 621: 196–205.
- Zhang Z, Cui X, Zhou N, Zhu L, Zhi Y, i Zhang S (2024) Influence of plasma collection tubes on N-glycome in human blood samples. *Pract. Lab. Med.* 39: e00383.
- Zhao S, Lin L, Kan G, Xu C, Tang Q, Yu C, i sur. (2014) High autophagy in the naked mole rat may play a significant role in maintaining good health. *Cell. Physiol. Biochem.* 33: 321–332.
- Zhuo L, Hascall VC, i Kimata K (2004) Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J. Biol. Chem.* 279: 38079–38082.

Zielinska DF, Gnad F, Schropp K, Wiśniewski JR, i Mann M (2012) Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery. *Mol. Cell* 46: 542–548.

Zoldoš V, Horvat T, i Lauc G (2013) Glycomics meets genomics, epigenomics and other high throughput omics for system biology studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17: 34–40.

URL1: <https://web.expasy.org/glycomod/> (pristupljeno 29. 07. 2024.)

URL2: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/page/docs> (pristupljeno 10. 02. 2024.)

URL3: <https://glycosmos.org/> (pristupljeno 13. 05. 2024.)

URL4: <http://www.chemspider.com/> (pristupljeno 18. 04. 2024.)

URL5: <https://www.biorender.com/> (pristupljeno 29. 07. 2024.)

URL6: <https://glycopost.glycosmos.org/> (pristupljeno 29. 07. 2024.)

URL7: https://www.si.edu/object/naked-mole-rat%3Anzp_NZP-20111005-157MM (pristupljeno 12. 08. 2024.)

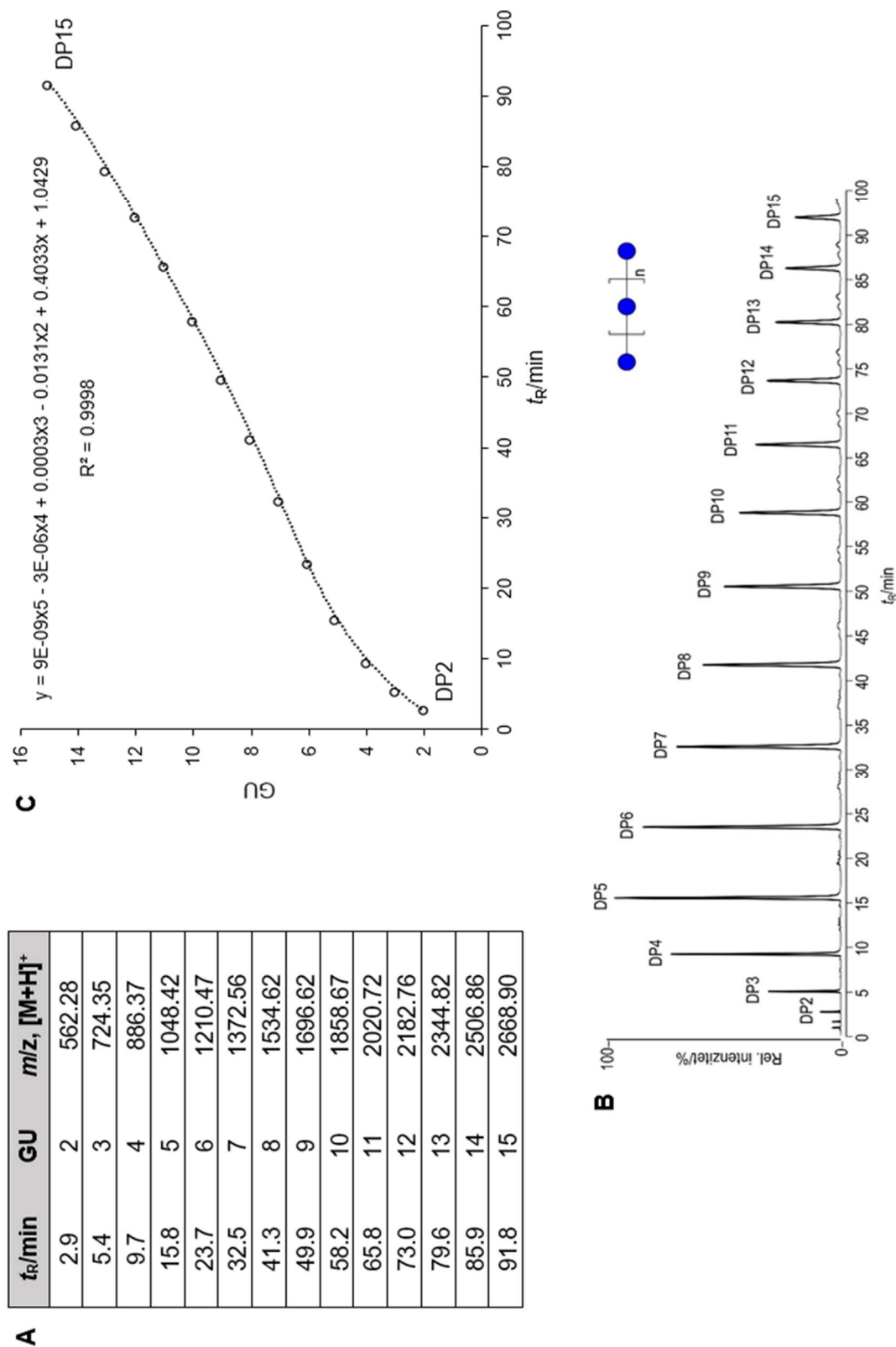
URL8: <https://lsc.org/news-and-social/news/our-naked-mole-rats-had-babiesagain> (pristupljeno 13. 08. 2024.)

URL9: <https://www.the-scientist.com/digging-the-underground-life-40923> (pristupljeno 14. 08. 2024.)

URL10: https://www.antonioolmos.com/gallery-image/Naked-Mole-Rats/G0000o_pI6QOoW3c/I0000hE0Vzc2vqH8 (pristupljeno 12. 08. 2024.)

8. PRILOZI

Prilog 1. Vremena zadržavanja i m/z vrijednosti izomaltooligosaharidá hidroliziranog dekstrana, derivatiziranih s ProA (A). Vrijednosti su određene LC-MS analizom iz kromatograma nakon odjeljivanja na HILIC koloni (B). Iz polinomne funkcije dobivene za Dex-ProA poznatih stupnjeva polimerizacije (DP), izračunavane su glukozne jedinice (GU) N-glikana. Pritom je zapravo $DP = GU$ (C).



Prilog 2. Tablice s popisima anotiranih N-glikana u pojedinim kromatografskim glikanskim pikovima (GP) za frakcije F1; neutralni N-glikani (**A**), F2; monoanionski N-glikani (**B**), F3; dianionski N-glikani (**C**), F4; trianionski N-glikani (**D**) i F5; tetraanionski N-glikani (**E**).

- za svaki N-glikan navedeno je vrijeme zadržavanja (t_R), glukozne jedinice (GU) te apsolutna (Δm) i relativna pogreška mase ($\delta m/m$) izražene u milidaltonima (mDa), odnosno dijelovima na milijun (ppm)
- naboj 1 i adukt H za molekulu M znače $[M+H]^+$, naboj 2 i adukt H+Na znače $[M+H+Na]^{2+}$ itd.
- predloženi sastav N-glikana preuzet je iz računalnog programa GlycoMod uz sljedeće kratice: **Hex** – heksoza (galaktoza, manoza, glukoza), **Man** – manoza, **GlcNAc** – *N*-acetilglukozamin, **Deoxyhexose** – deoksihekzoza (fukoza), **NeuAc** – *N*-acetilneuraminska kiselina, **NeuGc** – *N*-glikolilneuraminska kiselina, **NeuAc2** – 4-*O*-acetil-*N*-acetilneuraminska kiselina (Neu4,5Ac₂), **NeuGc2** – 4-*O*-acetil-5-*N*-glikolilneuraminska kiselina (Neu4Ac5Gc), **Sulph** – sulfatna skupina (-OSO₃⁻)
- broj monosaharida u N-glikanu naveden je prema sljedećim kraticama: **H** – heksoza, **N** – *N*-acetilglukozamin, **F** – fukoza, **S** – *N*-acetilneuraminska kiselina, **G** – *N*-glikolilneuraminska kiselina, **S-Ac** – 4-*O*-acetil-*N*-acetilneuraminska kiselina, **G-Ac** – 4-*O*-acetil-5-*N*-glikolilneuraminska kiselina, **SO₃** – sulfatna skupina

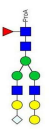
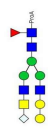
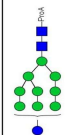
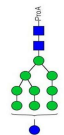
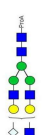
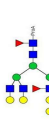
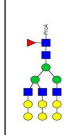
Prilog 2A.

Glikanski pik	t_R (min)	GU	m/z opaženo	m/z izračunato	Δm (mDa)	$\delta m/m$ (ppm)	Naboj	Adukt	Predloženi sastav (GlycoMod)	H N F S G	Predložena struktura (SNFG)	Tip glikana
F1-GP1	7.8	3.51	908.3518	908.3595	-7.70	-8.48	1	Na	(Hex) ₄	4 0 0 0 0		Mano-oligosaharid
F1-GP2	11.6	4.33	1048.4158	1048.4515	-35.70	-34.05	1	H	(Hex) ₅	5 0 0 0 0		Mano-oligosaharid
F1-GP3	12.3	4.46	1317.5455	1317.5890	-43.50	-33.01	1	H	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁	2 3 1 0 0		Kompleksni
F1-GP4	14.0	4.76	1276.5257	1276.5625	-36.80	-28.83	1	H	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁	3 2 1 0 0		Paucimanozni
F1-GP5	15.2	4.95	1333.5423	1333.5839	-41.60	-31.19	1	H	(HexNAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3 4 0 0 0		Kompleksni
F1-GP6	16.7	5.18	1292.5188	1292.5363	-17.50	-13.54	1	H	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂	4 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP7	17.3	5.27	1292.5164	1292.5363	-19.90	-15.40	1	H	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂	4 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP8	18.5	5.43	1479.5941	1479.6207	-26.60	-17.98	1	H	(HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3 3 1 0 0		Kompleksni
F1-GP9	19.7	5.59	1536.6114	1536.6322	-20.80	-13.54	1	H	(HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3 4 0 0 0		Kompleksni
F1-GP10	21.4	5.80	1495.5858	1495.5873	-1.50	-1.00	1	H	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	4 3 0 0 0		Kompleksni
F1-GP11	23.1	6.00	1682.6806	1682.6717	-11.10	-6.60	1	H	(HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3 4 1 0 0		Kompleksni
F1-GP12	25.0	6.21	1454.5620	1454.5607	1.30	0.89	1	H	(Hex) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	5 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP13	25.8	6.30	1885.7408	1885.7411	-0.30	-0.16	1	H	(HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3 5 1 0 0		Kompleksni
F1-GP14	26.7	6.40	1698.6585	1698.6566	1.90	1.12	1	H	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	4 4 0 0 0		Kompleksni
F1-GP15	27.7	6.50	1698.6562	1698.6566	-0.40	-0.24	1	H	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	4 4 0 0 0		Kompleksni
F1-GP16	29.3	6.67	1885.7348	1885.7411	-6.30	-3.34	1	H	(HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	3 5 1 0 0		Kompleksni
F1-GP17	30.3	6.77	1844.7054	1844.7145	-9.10	-4.93	1	H	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	4 4 1 0 0		Kompleksni
F1-GP18	31.4	6.89	1844.7079	1844.7145	-6.60	-3.58	1	H	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	4 4 1 0 0		Kompleksni
F1-GP19	32.0	6.95	1616.6187	1616.6035	15.20	9.40	1	H	(Hex) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	2 6 0 0 0		Visokomanozni

Prilog 2A - nastavak.

F1-GP20	32.9	7.04	1616.6094	1616.6035	5.90	3.65	1	H	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	2 6 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP21	35.3	7.29	1882.6902	1882.6914	-1.20	-0.64	1	H, Na	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 0		Kompleksni
F1-GP22	36.1	7.38	2006.7615	2006.7674	-5.90	-2.94	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 0		Kompleksni
F1-GP23	36.8	7.45	2069.7768	2069.7759	0.90	0.43	1	Na	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4 5 1 0 0		Kompleksni
F1-GP24	38.1	7.59	1819.6775	1819.6729	4.60	2.53	1	H	(Hex)3 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 3 0 0 0		Hibridni
F1-GP25	40.9	7.90	1778.6630	1778.6564	6.60	3.71	1	H	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	7 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP26	41.3	7.94	1778.6627	1778.6564	6.30	3.54	1	H	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	7 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP27	42.2	8.05	2339.8707	2339.8997	-29.00	-12.39	1	H	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2	4 5 3 0 0		Kompleksni
F1-GP28	42.7	8.10	2339.8667	2339.8997	-33.00	-14.10	1	H	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)3 + (Man)3(GlcNAc)2	4 5 3 0 0		Kompleksni
F1-GP29	44.1	8.26	2209.8326	2209.8367	-4.10	-1.86	1	H	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 5 1 0 0		Kompleksni
F1-GP30	46.1	8.50	2151.7919	2151.7949	-3.00	-1.39	1	H	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4 4 1 0 1		Kompleksni
F1-GP31	47.1	8.62	1940.7106	1940.6992	11.40	5.87	1	H	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	8 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP32	49.1	8.86	1940.7106	1940.6992	11.40	5.87	1	H	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	8 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP33	50.4	9.02	2313.8476	2313.8477	-0.10	-0.04	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 1		Kompleksni
F1-GP34	51.8	9.20	2313.8447	2313.8477	-3.00	-1.30	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 1		Kompleksni
F1-GP35	54.1	9.49	2313.8423	2313.8477	-5.40	-2.33	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 1		Kompleksni
F1-GP36	55.0	9.60	2102.7620	2102.7520	10.00	4.76	1	H	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	9 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP37	56.1	9.75	2102.7529	2102.7520	0.90	0.43	1	H	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	9 2 0 0 0		Visokomanozni
F1-GP38	57.5	9.93	2459.9098	2459.9056	4.20	1.71	1	H	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 4 1 1 0		Kompleksni
F1-GP39	58.2	10.02	1360.9923	1361.0171	-24.80	-18.22	2	H	(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2	6 6 2 0 0		Kompleksni

Prilog 2A - nastavak.

F1-GP40	58.7	10.09	2475.8980	2475.9005	-2.50	-1.01	1	H	(Hex)3 (Hex)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6	4	1	0	1		Kompleksni
F1-GP41	59.4	10.18	2516.9196	2516.9271	-7.50	-2.88	1	H	(Hex)2 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5	5	1	0	1		Kompleksni
F1-GP42	60.8	10.37	2264.8083	2264.8232	-14.90	-6.58	1	H	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2	10	2	0	0	0		Visokomanozni
F1-GP43	62.0	10.53	2264.7956	2264.8232	-27.60	-12.19	1	H	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2	10	2	0	0	0		Visokomanozni
F1-GP44	62.7	10.62	2532.9152	2532.9220	-6.80	-2.68	1	H	(Hex)3 (Hex)3 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6	5	0	0	1		Kompleksni
F1-GP45	65.3	10.97	2679.9853	2680.0003	-15.00	-5.60	1	H	(Hex)4 (Hex)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2	7	5	2	0	0		Kompleksni
F1-GP46	72.0	11.89	1429.5182	1429.5276	-9.40	-6.58	2	H	(Hex)6 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	9	5	1	0	0		Kompleksni

Prilog 2B.

Glikanski pik	t_R (min)	GU	m/z opaženo	m/z izračunato	Δm (mDa)	$\delta m/m$ (ppm)	Naboj	Adukt	Predloženi sastav (GlycoMod)	H	N	F	S	G	M	P	Q	Predložena struktura (SNFG)	Tip glikana
F2-GP1	25.3	6.25	1454.5649	1454.5607	4.20	28.87	1	H	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5	2	0	0	0	0	0	0		Visokomanozni
F2-GP2	26.3	6.35	1828.6870	1828.6832	3.80	20.78	1	H	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	4	3	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP3	27.3	6.46	1625.6304	1625.6302	0.20	1.23	1	H	(HexNAc)1 (Deoxyhexose)2 + (Man)3(GlcNAc)2	3	3	2	0	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP4	27.6	6.49	1828.6826	1828.6832	-0.60	-3.28	1	H	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	4	3	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP5	32.4	6.89	2031.7523	2031.7526	-0.30	-1.48	1	H	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	4	4	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP6	33.3	7.09	2031.7527	2031.7526	0.10	0.49	1	H	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	4	4	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP7	34.2	7.18	2193.8099	2193.8054	4.50	20.51	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP8	34.7	7.23	1990.7301	1990.7261	4.00	20.08	1	H	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5	3	0	1	0	0	0	0		Hibridni
F2-GP9	35.4	7.30	1786.6733	1786.6727	0.60	3.36	1	H	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4	3	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP10	36.1	7.38	2177.8149	2177.8105	4.40	20.20	1	H	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	4	4	1	0	1	0	0	0		Kompleksni
F2-GP11	36.1	7.38	1932.7275	1932.7206	6.90	35.70	1	H	(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4	3	1	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP12	36.2	7.39	1802.6655	1802.6576	7.90	43.82	1	H	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4	3	0	0	1	0	0	0		Kompleksni
F2-GP13	36.2	7.39	1989.7523	1989.7420	10.30	51.77	1	H	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4	4	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP14	39.0	7.69	2193.8088	2193.8054	1.40	6.38	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP15	39.6	7.76	2193.8008	2193.8054	-4.60	-20.97	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	0	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP16	42.8	8.09	2339.8655	2339.8633	2.20	9.40	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	1	0	1	0	0	0		Kompleksni
F2-GP17	43.1	8.15	2339.8619	2339.8633	-1.40	-5.98	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	1	0	1	0	0	0		Kompleksni
F2-GP18	46.4	8.53	2355.8556	2355.8583	-2.70	-11.46	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc-Ac)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	1	0	0	1	0	0		Kompleksni
F2-GP19	47.4	8.65	2297.8548	2297.8528	2.00	8.70	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	1	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP20	48.8	8.80	2501.0016	2500.9805	21.10	84.37	1	H	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5	5	1	1	0	0	0	0		Kompleksni
F2-GP21	51.0	9.10	2297.8519	2297.8528	-0.90	-3.92	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5	4	1	1	0	0	0	0		Kompleksni

Prilog 2B - nastavak.

F2-GP22	51.2	9.12	2313.8696	2313.8497	19.90	86.00	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 0 1 0 0		Kompleksni
F2-GP23	52.0	9.22	2313.8653	2313.8497	15.60	67.42	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 0 1 0 0		Kompleksni
F2-GP24	54.3	9.51	2313.8394	2313.8497	-10.30	-44.51	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)3	5 4 1 0 0 1 0 0		Kompleksni
F2-GP25	58.9	10.11	2475.8970	2475.9005	-3.50	-14.14	1	H	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 4 1 0 0 1 0 0		Kompleksni
F2-GP26	59.5	10.19	2516.9264	2516.9217	4.70	18.67	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 5 1 0 0 1 0 0		Kompleksni
F2-GP27	61.2	10.42	2475.8960	2475.9005	-4.50	-18.18	1	H	(Hex)3 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 4 1 0 0 1 0 0		Kompleksni
F2-GP28	62.8	10.63	2532.9146	2532.9220	-7.40	-29.22	1	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 0 0 1 0 0		Kompleksni
F2-GP29	66.5	11.00	2678.9752	2678.9799	-4.70	-17.54	1	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 0 0 1 0 0		Kompleksni

Prilog 2C.

Glikanski pik	t_r (min)	GU	m/z opaženo	m/z izračunato	Δm (mDa)	$\delta m/m$ (ppm)	Naboj	Adukt	Predloženi sastav (GlycoMod)	H N F S G Y Q	Predložena struktura (SNFG)	Tip glikana
F3-GP1	31.6	6.91	2111.7111	2111.7094	1.70	8.05	1	H	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)21 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4 4 0 0 1 0 0 1		Kompleksni
F3-GP2	32.8	7.03	2111.7183	2111.7094	8.90	42.15	1	H	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)21 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4 4 0 0 1 0 0 1		Kompleksni
F3-GP3	34.8	7.24	2568.9251	2568.9220	3.10	12.07	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuAc)31 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 2 0 0 0		Kompleksni
F3-GP4	33.1	7.38	2568.9252	2568.9220	3.20	12.46	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuAc)31 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 1 0 0 0		Kompleksni
F3-GP5	37.7	7.55	2526.9102	2526.9114	-1.20	-4.75	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 2 0 0 0		Kompleksni
F3-GP6	33.6	7.65	2526.9042	2526.9114	-7.20	-28.49	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 2 0 0 0		Kompleksni
F3-GP7	41.7	7.99	2672.9702	2672.9693	0.90	3.37	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 2 0 0 0		Kompleksni
F3-GP8	42.8	8.11	2526.9053	2526.9114	-6.10	-24.14	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 2 0 0 0		Kompleksni
F3-GP9	43.7	8.22	1263.4413	1263.4593	-18.00	-142.47	2	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 2 0 0 0		Kompleksni
F3-GP10	45.2	8.39	2484.9013	2484.9008	0.50	2.01	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuAc)31 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 1 1 0 0 0		Kompleksni
F3-GP11	43.3	8.52	2672.9698	2672.9702	-0.40	-1.50	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 0 2 0 0 0		Kompleksni
F3-GP12	43.6	8.56	2542.8913	2542.9063	-15.00	-58.99	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 (NeuGcAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 1 0 1 0		Kompleksni
F3-GP13	47.3	8.64	2484.9018	2484.9008	1.00	4.02	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 1 1 0 0 0		Kompleksni
F3-GP14	43.0	8.73	1446.5110	1446.5072	3.80	26.27	2	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 (NeuGcAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 1 1 1 0		Kompleksni
F3-GP15	51.2	9.00	2484.8858	2484.9008	-15.00	-60.36	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 1 1 0 0 0		Kompleksni
F3-GP16	51.6	9.05	2484.8843	2484.9008	-16.50	-66.40	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 1 0 0 0 0		Kompleksni
F3-GP17	53.6	9.42	2630.9439	2630.9598	-14.90	-56.63	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 1 1 0 0 0		Kompleksni
F3-GP18	53.9	9.46	2630.9677	2630.9598	8.90	33.83	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 (NeuAc)21 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 1 1 1 0 0 0		Kompleksni
F3-GP19	54.2	9.50	2500.6790	2500.9598	-16.80	-67.16	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 0 1 1 0 0		Kompleksni
F3-GP20	54.2	9.50	2500.8790	2500.9598	-16.80	-67.18	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)21 (NeuGcAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 1 0 0 1 0		Kompleksni
F3-GP21	54.8	9.58	2442.8819	2442.8903	-8.40	-34.39	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 2 0 0 0 0		Kompleksni
F3-GP22	55.6	9.68	2458.8777	2458.8652	-7.50	-30.50	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuGc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 4 0 1 0 1 0 0		Kompleksni

Prilog 2C - nastavak.

F3-GP23	56.2	9.76	1519.5350	1519.5544	-19.40	-127.67	1	H	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP24	57.4	9.92	1323.9675	1323.9907	-23.20	-175.23	2	H	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP25	58.1	10.01	2442.8744	2442.8903	-15.90	-66.09	1	H	(Hex)2 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP26	60.0	10.26	2850.0165	2850.0330	-16.50	-57.89	1	H	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP27	60.9	10.38	2662.9396	2662.9486	-9.00	-33.80	1	H	(Hex)2 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP28	61.2	10.42	2588.9379	2588.9482	-10.30	-39.78	1	H	(Hex)2 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP29	62.8	10.63	1311.4593	1311.4828	-23.50	-179.19	2	H	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP30	63.4	10.72	1509.5197	1509.5003	19.40	126.52	2	H+Na	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP31	64.7	10.89	2604.9351	2604.9431	-8.00	-30.71	1	H	(Hex)2 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 (NeuGc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP32	67.3	11.24	1405.0025	1405.0251	-22.60	-160.85	2	H+Na	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP33	68.0	11.34	2620.9453	2620.9380	7.30	27.65	1	H	(Hex)2 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP34	69.6	11.56	2955.0847	2955.1008	-16.10	-54.48	2	H	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)3 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP35	70.6	11.70	1515.0304	1515.0542	-23.80	-157.09	2	H	(Hex)4 (Hex)3 (Deoxyhexose)2 (NeuGc-Ac)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP36	72.1	11.90	1413.0047	1413.0043	0.40	2.83	2	H	(Hex)3 (Hex)3 (Hex)3 (Deoxyhexose)1 (NeuGc-Ac)2 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni
F3-GP37	77.3	12.64	1493.5229	1493.5453	-22.40	-149.98	1	H	(Hex)4 (Hex)3 (Deoxyhexose)2 (NeuGc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2		Kompleksni

Prilog 2D.

Glikanski pik	t_R (min)	GU	m/z opaženo	m/z izračunato	Δm (mDa)	δm (ppm)	Naboj	Adukt	Predloženi sastavi (GlycoMod)	H N F S G Y O	Predložena struktura (SNFG)	Tip glikana
F4-GP1	51.7	9.18	1613.0687	1613.0784	-19.70	-122.13	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)23 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 0 3 0 0 0		Kompleksni
F4-GP2	54.5	9.54	1686.0846	1686.1074	-22.80	-135.22	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)23 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 0 3 0 0 0		Kompleksni
F4-GP3	57.5	9.93	1613.0594	1613.0784	-19.00	-117.79	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)23 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 0 3 0 0 0		Kompleksni
F4-GP4	58.8	10.10	1592.0547	1592.0731	-18.40	-115.57	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)21 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 1 2 0 0 0		Kompleksni
F4-GP5	60.1	10.27	1686.0802	1686.1074	-27.20	-161.32	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)23 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 0 3 0 0 0		Kompleksni
F4-GP6	60.9	10.38	1632.0493	1632.0669	-17.60	-107.84	2	HNa	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)22 (NeuGlc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 0 2 0 1 0		Kompleksni
F4-GP7	61.4	10.45	1676.0723	1676.0931	-20.80	-124.10	2	HNa	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)23 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 1 2 0 0 0		Kompleksni
F4-GP8	62.7	10.62	1795.6157	1795.6445	-28.80	-160.39	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)23 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 0 3 0 0 0		Kompleksni
F4-GP9	63.4	10.72	1592.0514	1592.0731	-21.70	-136.30	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)22 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 1 2 0 0 0		Kompleksni
F4-GP10	64.5	10.86	1592.0514	1592.0731	-21.70	-136.30	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)22 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 1 2 0 0 0		Kompleksni
F4-GP11	66.0	11.07	1665.0778	1665.1021	-24.30	-145.94	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)23 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 1 2 0 0 0		Kompleksni
F4-GP12	70.3	11.66	1571.0430	1571.0679	-24.90	-158.49	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)21 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 2 1 0 0 0		Kompleksni
F4-GP13	71.7	11.85	1644.0738	1644.0968	-23.00	-138.89	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)21 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 2 1 0 0 0		Kompleksni
F4-GP14	72.9	12.02	1774.6105	1774.6392	-28.70	-161.72	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)22 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 1 2 0 0 0		Kompleksni
F4-GP15	73.5	12.10	1579.0439	1579.0653	-21.40	-135.52	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)1 (NeuAc)21 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 1 1 1 0 0		Kompleksni
F4-GP16	74.2	12.20	1774.6103	1774.6392	-28.90	-162.85	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)22 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 1 2 0 0 0		Kompleksni

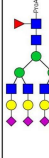
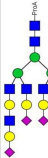
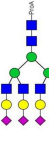
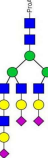
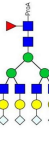
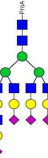
Prilog 2D - nastavak.

F4-GP17	75.3	12.35	1847.6347	1847.6682	-33.50	-181.31	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 1 1 2 0 0 0	Kompleksni
F4-GP18	75.8	12.42	1978.1974	1978.2106	-13.20	-66.73	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 0 0 3 0 0 0	Kompleksni
F4-GP19	76.2	12.48	1550.0422	1550.0626	-20.40	-131.61	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 0 3 0 0 0 0	Kompleksni
F4-GP20	78.4	12.80	1623.0667	1623.0915	-24.80	-152.79	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 3 0 0 0 0	Kompleksni
F4-GP21	79.5	12.96	1753.6033	1753.6340	-30.70	-175.07	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 2 1 0 0 0	Kompleksni
F4-GP22	80.7	13.14	1957.1677	1957.2053	-37.60	-192.11	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 0 1 2 0 0 0	Kompleksni
F4-GP23	81.5	13.26	1631.0696	1631.0890	-19.40	-118.94	2	H	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 5 1 2 0 1 0 0	Kompleksni
F4-GP24	86.0	13.97	1732.6038	1732.6587	-54.90	-316.85	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 3 0 0 0 0	Kompleksni
F4-GP25	86.8	14.11	1936.1648	1936.2001	-35.30	-182.32	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 0 2 1 0 0 0	Kompleksni

Prilog 2E.

Gljivarski pik	t_R (min)	GU	m/z opaženo	m/z izračunato	Δm (mDa)	δm (ppm)	Naboj	Adukt	Predloženi sastavi (GlycoMoc)	H N F S G O S	Predložena struktura (SNFG)	Tip glikana
F5-GP1	43.8	8.23	2806.8599	2806.8682	-8.30	-3184	1	H	{Hex}2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 3 0 0 2 0 0 1		Kompleksni
F5-GP2	46.8	8.58	1376.9461	1376.9667	-20.60	-149.60	2	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 3 1 0 2 0 0 1		Kompleksni
F5-GP3	47.2	8.63	2622.8645	2622.8631	1.40	5.34	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuGlcAc)1 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 3 0 0 1 0 1 1		Kompleksni
F5-GP4	51.1	9.11	2564.8495	2564.8577	-8.20	-3197	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuAc)1 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 3 0 1 1 0 0 1		Kompleksni
F5-GP5	55.1	9.62	2580.8348	2580.8526	-17.80	-66.97	1	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuGc) (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 3 0 0 1 0 1 1		Kompleksni
F5-GP6	56.6	9.81	1486.4829	1486.5038	-20.90	-140.60	2	H+Na	(Hex)3 (HexNAc)3 (Neu5Ac)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6 4 0 0 1 0 0 1		Kompleksni
F5-GP7	56.5	10.06	1334.9440	1334.9561	-12.10	-90.64	2	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 3 1 2 0 0 0 1		Kompleksni
F5-GP8	64.8	10.90	1350.9417	1350.9511	-9.40	-66.58	2	H	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	5 3 1 0 2 0 0 1		Kompleksni
F5-GP9	68.4	11.53	1962.1568	1962.1975	-40.70	-207.42	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 0 4 0 0 0		Kompleksni
F5-GP10	71.3	11.79	2035.1752	2035.2265	-51.30	-252.06	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 1 0 4 0 0 0		Kompleksni
F5-GP11	72.2	11.92	1970.1475	1970.1950	-47.50	-241.09	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 0 3 0 1 0		Kompleksni
F5-GP12	74.9	12.30	1941.1512	1941.1922	-41.00	-211.21	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 1 3 0 0 0		Kompleksni
F5-GP13	76.8	12.57	2144.7259	2144.7636	-37.70	-175.78	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 0 0 4 0 0 0		Kompleksni
F5-GP14	77.7	12.70	2123.7145	2123.7583	-43.80	-208.24	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 0 1 3 0 0 0		Kompleksni
F5-GP15	80.2	13.06	1920.1520	1920.1870	-35.00	-182.27	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)2 (Sulph)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 2 2 0 0 0		Kompleksni
F5-GP16	84.2	13.88	1899.1523	1899.1817	-29.40	-154.80	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 3 1 0 0 0		Kompleksni

Prilog 2E - nastavak.

F5-GP17	85.0	13.81	1951.1737	1951.2063	-31.60	-161.95	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 1 4 0 0 0 0		Kompleksni
F5-GP18	87.4	14.21	2102.7165	2102.7531	-37.60	-178.81	2	H+Na	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 1 2 2 0 0 0		Kompleksni
F5-GP19	89.8	14.64	1878.1331	1878.1764	-23.30	-124.06	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 0 4 0 0 0 0		Kompleksni
F5-GP20	91.9	15.05	2081.7136	2081.7478	-34.20	-164.29	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)1 (NeuAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 1 3 1 0 0 0		Kompleksni
F5-GP21	94.3	15.55	1983.1629	1983.1962	-32.30	-162.87	2	H	(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuGcH)4 + (Man)3(GlcNAc)2	7 6 1 0 0 4 0 0		Kompleksni
F5-GP22	94.5	15.60	2060.7131	2060.7425	-29.40	-142.67	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (NeuAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 0 4 0 0 0 0		Kompleksni
F5-GP23	94.8	15.67	2165.7460	2165.7613	-16.30	-75.26	2	H	(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuGcH)4 + (Man)3(GlcNAc)2	8 7 1 0 0 4 0 0		Kompleksni

Prilog 3. Rezultati neclijane glikoproteomske analize sijaloglikopeptida afinitetno pročišćenih na TiO₂ nakon obrade podataka u računalnom programu ProteomeDiscoverer. Za svaki identificirani glikoprotein navedeni su: (1) jedinstveni pristupni broj iz baze sastavljenih gena NCBI (*H. glaber*, Taxonomy ID: 10181); (2) naziv proteina na engleskom i predloženi naziv na hrvatskom jeziku; (3) pokrivenost aminokiselinske sekvence MS/MS spektrima (%) izračunata iz broja sekvenciranih triptičkih peptida. Rezultati su poredani prema rastućoj molekularnoj masi proteina (kDa) i za svaki protein navedena je njegova teor. izoelektrična točka (pI).

Pristupni broj ¹	Protein (engl.) ²	Protein (hrv.) ²	Pokrivenost sekvence (%) ³	Br. aminokiselina u proteinu	Br. sekvenciranih peptida	m/kDa	pI (teor.)
EHA97847.1	Apolipoprotein D	Apolipoprotein D	12	189	1	21.4	4.93
EBH12511.1	Alpha-2-HS-glycoprotein	Alfa-2-HS-glikoprotein	29	360	6	38.6	6.51
EBH12510.1	Fetuin-B	Fetuin-B	8	382	1	42.1	6.64
EBH04107.1	Alpha-1-antiproteinase S	Alfa-1-antiproteinaza S	17	415	3	46.1	6.48
EBH04102.1	Alpha-1-antichymotrypsin	Alfa-1-antikimotripsin	9	426	2	47.4	6.21
EBH17043.1	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	Fosfatidilkolin-sterol O-aciltransferaza	5	438	1	49.6	5.66
EBH10927.1	Ig mu chain C region membrane-bound form, partial	Ig mu lanac, C-regija, membranski vezana forma	4	460	2	50.3	5.99
EBH10522.1	Fibrinogen gamma chain	Fibrinogen, γ-lanac	10	451	3	50.9	6.28
EBH10524.1	Fibrinogen beta chain	Fibrinogen, β-lanac	21	478	6	53.9	7.58
EBH10156.1	Plasma protease C1 inhibitor	C1-inhibitor plazmatičkih proteaza	9	513	1	56.4	8.18
EBH02488.1	Pancreatic alpha-amylase	Pankreatska alfa-amilaza	6	511	1	57.5	6.87
EBH10383.1	Coagulation factor XIII B chain	Faktor koagulacije XIII, B-lanac	3	603	1	68.5	6.68
EBH1147.1	Inhibitor of carbonic anhydrase	Inhibitor karbonatne dehidrataze	3	642	1	70.4	6.74
EBH12508.1	Kininogen-1	Kininogen-1	8	643	3	71.7	6.27
EBH12994.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac H3	2	885	2	98.9	5.63
EBH12995.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac H4	4	920	1	102.2	6.3
EBH12272.1	Ceruloplasmin	Ceruloplazmin	7	978	4	111.7	5.45
EBH11232.1	Alpha-2-macroglobulin	Alfa-2-makroglobulin	6	1595	6	175.3	6.89
EBH18757.1	Coagulation factor V	Faktor koagulacije V	1	2099	1	237	5.81
EBH08825.1	Fibronectin	Fibronektin	2	2477	2	272.4	5.55

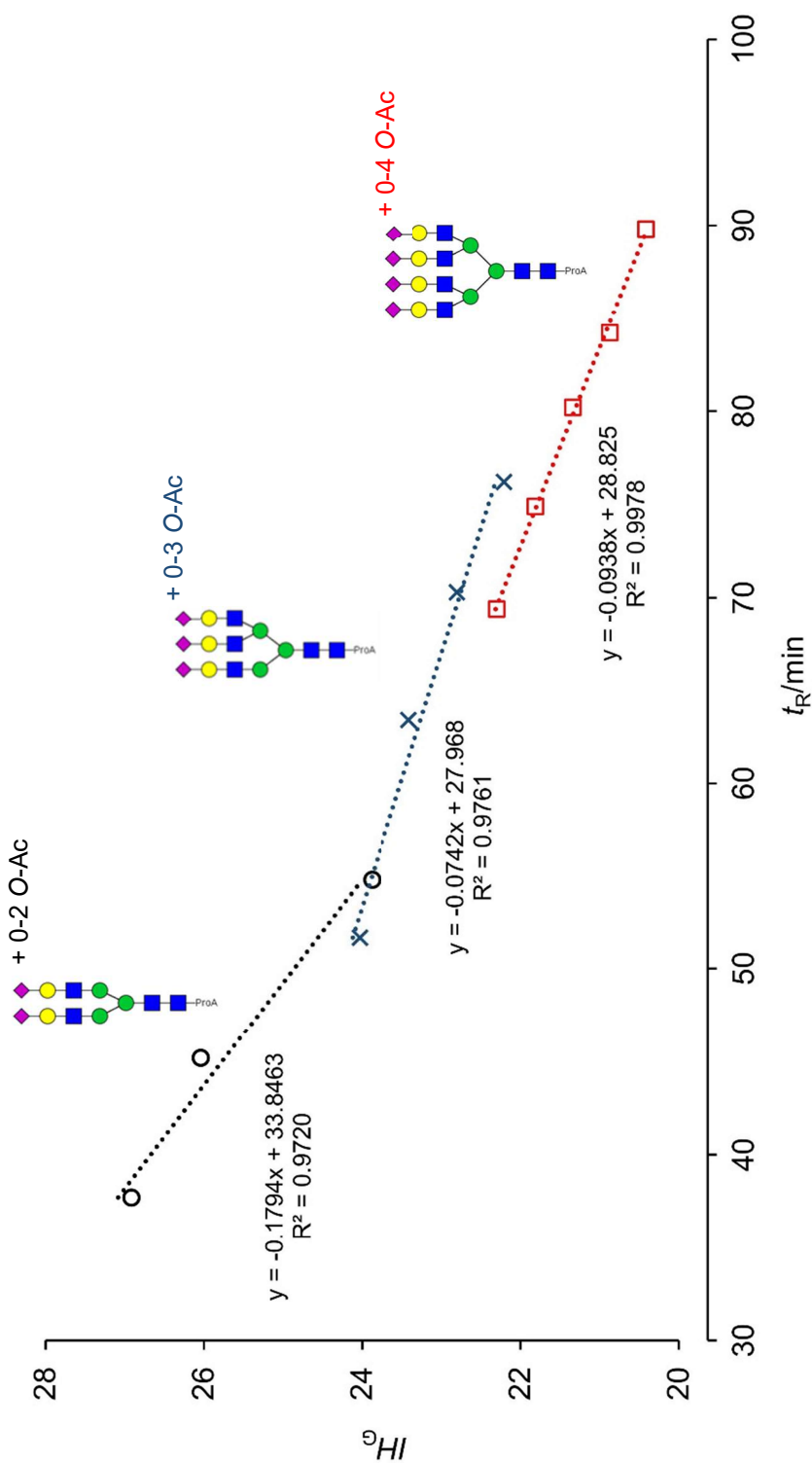
Prilog 4. Rezultati analize obogaćivanja genske ontologije provedene pomoću računalnog programa gProfiler. Svaki temin (klasa) GO ima jedinstvenu oznaku (identifikator) i svoju veličinu određenu brojem genskih produkata koji spadaju u kategoriju molekulske funkcije, stanične komponente i/ili biološkog procesa (1). Analiza obogaćivanja GO iz zadanog upita (2) koji je predstavljen popisom proteina GŠ, prema broju preklapanja (3) traži koji su termini statistički značajno obogaćeni i otkriva kojoj kategoriji pojedini protein iz upita pripada. Osim pojedinačnih termina, pretragom KEGG baze podataka moguće je otkriti i kojem biokemijskom putu pripadaju nepoznati proteini.

Oznaka termina GO	Termin GO (engl.)	Termin GO (hrv.)	Veličina termina GO ¹	Veličina upita ²	Broj preklapanja ³	P _{adj}	-log ₁₀ (p _{adj})	Preklapajući geni
GO:0061134	Peptidase Regulator Activity	Aktivnost regulatora peptidaza	136	7	7	3.18E-13	12.497536	SERPINA3, FN1, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0004866	Endopeptidase Inhibitor Activity	Aktivnost inhibitora endopeptidaza	98	7	6	3.64E-11	10.438734	SERPINA3, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0061135	Endopeptidase Regulator Activity	Aktivnost regulatora endopeptidaza	107	7	6	6.25E-11	10.204199	SERPINA3, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0030414	Peptidase Inhibitor Activity	Aktivnost inhibitora peptidaza	111	7	6	7.83E-11	10.106387	SERPINA3, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0004857	Enzyme Inhibitor Activity	Aktivnost inhibitora enzima	212	7	6	4.04E-09	8.394001	SERPINA3, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0140678	Molecular Function Inhibitor Activity	Aktivnost inhibitora molekularnih funkcija	260	7	6	1.39E-08	7.857547	SERPINA3, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0030234	Enzyme Regulator Activity	Aktivnost regulatora enzima	732	7	7	4.73E-08	7.325072	SERPINA3, FN1, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0005615	Extracellular Space	Izvanstanični prostor	518	6	6	3.03E-07	6.518900	SERPINA3, FN1, A2M, KNG1, FETUB, AHSG
GO:0098772	Molecular Function Regulator Activity	Aktivnost regulatora molekularnih funkcija	1156	7	7	1.17124E-06	5.931353	SERPINA3, FN1, A2M, KNG1, FETUB, AHSG, ITIH3
GO:0005576	Extracellular Region	Izvanstanična regija	894	6	6	8.09963E-06	5.091535	SERPINA3, FN1, A2M, KNG1, FETUB, AHSG
GO:0004869	Cysteine-Type Endopeptidase Inhibitor Activity	Aktivnost inhibitora endopeptidaza Cys-tipa	22	7	3	9.02977E-06	5.044324	KNG1, FETUB, AHSG
KEGG:04610	Complement And Coagulation Cascades	Komplement i koagulacijska kaskada	44	4	3	0.000138042	3.859988	SERPINA1, A2M, KNG1
GO:0004867	Serine-Type Endopeptidase Inhibitor Activity	Aktivnost inhibitora endopeptidaza Ser-tipa	59	7	3	0.000189293	3.722866	SERPINA3, A2M, ITIH3

Prilog 5. Rezultati cilijane (strukturne) glikoproteomske analize sijaliglikopeptida afinitetno pročišćenih na TiO₂ nakon obrade podataka u računalnom programu GlycoDecipher. Predloženi sastav identificiranih N-glikana s O-Ac-Sia preuzet je iz računalnog programa GlycoDecipher uz sljedeće kratice: **Hex** – heksoza, **HexNac** – N-acetilglukozamin, **Fuc** – fukoza, **NeuAc** – N-acetilneuraminska kiselina, **NeuGc** – N-glikolilneuraminska kiselina, **Ac** – O-acetilna kupina.

Protein	Peptid	N-glikozilacijsko mjesto	Glikan ¹
Alfa-1-antiproteinaza S	NHYHAEAFPVNFSNPEDAVK	N167	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(2)Fuc(1)Ac(1)
Alfa-1-antiproteinaza S	NHYHAEAFPVNFSNPEDAVK	N167	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(1)NeuGc(1)Ac(1)
Alfa-1-antiproteinaza S	NHYHAEAFPVNFSNPEDAVK	N167	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(2)
Alfa-2-makroglobulin	GCLLSQLNETVAVR, Karbamidometil (+57.02)	N55	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(1)Ac(1)
Fibrinogen, β-lanac	GTAGNALIEGASQLVGENR	N381	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(1)Ac(1)
Fibrinogen, β-lanac	GTAGNALIEGASQLVGENR	N381	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(2)Fuc(1)Ac(1)
Fibrinogen, γ-lanac	DLQALEDFHDAENKTTETK	N78	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(1)NeuGc(1)Ac(1)
Fibrinogen, γ-lanac	DLQALEDFHDAENKTTETK	N78	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(2)Fuc(1)Ac(1)
Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac H3	NAQGEEKENLTAQALDLSLK	N580	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(1)
Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac H4	NAQGEEKENLTAQALDLSLK	N580	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(2)
Kininogen-1	SPELESILTHGIQHFNNNTK	N169	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(1)
Kininogen-1	VVHAADAALAAAFNAQNNNGSYFK	N176	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(1)
Kininogen-1	SPELESILTHGIQHFNNNTK	N169	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(2)
Kininogen-1	VVHAADAALAAAFNAQNNNGSYFK	N176	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(2)Fuc(1)Ac(1)
Kininogen-1	SPELESILTHGIQHFNNNTK	N169	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(2)NeuGc(1)Ac(1)
Kininogen-1	SPELESILTHGIQHFNNNTK	N169	Hex(7)HexNac(6)NeuAc(4)Ac(2)
Kininogen-1	VVHAADAALAAAFNAQNNNGSYFK	N176	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(2)
Kininogen-1	VVHAADAALAAAFNAQNNNGSYFK	N176	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Fuc(1)Ac(1)
Kininogen-1	FNSNNQSSNQFVLR	N52	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Ac(1)
Kininogen-1	VVHAADAALAAAFNAQNNNGSYFK	N176	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(2)NeuGc(1)Ac(1)
Kininogen-1	VVHAADAALAAAFNAQNNNGSYFK	N176	Hex(5)HexNac(4)NeuAc(2)Fuc(1)Ac(2)
Kininogen-1	VVHAADAALAAAFNAQNNNGSYFK	N176	Hex(6)HexNac(5)NeuAc(3)Fuc(1)Ac(2)

Prilog 6. Indeks hidrofobnosti N-glikana (IH_G) i vrijeme zadržavanja (t_R) na HILIC nepokretnoj fazi su u linearnom odnosu ovisno o broju O-acetilnih skupina u sijaloglikanu. Za primjere su uzete di-, tri- i tetraantenarne strukture sastava $H_{5-7}N_{4-6}S_{2-4}$ i njihovi analozi s 1-2, 1-3 i 1-4 Neu5Ac₂. Točke s najvišim vrijednostima IH_G na pravcu pripadaju strukturama s najviše O-Ac skupina. To su ujedno i najhidrofobniji analiti i kao najslabije zadržani eluiraju najranije.



9. ŽIVOTOPIS

Siniša Habazin rođen je 11. listopada 1990. u Zagrebu gdje je završio osnovnu i srednju školu. Diplomirao je 2014. na studiju Znanosti o okolišu pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2016. do 2017. radio je kao vježbenik iz područja forenzičke toksikologije u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ministarstva unutarnjih poslova i stekao znatno praktično iskustvo u instrumentnoj analitici s naglaskom na metode plinske i tekućinske kromatografije. Početkom 2017. položio je Državni stručni ispit nakon čega se zapošljava kao viši tehničar u Laboratoriju za biomimetičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu gdje je bio zadužen za provođenje ugovornih analiza, razvoj kromatografskih analitičkih metoda i održavanje instrumenata. Laboratoriju za spektrometriju masa tvrtke Genos d.o.o. pridružio se u srpnju 2018. godine kao istraživač-doktorand. Akademske godine 2020./2021. upisuje doktorski studij biologije i svoj interes za neobične organizme usmjerava na glikobiologiju golokrtičastog štakora kao animalnog modela u istraživanju dugovječnosti i starenja. Uz to se bavi i analizom glikozilacije različitih proteina, posebice imunoglobulina, iz bioloških uzoraka poput krvne plazme, mlijeka i kože. Do sada je objavio sedam izvornih znanstvenih radova, jedno poglavlje u knjizi i više priopćenja na međunarodnim znanstvenim skupovima, te je neposredni voditelj jednog diplomskog rada.