

Stabilnost N-glikoma ljudske plazme

Mavrinac, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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:217:237353>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2020-10-29**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Marina Mavrinac

Stabilnost N-glikoma ljudske plazme

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj rad, izrađen u Genosu d.o.o., pod vodstvom dr. sc. Gordana Lauca, predan je na ocjenu
Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi
stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Prof. dr. sc. Gordanu Laucu, voditelju rada, zahvaljujem na ukazanom povjerenju i susretljivosti tijekom izrade rada.

Prof. dr. sc. Mirjani Pavlici, suvoditeljici, zahvaljujem na kritičkom pregledu rada.

Ani Knežević, dipl. ing., zahvaljujem na strpljenju i savjetima tijekom izrade rada te nesebičnoj pomoći na putu do diplome.

Hvala mojem dečku, mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja i izrade rada!

SADRŽAJ

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA _____	IV
BASIC DOCUMENTATION CARD _____	V
1. UVOD _____	1
1.1. ŠTO SU GLIKANI? _____	1
1.2. NA INI ANALIZE N-GLIKANA _____	3
1.3. PROMJENE N-GLIKANA KOD BOLESTI _____	5
2. CILJ RADA _____	8
3. MATERIJALI I METODE _____	9
3.1. MATERIJALI _____	9
3.1.1. Uzorci _____	9
3.2. METODE _____	10
3.2.1. Redukcija glikoproteina _____	10
3.2.2. Alkilacija glikoproteina _____	10
3.2.3. Imobilizacija glikoproteina u gelu _____	10
3.2.4. Ispiranje gelova _____	10
3.2.5. Digestija PNGazom F _____	11
3.2.6. Elucija oslobo enih glikana sa gelova _____	11
3.2.7. Tretman formijatnom kiselinom _____	11
3.2.8. Fluorescentno obilježavanje sa 2-AB-om _____	11
3.2.9. Priprema za ispiranje nevezanog 2-AB-a _____	11
3.2.10. Ispiranje nevezanog 2-AB-a _____	12
3.2.11. Elucija 2-AB glikana _____	12
3.2.12. Teku inska kromatografija visoke djelotvornosti _____	12
3.2.13. Statisti ka analiza _____	13
4. REZULTATI _____	14
5. RASPRAVA _____	17
6. ZAKLJU AK _____	20
7. LITERATURA _____	21

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

STABILNOST N-GLIKOMA LJUDSKE PLAZME

Marina Mavrinac

Genos d.o.o., Planinska 1, Zagreb, Hrvatska

N-glikani su šećerne komponente glikoproteina i imaju su biološke funkcije za organizam vrlo važne te ponekad i esencijalne. Kod raznih bolesti (tumori, urogenitalne poremećaji glikozilacije, upalne bolesti) i stanja (alkoholizam), strukture glikana mogu biti izmijenjene, što može dovesti do funkcionalnih promjena glikoproteina. Dijagnostički potencijal glikanskih struktura je vrlo velik, međutim, da bi se omogućilo korištenje glikana kao bioloških markera, potrebno je ispitati dolazi li do tih promjena i u zdravom organizmu pri uobičajenim fiziološkim uvjetima. Tekući inskom kromatografijom visoke djelotvornosti ispitana je stabilnost glikana ljudske plazme na uzorku od 12 zdravih osoba (6 muškaraca i 6 žena). Dobiveni rezultati pokazali su vrlo veliku stabilnost N-glikoma unutar kraćeg perioda, što daje osnovu za daljnja istraživanja N-glikana u smjeru korištenja istih u dijagnostici. (23 stranice, 7 slika, 1 tablica, 17 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: strukture glikana, poremećaji glikozilacije, biološki markeri, dijagnostika

Voditelj: Prof. dr. sc. Gordan Lauc

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Doc. dr. sc. Željka Vidaković -Cifrek

Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Rad prihvaćen: 15. rujna 2010.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

HUMAN PLASMA N-GLYCOME STABILITY

Marina Mavrinac

Genos d.o.o., Planinska 1, Zagreb, Croatia

N-glycans are carbohydrate parts of glycoproteins that play very important and sometimes even essential biological roles in an organism. In various diseases (tumors, congenital disorders of glycosylation, inflammation) and conditions (alcoholism), glycan structures can be changed, which can lead to functional changes of glycoproteins. Diagnostic potential of glycan structures is very high, but, in order to provide the use of glycans as biomarkers, it is necessary to examine if these changes occur in a healthy individual during normal physiological conditions. Stability of human plasma N-glycome was examined by high performance liquid chromatography in 12 healthy individuals (6 males and 6 females). Results obtained in this research show very high N-glycome stability during a short period of time, which gives a firm basis for future research aiming to use glycans in diagnostics. (23 pages, 7 figures, 1 table, 17 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: glycan structures, disorders of glycosylation, biomarkers, diagnostics

Supervisor: Prof. dr. sc. Gordan Lauc

Reviewers: Assoc. prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Asst. prof. dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek

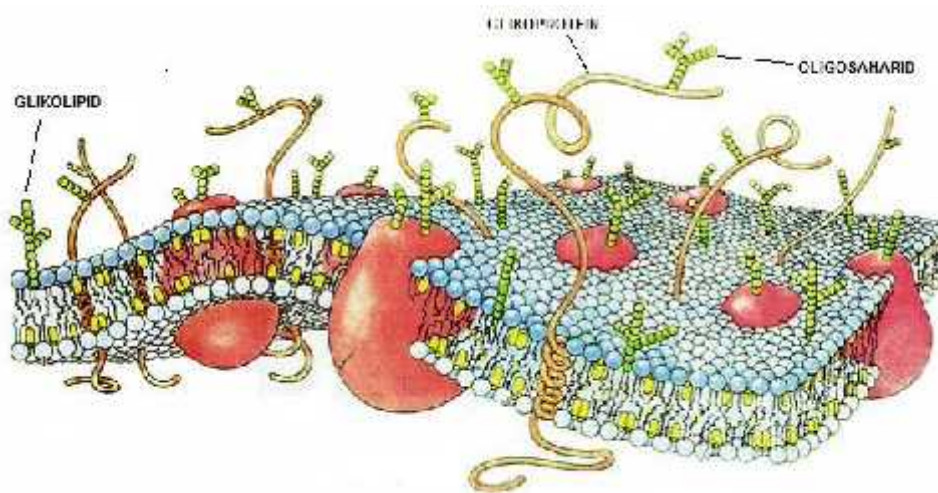
Prof. dr. sc. Dubravka Hranilovi

Thesis accepted: September 15th 2010

1. UVOD

1.1. ŠTO SU GLIKANI?

Membrane eukariotskih stanica, pa tako i ljudskih, građene su od lipidnog dvosloja i proteina uronjenih u taj dvosloj. Sa vanjske strane membrane na te molekule mogu biti vezane i šećerne komponente – glikani (Slika 1.1.). To su oligosaharidi koji, vezani na gore navedene molekule, čine glikokonjugate (glikolipide i glikoproteine). Osim na površinske, glikani mogu biti vezani i na unutarstanične te sekretorne proteine.



Slika 1.1. Prikaz stanične membrane građene od lipida i proteina sa glikanima vezanim na te molekule. (Preuzeto sa www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/rp//biology/cell_membrane.html)

Biološke funkcije glikana mogu se podijeliti u dvije grupe: prvu grupu čine strukturne i modulatorne funkcije, a drugu razne adhezivne funkcije. Glikani su uključeni u pravilno smatanje proteina u endoplazmatskom retikulumu, čime utječu na njihovu konformaciju i topivost, a važni su i za pravilno usmjeravanje proteina. U nekim primjerima vidi se i zaštitna uloga glikana: glikokaliks na površini stanica predstavlja svojevrsnu fizičku barijeru; glikani vezani na molekule izvanstaničnog matriksa su važni za održavanje strukture, poroznosti i cjelovitosti tkiva; a položaj glikana s vanjske strane glikoproteina može zaštititi taj protein od djelovanja proteaza ili antitijela. Glikani mogu i modulirati interakcije između proteina i

liganda i to na in da se primarna funkcija proteina podešava, a ne isklju uje / uklju uje. Npr., neki hormon se deglikozilira, pri emu se još uvijek može vezati na svoj receptor gotovo istim afinitetom, ali ne može pokrenuti daljnji prijenos signala.

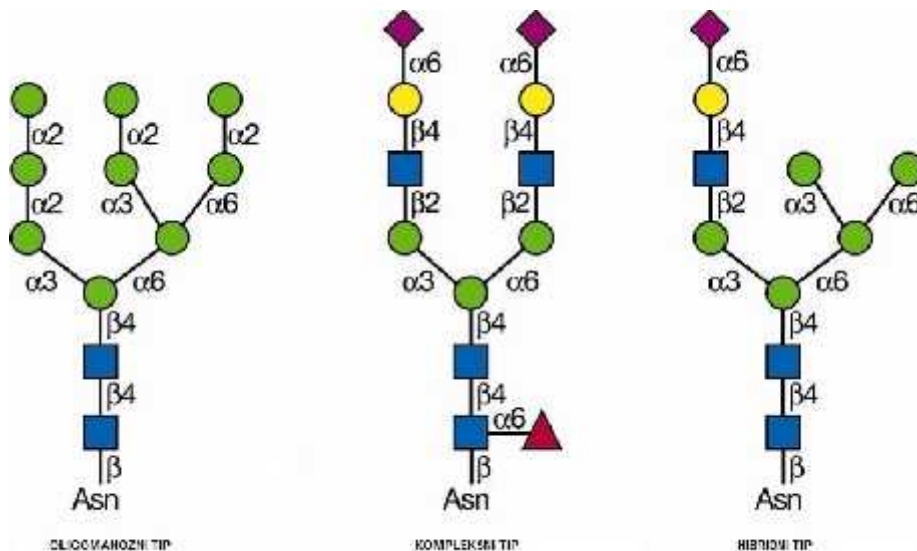
Adhezivna funkcija glikana vidljiva je u interakcijama između stanica međusobno, te između stanica i izvanstaničnog matriksa. Određeni glikani su specifična vezna mjesta za razne viruse, bakterije i parazite, te biljne i bakterijske toksine. Za ovakve interakcije zaslužni su proteini koji vežu glikane (eng. *glycan binding proteins*, GBP). Na svakoj stanici unutar istog organizma nalaze se dvije grupe GBP-a: jedni GBP-i prepoznaju glikane istog organizma, zbog čega se nazivaju unutarnjim GBP-ima, i sudjeluju u prvim gore navedenim interakcijama. Vanjski GBP-i prepoznaju glikane drugih organizama i sudjeluju u interakcijama sa različitim patogenima (Varki i sur. 2007).

Glikan može zauzimati veći ili manji udio u glikokonjugatu pa tako razlikujemo npr. glikoproteine i proteoglikane. Glikoprotein je glikokonjugat kod kojeg je jedan ili više glikana vezano na polipeptid. Ovisno o vrsti veze između tih dvaju molekula, razlikujemo N- i O-glikane. N-glikan je kovalentno vezan na asparagin polipeptida (sekvenca na koju se veže je oblika: Asn-X-Ser/Thr), a O-glikan na hidroksilnu skupinu serina ili treonina.

Monosaharid preko kojega je N-glikan vezan na peptid kod eukariota je uvijek N-acetilglukozamin (GlcNAc). GlcNAc je dio pentasaharidne jezgre koja je zajednička svim N-glikanima, a ovisno o šećerima vezanim na tu jezgru, te vrsti veze između tih šećera, razlikujemo tri tipa glikana: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip (Slika 1.2.). Na slici 1.3. objašnjeni su simboli korišteni u prikazu gore navedenih tipova glikana. Kod oligomanoznog tipa, na pentasaharidnu jezgru vezano je 2 do 6 dodatnih manozosa. Kompleksni tip ima dvije ili više grana od kojih se svaka sastoji od N-acetilglukozamina koji se može nastavljati sa galaktozom, sijalinskom kiselinom te fukozom. Hibridni tip je kombinacija druga dva tipa: jedna grana mu je kompleksne strukture, a uz nju ima još jednu ili više oligomanoznih grana (Gornik i Lauc 2008).

U strukturu N-glikana plazme ulazi samo nekolicina svih poznatih monosaharida. Međutim, unatoč tako malom broju građevnih jedinica, broj mogućih struktura N-glikana puno je veći od broja mogućih struktura nukleinskih kiselina i proteina. Osim što postoji velika raznolikost između samih monosaharida (epimeri, enantiomeri, stereoizomeri), oni se

možu međusobno vezati na puno više različitih načina od nukleotida i aminokiselina. Nukleotidi i aminokiseline vežu se međusobno samo u nerazgranate lance, dok N-glikani mogu biti itekako razgranati, što uvelike povećava njihovu raznolikost. Osim toga, i hidroksilne skupine monosaharida mogu se modificirati fosfatom, sulfatom ili acetil-esterima, čime se raznolikost još više povećava (Varki i sur. 2007).



Slika 1.2. Prikaz triju tipova glikana; svi imaju zajedničku pentasaharidnu jezgru: 2 N-acetilglukozamina i 3 manoze. (Preuzeto iz Varki i sur. 2007: Essentials of Glycobiology; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY)



Slika 1.3. Objašnjenje simbola korištenih u prikazima tipova glikana. (Preuzeto iz Varki i sur. 2007: Essentials of Glycobiology; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY)

1.2. NAJČEŠĆE KORISTENE METODE ANALIZE N-GLIKANA

Zbog velikih strukturnih varijacija, analiza glikokonjugata je mnogo teža od analize DNA i proteina i sve donedavno se vrlo malo znalo o njima. Sa razvojem lektinskih i

kromatografskih metoda po elu se razvijati i glikobiologija, a saznanja o glikanima naglo su se povećala.

Glikani se u glikokonjugatima detektiraju korištenjem reakcije perjodatne kiseline i Schiffovog reagensa. U toj reakciji kiselina oksidira glukozne ostatke i nastaju aldehidi, koji onda reagiraju sa Schiffovim reagensom i nastaje ljubičasto obojenje. Ljubičasta boja dokazuje prisustvo glikana koji sadrže glukozu. Drugi način detekcije je obilježavanje radioaktivnim monosaharidima. Prilikom sinteze glikana, radioaktivni monosaharidi se ugrađuju u molekulu i detektiraju autoradiografijom. Osim radioaktivno, monosaharidi mogu biti i fluorescentno obilježeni i onda se detektiraju fluorometrijom. Također, glikani se mogu detektirati i lektinima. Lektini su proteini koji se specifično vežu za glikane, tako da je ovaj način detekcije najspecifičiji (Varki i sur. 2007).

Za oslobađanje glikana s proteina preferiraju se enzimi. Ovakva reakcija daje intaktne oligosaharide, bez obzira na veličinu ili strukturu ugljikohidratnog dijela, pri čemu se modificira proteinski dio glikoproteina tako da se asparagin na mjestu N-deglikozilacije pretvara u aspartat. Oslobađanje glikana hidrazinolizom uzrokuje kemijske modifikacije: N-deacetilaciju sijalinskih kiselina i N-acetil-D-heksozamina (kao što su N-acetilglukozamin i N-acetilgalaktozamin), kao i cijepanje polipeptidne okosnice (Kita i sur. 2007), zbog čega ta metoda nije najpogodnija.

Za dobivanje preliminarnih informacija o broju, relativnim količinama i tipovima glikana prisutnih u kompleksnoj smjesi koriste se različite kromatografske tehnike. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High – performance liquid chromatography*, *HPLC*) koristi se za razdvajanje svih vrsta glikana i glikokonjugata i predstavlja analitičku i preparativnu tehniku. Za dodatnu identifikaciju i kvantifikaciju glikana koriste se eng. *Fluorophore – assisted carbohydrate electrophoresis (FACE)*, eng. *High – pH anion – exchange chromatography (HPAEC)* i eng. *High – performance capillary electrophoresis (HPCE)*. Fluorescentne oznake u FACE – u povećavaju osjetljivost metode; kod HPAEC – a uzorak ne mora biti derivatiziran ni sa kakvom oznakom, analiza se izvodi pri visokom pH; a HPCE se koristi za analize nabijenih glikana.

Tehnike masene spektrometrije (eng. *mass spectrometry*, *MS*) koriste se za analize primarne strukture i molekulske mase glikana i glikokonjugata. Ponekad se kombiniraju sa

kromatografskim tehnikama, kao npr. tekućinskom kromatografijom (eng. *liquid chromatography*, *LC*) ili plinskom kromatografijom (eng. *gas chromatography*, *GC*). Ovakvim kombinacijama se, osim sastava šećera, može odrediti i vrsta veze među njima. Korištenjem tehnika nuklearne magnetne rezonance (eng. *nuclear magnetic resonance*, *NMR*) može se također odrediti i anomerna konfiguracija veze između monosaharida, a razvojem softvera za molekularno modeliranje moguće je prezentirati i 3D strukturu glikana (Varki i sur. 2007).

1.3. PROMJENE N-GLIKANA KOD BOLESTI

Glikozilacija je najčešća i najraznolikija posttranslacijska modifikacija proteina koja pruža brojne načine za modulaciju funkcije proteina. Najzanimljivija je N-glikozilacija jer je upravo ona esencijalna za vijabilnost stanice: N-glikani igraju uloge u različitim biološkim procesima kao što su smatanje proteina, njihova stabilnost i pravilno usmjerenje; sudjeluju u interakcijama između stanica i međustaničnog matriksa, te između stanica međusobno; a nužni su i za pravilan stanični ciklus (Kukuruzinska i Lennon 1998). Sinteza N-glikana je evolucijski očuvana kod svih eukariota, a kod prokariota postoji s minimalnim razlikama (reakcije glikozilacije odvijaju se na unutrašnjoj strani citoplazmatske membrane, a glikanski intermedijeri se onda prebacuju (eng. flip) u periplazmu gdje se sintetiziraju polimeri), što dodatno govori o njenoj važnosti za funkciju stanica.

Glikani se na istom proteinu, pa čak i na istom mjestu glikozilacije, mogu nalaziti u različitim strukturnim oblicima, što rezultira različitim glikoformama iste molekule. Smatra se da te promjene ukazuju na porijeklo molekule i pružaju informacije o fiziološkom i biokemijskom stanju organizma u trenutku otpuštanja određene molekule. Glikani nisu izravno kodirani genom pa individualne glikanske strukture variraju ovisno o trenutnom nivou ekspresije i lokalizacije biosintetičkih enzima (glikozidaza i glikoziltransferaza) unutar stanice (Gornik i Lauc 2008). Glikani kod zdravog osobe variraju ovisno o dobi, spolu, te okolišnim uvjetima (Knežević i sur. 2009), ali se sa promjenama glikanskih struktura povezuju i mnoge bolesti. Različite analize glikana između zdravih i bolesnih stanja mogu imati značajan klinički dijagnostički potencijal.

Promjene u strukturama glikana tijekom bolesti su kompleksni i slabo istraženi procesi koji uključuju promjene u ekspresiji glikoziltransferaza, njihovoj stabilnosti i lokalizaciji

unutar stanice, dostupnosti i transportu aktiviranih šeernih nukleotida te prometu akceptora glikoproteina (Gornik i sur. 2007). Metaboličke disfunkcije i bolesna stanja mogu se očitovati pojavom abnormalnih stanin i serumskih glikoproteina, te proteina vezanih na staninu membranu (Edwards i sur. 2006), kao i promijenjenim kvantitativnim proporcijama određenih glikana unutar glikoma (Kyselova i sur. 2008), kao što je vidljivo na slici 1.4.

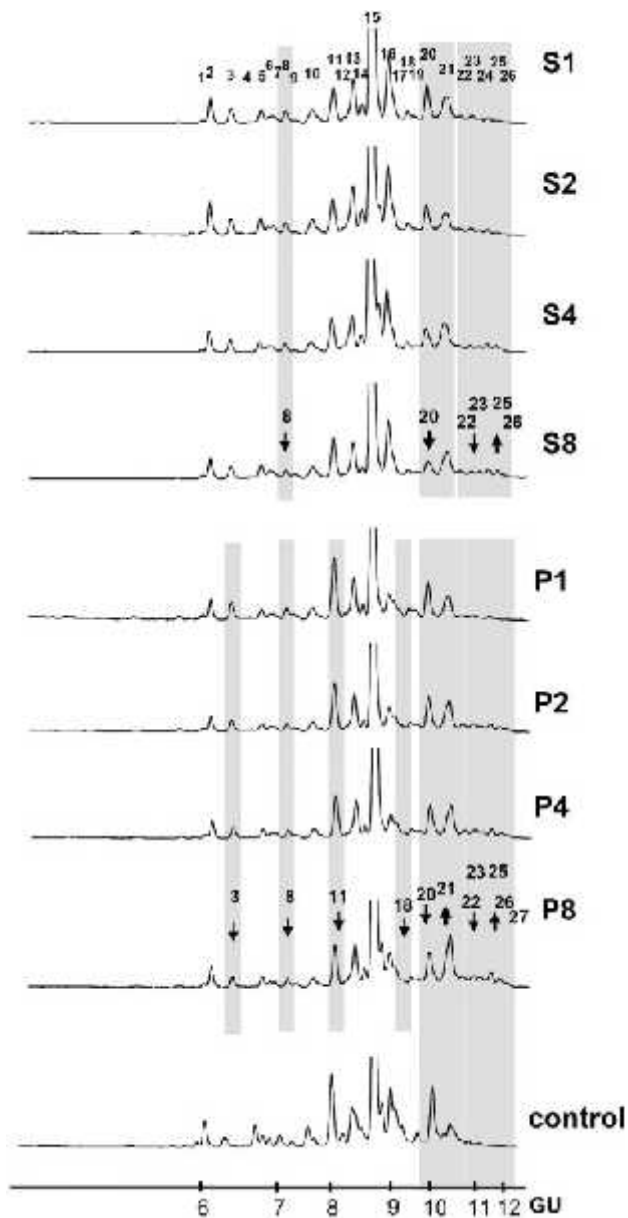
Promjene u strukturi glikana mogu biti vrlo specifične, zbog čega proučavanje glikozilacije serumskih proteina daje dobru osnovu za dijagnozu i prognozu mnogih bolesti. Otkriveno je da su promjene u količinini i profilima glikana povezane sa progresijom tumora i drugih patoloških stanja (Kita i sur. 2007). Ishimura i sur. (2006) napravili su napredak u identifikaciji i karakterizaciji potencijalnih prognostičkih markera za tumor mjehura pokazavši da je ekspresija N-acetilglukozamiltransferaze V značajno povezana sa metastazama. Glikoproteinske biomarkere tumora dojke otkrili su Kyselova i sur. (2008).

Osim kod tumora, glikani se mijenjaju i kod raznih autoimunih bolesti. Moguće je da promjene u grananju N-glikana rezultiraju formacijom neobičajenih epitopa koji onda ne mogu u potpunosti sudjelovati u imunološkom samoprepoznavanju (Chui i sur. 2001). Brojne promjene u glikozilaciji serumskih proteina događaju se i kod upalnih bolesti (Gornik i sur. 2007, Gornik i Lauc 2008), te prilikom konzumacije alkohola (Arndt 2001).

Među najistraženijima su ipak promjene glikana u nasljednim bolestima nazvanim urođeni poremećaji glikozilacije (eng. *congenital disorders of glycosylation, CDG*). Postoje dva tipa CDG-a: kod tipa I poremećaji su u ranom putu sinteze N-glikana, koji se odvija u endoplazmatskom retikulumu, što uključuje sve enzimске korake do prijenosa glikana na protein. Tip II uključuje poremećaje enzima uključenih u doradu N-glikana na glikoziliranom proteinu (Wopereis i sur. 2005) u Golgievom aparatu. Istraživanjima CDG-a bavili su se Callewaert i sur. (2003) te Sturiale i sur. (2005), a Edwards i sur. (2006) pokazali su da je dijagnostika CDG-a moguća čak i u prenatalnoj dobi.

U današnje vrijeme napravljena je relativna kvantifikacija glikoma ljudskog seruma (Knežević i sur. 2009), a Kita i sur. (2007) pokazali su da je moguća i apsolutna kvantifikacija. Daljnje usavršavanje njihove metode moglo bi dati vrstu osnovu za istraživanje kliničke glikomike. Velik napredak u strukturnim analizama glikana (pojačana osjetljivost MS-a i NMR-a) pomaže u određivanju N-glikana prisutnih u serumu: takvo

znanje vodi ka tome da se u budućnosti određene strukture glikana (a ne samo promjene u relativnim udjelima) mogu povezati sa specifičnim ljudskim bolestima.



Slika 1.4. Profili glikana dobivenih analizom seruma osobe oboljele od sepse (S1, S2, S4 i S8 predstavljaju uzorke uzimane 1., 2., 4. i 8. dana bolesti) i osobe oboljele od pankreatitisa (P1, P2, P4 i P8 predstavljaju uzorke uzimane 1., 2., 4. i 8. dana bolesti); zadnji profil je uzorak seruma zdrave osobe. Vidljive su kvantitativne promjene unutar glikoma (strelice). (Preuzeto iz Gornik i sur. 2007: Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. *Glycobiology* **17**: 1321 – 1332.)

2. CILJ RADA

Danas se ulaže veliki trud u istraživanju molekula koje bi se u budućnosti mogle koristiti kao biomarkeri za različite bolesti ili predispozicije. Glikani se već danas u nekim slučajevima koriste kao biomarkeri (povećano 1-6 grananje, povećan udio i modifikacije sialinskih kiselina te povećan nivo N-glikolilneuramininske kiseline pokazatelji su tumorskih stanja; smanjen broj grana i sialinskih kiselina te povećana fukozilacija serumskih proteina ukazuju na urođene poremećaje glikozilacije; a serumski protein transferin sa smanjenim brojem sialinskih kiselina ili bez cijelih N-glikana javlja se kod kroničnog alkoholizma), no njihov potpuni dijagnostički potencijal do sada nije ispitan. Da bi se to ostvarilo, nužno je poznavati varijabilnost i stabilnost glikoma. Poznavanje varijabilnosti je nužno kako bi odredili referentne vrijednosti za pojedine glikane i takva prva studija je napravljena na 1000 stanovnika otoka Visa (Knežević i sur. 2009). No same referentne vrijednosti ne znače ništa ukoliko ne znamo da li se razine glikana mijenjaju kod pojedinca uslijed svakodnevnih aktivnosti.

Geni koji sudjeluju u N-glikozilaciji regulirani su razvojem, fiziologijom i okolišnim čimbenicima, što znači da su glikani i u normalnim uvjetima podložni promjenama tijekom razvoja i diferencijacije. Nužno je ispitati koliko su velike te promjene u zdravom pojedincu jer, ukoliko se glikani mijenjaju značajno i kod zdrave osobe, promjene uočene kod bolesnih ljudi ne bi davale jednoznačne rezultate te ne bi mogli govoriti o uvođenju glikana kao potencijalnih biomarkera određenih bolesti.

Cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost N-glikoma ljudske plazme i time dijagnostički potencijal glikana.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

MATERIJAL	PROIZVO A
Polipropilenska mikroplo ica, 300 µl	Whatman
Filter plo ica za proteinsku precipitaciju	Whatman
Polipropilenska plo ica za skupljanje uzoraka	Waters
TRIS (tris(hidroksimetil)aminometan)	AnalaR; VWR
SDS (natrijev dodecil sulfat)	BDH
DTT (ditiotreitol)	Sigma
IAA (jodoacetamid)	Sigma
APS (amonijev peroksisulfat)	AnalaR; BDH
NaHCO ₃ (natrijev hidrogenkarbonat)	HiPerSolv; BDH
Formijatna kiselina	AnalaR; BDH
PNGaza F (peptid-N-glikozidaza F)	Prozyme
TEMED (<i>N,N,N,N'</i> -tetrametil-etilendiamin)	Sigma
Acetonitril LC/MS	J.T.Baker
Glyko Signal kit za obilježavanje sa 2-AB- om (2-aminobenzamid)	Prozyme
Whatman 3MM kromatografski papir	Whatman
Milli Q voda	
Amonijak 25 % otopina	Merck

3.1.1. Uzorci

U istraživanju je sudjelovalo 12 osoba u dobi od 26 do 38 godina. Oba spola su bila jednako zastupljena (6 muških i 6 ženskih osoba). Svi su bili dobrog psihofizi kog stanja, nisu bolovali od kroni nih bolesti te nisu uzimali nikakvu terapiju, osim povremeno sintetske vitaminske pripravke.

Svakoj navedenoj osobi krv je bila va ena 7 puta: 3 puta prvog dana: u 8h (natašte), 13h i 18h; a ostale dane samo u 8h (svaki dan natašte). Ženskim osobama krv je va ena u po etnom dijelu ciklusa (prvi tjedan nakon menstruacije).

Plazma je odvojena u roku od 30 min. nakon va enja krvi centrifugiranjem 10 min. pri 3000 rpm te pohranjena na -20°C.

3.2. METODE

3.2.1. Redukcija glikoproteina

Za ovu reakciju korištena je polipropilenska mikroplo ica, 300 µl, koja služi kako bi se glikoproteini imobilizirali u gelove. Svakom uzorku plazme (5 µl) dodano je 2 µl vode, 2 µl otopine koja je sadržavala: 10 % SDS i 0,5 M TRIS (pH 6,6); te 1 µl 0,5 M DTT. Plo ica je inkubirana 15 min. pri 65 °C.

3.2.2. Alkilacija glikoproteina

Nakon završene redukcije, u jažice je dodan po 1 µl 100 mM IAA i plo ica je stavljena na inkubaciju 30 min. pri sobnoj temperaturi u mraku.

3.2.3. Imobilizacija glikoproteina u gelu

U jažice su zatim redom dodavani: 22,5 µl protogela (30 % akrilamid / 0,8 % bisakrilamid), 11,25 µl 1,5 M TRIS pufera (pH 8,8), 1 µl 10 % SDS i 1 µl 10 % APS; te nakon toga još i 1 µl TEMED-a. Gelovi su ostavljeni da se polimeriziraju 15 min., a zatim su preba eni u pripadaju e jažice na filter plo icu za precipitaciju proteina.

3.2.4. Ispiranje gelova

Na gelove je dodan po 1 ml acetonitrila i plo ica je stavljena na tresilicu 10 min., nakon ega je vakuum pumpom acetonitril odsisan i propisno ba en. Postupak je ponovljen sa 1 ml 20 mM NaHCO₃, 1 ml acetonitrila, 1 ml 20 mM NaHCO₃ te 1 ml acetonitrila.

3.2.5. Digestija PNGazom F

Plo ica za filtriranje je nakon ispiranja stavljena na polipropilensku plo icu za skupljanje uzoraka. Na svaki gel dodano je 25 μ l otopine PNGaze F (koncentracije 0,05 mU/ μ l), a nakon 5 min. još 25 μ l. Nakon idu ih 5 min., svakom gelu je dodano 50 μ l 20 mM NaHCO₃, preko plo ice je zalijepljena samoljepljiva folija i stavljena je na inkubaciju pri 37 °C preko no i (oko 20 sati).

3.2.6. Eluacija oslobo enih glikana sa gelova

Idu i dan je svakom gelu dodano 200 μ l vode i plo ica je stavljena na tresilicu 10 min. Vakuum pumpom su otopine odsisane na plo icu za uzorke. Postupak je ponovljen kako slijedi sa: 200 μ l vode, 200 μ l vode, 200 μ l acetonitrila, 200 μ l vode i 200 μ l acetonitrila; nakon ega su uzorci potpuno osušeni u vakuum centrifugi.

3.2.7. Tretman formijatnom kiselinom

Potpuno suhim uzorcima dodano je 20 μ l 1 % formijatne kiseline i uzorci su inkubirani 40 min. pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, ponovno su potpuno osušeni u vakuum centrifugi.

3.2.8. Fluorescentno obilježavanje sa 2-AB-om

Svakom (potpuno suhom) uzorku dodano je 5 μ l 2-AB mješavine (pripremljena koriste i "Glyko Signal 2-AB Labelling Kit" (Prozyme) prema uputama proizvo a a). Plo ica je stavljena na tresilicu 5 min., a nakon toga inkubirana 30 min. pri 65 °C. Poslije inkubacije, još je jednom stavljena na tresilicu 5 min. i ponovno inkubirana, ali ovaj put 90 min. pri 65 °C.

3.2.9. Priprema za ispiranje nevezanog 2-AB-a

Whatman 3MM kromatografski papir je izrezan na komadi e od otprilike 1 cm². Papiri i su 3 puta isprani u vodi, svako ispiranje trajalo je oko 2 min. Nakon sušenja pri 65 °C, presavijeni su 2 puta na pola.

Jažice plo ica za filtriranje isprane su sa 200 μ l acetonitrila, nakon ega je vakuum pumpom odsisan i propisno ba en. Postupak je ponovljen sa 200 μ l vode te su u jažice stavljene presavijeni papiri i (u svaku po 1).

3.2.10. Ispiranje nevezanog 2-AB-a

U pripadaju e jažice (na papiri e) su dodani obilježeni uzorci (5 μ l) i ostavljeni 15 min. da se vežu. Uzorcima je zatim dodano 1600 μ l acetonitrila, stavljene su na tresilicu 15 min. i vakuum pumpom je acetonitril odsisan i propisno ba en. Isti postupak ponovljen je još 4 puta.

3.2.11. Elucija 2-AB glikana

Plo ica za filtriranje je zatim preba ena na plo icu za uzorke. U jažice je dodano 500 μ l vode, stavljeno na tresilicu 15 min. te su uzorci vakuum pumpom odsisani na plo icu za uzorke. Isti postupak ponovljen je još 2 puta, nakon ega su uzorci potpuno osušeni u vakuum centrifugi. Osušeni uzorci resuspendirani su u poznatom volumenu vode i smrznuti.

3.2.12. Teku inska kromatografija visoke djelotvornosti

Korišten je Waters HPLC sistem sa TSKgel Amide 80 kolonom, 5 μ m, 250 x 4,6 mm (Tosoh) grijanom na 30 °C; te 50 mM formijatnom kiselinom (pH 4,4, podešen otopinom amonijaka) kao otapalom A i acetonitrilom kao otapalom B.

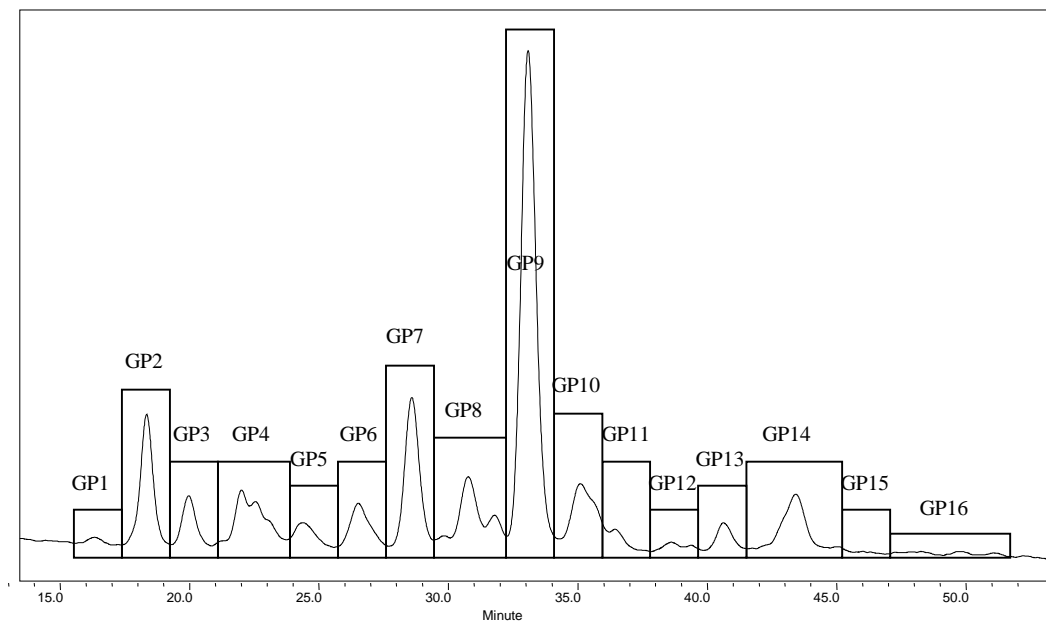
Vrijeme razdvajanja je bilo 60 min. na 2795 Alliance modulu za razdvajanje (Waters). HPLC sistem bio je opremljen i modulom za kontrolu temperature (Waters) te 2475 detektorom fluorescencije (Waters) s valnom duljinom ekscitacije 330 nm i valnom duljinom emisije 420 nm. Sistem je kalibriran koriste i dekstran kao standard, prema kojemu su onda retencijska vremena pojedina nih glikana prera unata u jedinice glukoze (GU – glucose units). Glikani su analizirani na osnovi njihovih elucijskih pozicija i izmjereni u jedinicama glukoze kako bi se mogli usporediti sa referentnim vrijednostima u bazi podataka "Glycibase" (na <http://glycibase.nibr.ie>) u svrhu odre ivanja strukture pojedinih glikana (Knežević i sur. 2009.).

3.2.13. Statisti ka analiza

Varijabilnost izmjerenih koli ina glikana izražena je kao prosje ni koeficijent varijacije ($CV = Sd / \text{srednja vrijednost} * 100$; gdje Sd ozna čava standardnu devijaciju). Prosje ni CV za svaku grupu glikana izra unat je kao srednja vrijednost CV-ova svih 12 osoba.

4. REZULTATI

Dobiveni kromatogrami integrirani su u 16 kromatografskih vršaka, odnosno grupa (GP1 – GP16), na osnovi rezolucije izme u vršaka (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Profil (kromatogram) N-glikana iz uzorka ljudske plazme integriran u 16 grupa.

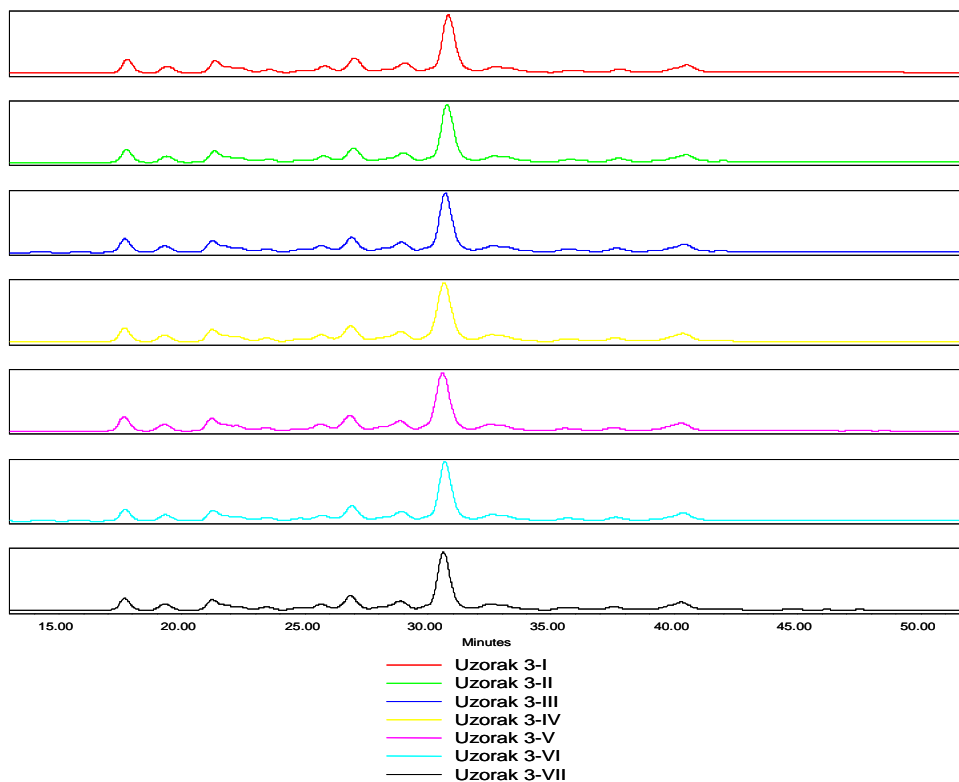
Grupa GP1 obuhvaća samo jednu glikansku strukturu, dok ostale grupe obuhvaćaju više njih. Na temelju sedam mjerenja za svaku osobu, izražen je CV svake osobe za sva integrirana područja (GP1 – GP16) glikana. Potom je izražen i prosječni CV svih 12 osoba. Dobiveni CV izražen je u postotcima (Tablica 4.1.). Najveće varijacije prisutne su u prvoj i zadnjoj grupi, odnosno u GP1 i GP16, no s obzirom da su u relativnim udjelima te grupe i najmanje zastupljene, to je i zaokruženo ekvivalentno. Međutim, gledajući varijacije u ukupnom N-glikomu, one se ne razlikuju bitno od CV-a same metode (Knežević i sur. 2009) – prosječni CV je 5,56 %.

Tablica 4.1. Koeficijenti varijabilnosti za svaku grupu glikana izraženi u postotcima, sa pripadajućim minimalnim i maksimalnim vrijednostima.

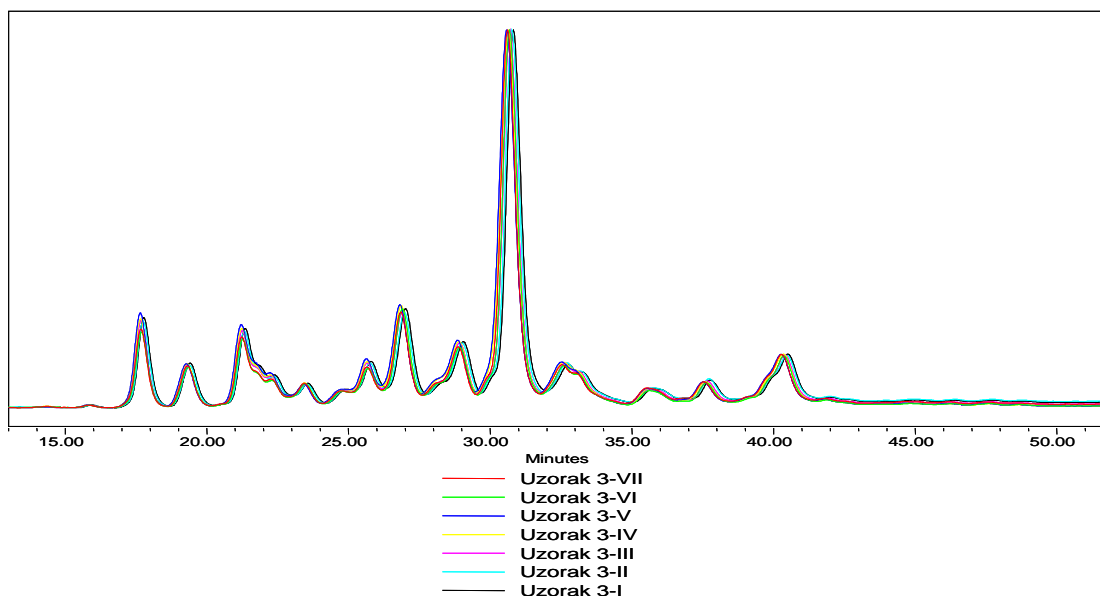
Grupa	Osoba 1 CV %	Osoba 2 CV %	Osoba 3 CV %	Osoba 4 CV %	Osoba 5 CV %	Osoba 6 CV %	Osoba 7 CV %	Osoba 8 CV %	Osoba 9 CV %	Osoba 10 CV %	Osoba 11 CV %	Osoba 12 CV %	Strednji CV % svake grupe	Min. CV %	Max. CV %
GP1	18,37	24,15	5,57	5,50	3,19	15,19	8,16	16,25	11,14	10,93	8,67	9,77	11,41	3,19	24,15
GP2	4,88	2,62	4,95	8,62	5,13	12,15	6,06	8,56	5,77	9,88	8,12	3,73	6,71	2,62	12,15
GP3	5,10	1,92	2,30	4,04	1,56	5,19	5,55	8,00	1,30	5,29	5,27	2,69	4,02	1,30	8,00
GP4	4,56	2,74	4,55	8,04	4,29	8,35	7,46	6,43	2,76	7,08	5,29	3,64	5,43	2,74	8,35
GP5	5,09	3,19	4,84	3,26	5,31	7,60	8,03	7,31	5,00	3,79	5,74	2,81	5,16	2,81	8,03
GP6	4,30	1,88	3,34	5,96	2,99	4,99	8,43	5,87	2,69	5,18	3,82	3,24	4,39	1,88	8,43
GP7	3,75	3,28	2,10	1,68	4,83	2,54	2,65	6,44	1,28	3,22	11,34	3,10	3,85	1,28	11,34
GP8	1,59	1,27	1,28	1,10	1,66	1,80	2,66	1,81	1,54	2,36	1,29	1,17	1,63	1,10	2,66
GP9	1,34	1,35	1,82	1,97	1,42	2,33	1,85	2,75	1,05	1,75	1,27	2,05	1,75	1,05	2,75
GP10	2,18	3,33	1,70	2,12	3,73	2,85	2,45	2,77	2,36	3,62	1,56	2,43	2,59	1,56	3,73
GP11	8,35	6,47	5,31	3,72	8,31	3,46	6,85	12,10	5,86	5,06	8,95	4,86	6,61	3,46	12,10
GP12	7,49	7,49	5,99	6,05	7,42	3,87	8,23	9,46	3,98	9,89	4,95	6,40	6,77	3,87	9,89
GP13	3,17	3,33	2,80	3,83	5,83	3,29	6,89	7,61	2,22	4,74	5,24	3,54	4,38	2,22	7,61
GP14	2,30	3,31	2,28	4,71	3,34	3,94	6,06	5,81	1,36	5,25	4,69	5,58	4,05	1,36	6,06
GP15	4,81	9,14	8,14	6,68	12,98	6,07	15,31	11,15	5,34	9,12	11,93	13,13	9,48	4,81	15,31
GP16	5,93	6,86	10,50	12,50	14,69	6,67	14,39	14,58	5,85	10,21	11,53	14,26	10,66	5,85	14,69
Prosje ni CV %													5,56		

Budu i da je krv va ena sedam puta svakoj osobi, svaka osoba ima sedam profila (Slika 4.2.). Stavljanjem tih profila u jednu sliku dobiveno je gotovo savršeno preklapanje (Slika 4.3.), što zna i da se profili tijekom dana, odnosno tjedna, ne mijenjaju zna ajno. To je još jedan dokaz vrlo malih promjena u koli ini struktura N-glikana tijekom kra eg razdoblja.

Dobiveni rezultati govore o malim varijacijama u koli ini pojedinih struktura N-glikana ljudske plazme tijekom dana, odnosno tjedna. Budu i da se koli ina struktura kroz kratki period ne mijenja zna ajno, može se govoriti o vrlo velikoj stabilnosti N-glikoma ljudske plazme tijekom kra eg razdoblja.



Slika 4.2. Profili N-glikana iz uzoraka plazme osobe 3. Uzorci I - III predstavljaju plazmu iz krvi va ene u ponedjeljak u 8 (natašte), 13 i 18h; uzorci IV - VII predstavljaju plazmu iz krvi va ene u utorak, srijedu, etvrtak i petak u 8h (natašte).



Slika 4.3. Preklapljeni profili N-glikana iz uzoraka plazme osobe 3. Uzorci I - III predstavljaju plazmu iz krvi va ene u ponedjeljak u 8 (natašte), 13 i 18h; uzorci IV - VII predstavljaju plazmu iz krvi va ene u utorak, srijedu, etvrtak i petak u 8h (natašte).

5. RASPRAVA

Više od polovice gena koji sudjeluju u N-glikozilaciji je evolucijski očuvano (Kukuruzinska i Lennon 1998), što govori da je glikozilacija pod strogom genetičkom kontrolom. To su geni koji kodiraju za brojne glikozidaze i glikoziltransferaze koje sudjeluju u putu biosinteze N-glikana, bilo da se nalaze u endoplazmatskom retikulumu ili Golgiju. Uključeni su u razvoj i homeostazu (morfogenezu, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu). U slučajevima (stanjima) normalne ekspresije tih gena i očuvane biološke aktivnosti njihovih produkata, očuvana je i struktura N-glikana koje ti produkti sintetiziraju. Velika stabilnost N-glikoma određena u ovom istraživanju potvrđuje tu činjenicu. Međutim, poznato je i da su ti geni regulirani razvojem, fiziologijom i okolišnim čimbenicima. Tijekom razvoja, diferencijacije, različitih fizioloških odgovora i okolišnih utjecaja, mijenja se njihova ekspresija, mijenjaju se funkcije njihovih produkata, a time i profil glikana, što glikanima daje velik dijagnostički potencijal.

Da bi se ispitao dijagnostički potencijal glikana, bilo je potrebno istražiti kako se glikani mijenjaju (i mijenjaju li se uopće) u zdravih osoba pri uobičajenim uvjetima. Ovo istraživanje pokazalo je da se glikom zdrave osobe tijekom kraćeg razdoblja gotovo uopće ne mijenja, što znači da svaka eventualna promjena može biti pokazatelj neke bolesti.

Do danas poznate promjene koriste se za dijagnozu ili prognozu raznih bolesti (akutne i kronične upale, reumatoidni artritis, dijabetes melitus, ankilozni spondilitis, pankreatitis, upala pluća, glomerulonefritis, bolesti jetre, itd.), međutim, dijagnoza se vrši na temelju promjena pojedinih serumskih proteina, a ne ukupnog glikoma (Gornik i Lauc 2008). Na temelju analize promjena serumskog proteina transferina moguće je čak i prenatalna dijagnostika urođenih poremećaja u glikozilaciji, iako je slabo istražena i, koliko je do sada poznato, pouzdana u 80 % slučajeva (Edwards i sur. 2006). Glavni razlog slaboj primjenjivosti promjena glikana u dijagnostici je nedostupnost jednostavne, ponovljive, osjetljive i brze analize koja bi se mogla koristiti u svakom kliničkom laboratoriju. Analiza N-glikoma ljudske plazme HPLC-om, korištena u ovom istraživanju, sigurno ima značajne nedostatke: osim kompliciranosti i dugotrajnosti, mala razlučivanja nije dovoljna za

određivanje pojedina njih glikanskih struktura, već samo grupa glikana. Također, njome nije moguće utvrditi eventualne promjene glikanskih struktura, već samo relativnih udjela glikana jer nam nedostaje unutarnji standard koji bi omogućio apsolutnu kvantifikaciju. Daljnja analiza nekom od metoda masene spektrometrije sigurno bi dala detaljnije informacije i nužna je ukoliko se želi odrediti točan potencijalni biomarker.

Callewaert i sur. (2001) su koristili DNA-sekvencer, eng. *DNA – sequencer – adapted – FACE* (eng. *Fluorophore – assisted carbohydrate electrophoresis*), kako bi dobili profil desijaliziranih glikana iz seruma. Ovakvom kvantitativnom analizom uspjeli su odrediti strukture N-glikana prisutnih u serumu. Iako traje nešto duže od analize HPLC-om (3 h), prednost metode je što se glikani mogu razdvojiti u potpunosti (na pojedinačne, a ne grupe glikana), što HPLC-om nije moguće postići. Također, na istom profilu se odmah, na temelju veličine, može odrediti i struktura glikana, za što su inače potrebne analize masenom spektrometrijom i NMR-om. Ipak, metoda ima i dosta nedostataka koji uglavnom uključuju razne optimizacije: zbog argonskog lasera korištenog u postupku, ograničen je izbor fluorescentne oznake, zbog čega se mora kreirati novi korekcijski matriks za softver; potrebno je ispiranje koje odstranjuje više od 95 % fluorescentne oznake; a nužne su i optimizacije postotka akrilamida u gelu i ostalih elektroforetskih uvjeta (temperatura, pufer). Morelle i sur. (2005) razvili su brzi protokol kojim se može odrediti ukupni N-glikom seruma za manje od 24 sata. Prednosti ove metode su brzina i mala količina po etnog uzorka potrebnog za analizu (2 µl), iako je za analize MALDI-TOF-om potrebna dodatna modifikacija glikana (metilesterifikacija). Ovakav protokol prikladan je za detekciju promjena N-glikozilacije u urođenim i stečnim bolestima, kao i za usporedbu različitih stupnjeva tih bolesti. Kami i sur. (2007) su razvili analitičku metodu za kvantitativno profiliranje N-glikana seruma koristeći sistem koji je originalno dizajniran za profiliranje proteoma seruma. Pokazali su da je MALDI-TOF, iako se uobičajeno koristi za strukturne analize glikana, primjenjiv i za kvantitativne analize složenih smjesa glikana, te da se primjenom ove metode mogu pronaći i glikani čije su koncentracije promijenjene.

Velik napredak u strukturnim analizama glikana pomaže u određivanju N-glikana prisutnih u serumu, odnosno plazmi novjeka. Proteom, a time i glikom ljudskog seruma, odnosno plazme, smatra se najinformativnijim sa medicinskog i kliničkog gledišta jer vjerojatno sadrži najviše humanih proteina (Kita i sur. 2007). Analiza glikana zahtjeva samo male količine uzoraka seruma i predstavlja neinvazivnu dijagnostičku metodologiju

(Kyselova i sur. 2008). Zbog svega navedenog, uključivanje glikana kao potencijalnih biomarkera postaje ne samo zanimljivo, nego i nužno.

Takvo uključivanje traži da se provjere varijabilnost (Knežević i sur. 2009) i stabilnost N-glikoma. U ovom istraživanju, analiza je provedena na malom uzorku (12 osoba). U budućnosti treba ponoviti istraživanje na većem, reprezentativnijem uzorku; a kako bi se odredile točne strukture promijenjenih glikana, potrebne su i dodatne analize metodama masene spektrometrije i eventualno NMR-a. Također, rezultati dobiveni u ovom istraživanju odnose se samo na kratko razdoblje (5 dana), što sigurno traži i buduću provjeru stabilnosti u nekom dužem periodu (mjesec ili godinu dana) kako bi se sa sigurnošću moglo govoriti o stabilnosti N-glikoma ljudske plazme kod zdravih osoba i uobičajenih uvjeta.

6. ZAKLJUČAK

Analiza N-glikana iz plazme zdravih osoba pokazala je vrlo veliku stabilnost glikoma tijekom kraćeg razdoblja. To znači da se kod svake pojedine osobe glikani ne mijenjaju značajno unutar perioda od nekoliko dana. Dobiveni rezultati ukazuju na to da pri normalnim uvjetima (stabilno fiziološko stanje i uobičajeni okolišni utjecaji) gotovo i nema promjena u glikozilaciji, odnosno da su strukture i kvantitativni udjeli glikana očuvani. Uzevši u obzir činjenicu da kod određenih bolesti dolazi do značajnih promjena glikana, ovi rezultati omogućuju daljnje analize i pronalaženje načina kako glikane primijeniti kao biomarkere za te bolesti.

7. LITERATURA

- Arndt T. (2001): Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation. *Clinical Chemistry* **47**: 13–27.
- Callewaert N., Schollen E., Vanhecke A., Jaeken J., Matthijs G., Contreras R. (2003): Increased fucosylation and reduced branching of serum glycoprotein N-glycans in all known subtypes of congenital disorder of glycosylation I. *Glycobiology* **13**: 367-375.
- Callewaert N., Geysens S., Molemans F., Contreras R. (2001): Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology* **11**: 275 – 281.
- Chui D., Sellakumar G., Green R.S., Sutton-Smith M., McQuistan T., Marek K.W., Morris H.R., Dell A., Marth J.D. (2001): Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease. *PNAS* **98**: 1142–1147.
- Edwards M., McKenzie F., O’Callaghan F., Somerset D., Woodford P., Spilsbury J., Fietz M., Fletcher J. (2006): Prenatal Diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia) by cordocentesis and transferrin isoelectric focussing of serum of a 27-week fetus with non-immune hydrops. *Prenatal Diagnosis* **26**: 985–988.
- Gornik O., Lauc G. (2008): Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Disease Markers* **25**: 267–278
- Gornik O., Royle L., Harvey D.J., Radcliffe C.M., Saldova R., Dwek R.A., Rudd P., Lauc G. (2007): Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. *Glycobiology* **17**: 1321–1332.
- Ishimura H., Takahashi T., Nakagawa H., Nishimura S.-I., Arai Y., Horikawa Y., Habuchi T., Miyoshi E., Kyan A., Hagiwara S., Ohyama C. (2006): N-Acetylglucosaminyltransferase

V and 1-6 Branching N-Linked Oligosaccharides Are Associated with Good Prognosis of Patients with Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**: 2506-2511.

Kam R.K.T., Poon T.C.W., Chan H.L.Y, Wong N., Hui A.Y., Sung J.J.Y. (2007): High-Throughput Quantitative Profiling of Serum N-Glycome by MALDI-TOF Mass Spectrometry and N-Glycomic Fingerprint of Liver Fibrosis. *Clinical Chemistry* **53**: 1254-1263.

Kita Y., Miura Y., Furukawa J.-I., Nakano M., Shinohara Y., Ohno M., Takimoto A., Nishimura S.-I. (2007): Quantitative Glycomics of Human Whole Serum Glycoproteins Based on the Standardized Protocol for Liberating N-Glycans. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 1437-1445.

Knežević A., Polašek O., Gornik O., Rudan I., Campbell H., Hayward C., Wright A., Kol i I., O'Donoghue N., Bones J., Rudd P.M., Lauc G. (2009): Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *Journal of Proteome Research* **8**: 694-701.

Kukuruzinska M.A., Lennon K. (1998): Protein N-Glycosylation: Molecular Genetics and Functional Significance. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **9**: 415-448.

Kyselova Z., Mechref Y., Kang P., Goetz J.A., Dobrolecki L.E., Sledge G.W., Schnaper L., Hickey R.J., Malkas L.H., Novotny M.V. (2008): Breast Cancer Diagnosis and Prognosis through Quantitative Measurements of Serum Glycan Profiles. *Clinical Chemistry* **54**: 1166–1175.

Morelle W., Flahaut C., Michalski J.-C., Louvet A., Mathurin P., Klein A. (2006): Mass spectrometric approach for screening modifications of total serum N-glycome in human diseases: application to cirrhosis. *Glycobiology* **16**: 281–293.

Sturiale L., Barone R., Fiumara A., Perez M., Zaffanello M., Sorge G., Pavone L., Tortorelli S., O'Brien J.F., Jaeken J., Garozzo D. (2005): Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology* **15**: 1268–1276.

Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E. (2007): *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview (NY).

Wopereis S., Morava É., Grünewald S., Adamowicz M., Huijben K.M.L.C., Lefeber D.J., Wevers¹ R.A. (2005): Patients with unsolved congenital disorders of glycosylation type II can be subdivided in six distinct biochemical groups. *Glycobiology* **15**: 1312–1319.

www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/rp//biology/cell_membrane.html