

# Optimizacija visokoprotočnih metoda za analizu N-glikozilacije mišjeg imunoglobulina G

---

**Mrčela, Mia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:727906>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Mia Mrčela**

**Optimizacija visokoprotočnih metoda za analizu  $N$ -  
glikozilacije mišjeg imunoglobulina G**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2017.

**Mia Mrčela**

**Optimizacija visokoprotočnih metoda za analizu  $N$ -  
glikozilacije mišjeg imunoglobulina G**

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog stupnja  
*magistra kemije*

Zagreb, 2017.

*Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca i neposrednim vodstvom dr. sc. Olge Zaytseve. Nastavnik: doc. dr. sc. Marko Močibob, Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.*

*Zahvale*

*Hvala mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu na ukazanom povjerenju i prilici da svoj diplomski izradim u poticajnoj i ugodnoj atmosferi Laboratorija za glikobiologiju tvrtke Genos.*

*Hvala neposrednoj voditeljici dr. sc. Olgi na vodenju kroz eksperimentalni dio rada te na strpljenju. Hvala Ireni, Franu i Mariji na savjetima oko pisanja rada.*

*Hvala priateljima na vječnoj podršci. Iskreno mogu reći da sam uz Vas bogat čovjek.*

*Hvala Josipu i Ivanu što čine moj život ljepšim.*

*Najviše hvala mojim roditeljima, Anici i Zoranu, na bezuvjetnoj potpori i razumijevanju. Bez Vas ne bih uspjela!*

*Aneli i Zokiju...*

*Nauka nam obećava istinu. Ona nikad ne obećava mir ni sreću.*

*Le Bon*

# Sadržaj

Sažetak .....	III
Abstract .....	IV
Popis kratica .....	V
1. Uvod .....	1
2. Literurni pregled .....	3
2.1. Glikozilacija .....	3
2.1.1. <i>N</i> -glikozilacija .....	3
2.2. Imunoglobulini .....	5
2.2.1. Biološka uloga <i>N</i> -glikozilacije imunoglobulina G .....	7
2.3. Miševi s uklonjenim genima za receptore Fc $\gamma$ i $\gamma$ lanac .....	8
2.4. Visokoprotočne metode za analizu <i>N</i> -glikozilacije .....	9
2.5. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa .....	11
2.6. Kapilarna gel-elektoforeza s laserom induciranoj fluorescencijom .....	13
2.6.1. Metoda HILIC .....	15
3. Materijali i metode .....	16
3.1 Materijali .....	16
3.1.1. Kemikalije .....	16
3.1.2. Enzimi, boje i standardi za veličinu .....	16
3.1.3. Puferske otopine .....	17
3.1.4. Pločice .....	17
3.1.5. Čvrste faze za pročišćavanje .....	18
3.1.6. Uređaji .....	18
3.2. Korišteni uzorci .....	19
3.3. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme .....	19
3.3.1. Pripremanje pločice s Proteinom G .....	19
3.3.2. Vezanje imunoglobulina G i eluacija .....	20
3.3.3. Određivanje koncentracije imunoglobulina G .....	20
3.4. Analiza metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa .....	21
3.4.1. Razgradnja imunoglobulina G tripsinom .....	21
3.4.2. Pročišćavane glikopeptida .....	21
3.4.3. Analiza glikopeptida fragmenta Fc metodom LC-MS .....	22

3.4.4. Procesiranje i analiza podataka .....	22
3.5. Analiza metodom kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranim fluorescencijom .....	23
3.5.1. Deglikozilacija.....	23
3.5.2. Fluorescentno obilježavanje <i>N</i> -glikana .....	23
3.5.3. Pročišćavane <i>N</i> -glikana obilježenih APTS-om .....	24
3.5.4. Analiza <i>N</i> -glikana obilježenih APTS-om metodom CGE-LIF.....	25
3.5.5. Procesiranje i analiza podataka .....	25
4. Rezultati i rasprava.....	26
4.1. Analiza <i>N</i> -glikozilacije imunoglobulina G metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa .....	26
4.1.1. Analiza <i>N</i> -glikozilacije standardnih uzoraka mišjeg imunoglobulina G .....	26
4.1.2. Analiza <i>N</i> -glikozilacije bioloških uzoraka mišjeg imunoglobulina G.....	31
4.2. Analiza <i>N</i> -glikozilacije imunoglobulina G metodom kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranim fluorescencijom .....	38
4.2.1. Optimizacija pročišćavanja metodom HILIC.....	40
5. Zaključak.....	46
Literatura .....	47
6. Prilozi .....	V
6.1. Tablice .....	V
6.2. Životopis.....	VI

## Sažetak

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

Diplomski rad

# Optimizacija visokoprotičnih metoda za analizu *N*-glikozilacije mišjeg imunoglobulina G

*Mia Mrčela*

Laboratorij za glikobiologiju, Genos d.o.o., Hondlova 2/11, 10000 Zagreb, Hrvatska

*N*-glikozilacija ima strukturnu ulogu te utječe na efektorske funkcije imunoglobulina G (IgG-a). Promjena glikozilacije povezuje se s kompleksnim bolestima za čiji se mehanizam nastanka kao modelni organizmi koriste miševi. Miševi s uklonjenim genima (eng. *knockout*) za receptore specifične za fragment koji kristalizira (FcγR) mogu dati uvid kako *N*-glikozilacija utječe na interakcije fragmenta koji kristalizira (Fc) i receptora Fcγ u reakcijama imunološkog sustava. Potrebno je razviti osjetljive visokoprotične metode kojima se osim velikog broja uzoraka, može analizirati i *N*-glikozilacija manjih koncentracija IgG-a kao što je mišji IgG. Metodom LC-MS analizirana je *N*-glikozilacija IgG-a izoliranog iz seruma divljeg tipa i miševa s uklonjenim genima koji kodiraju FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII, FcγRIV te γ teški lanac fragmenta Fc. Također, uspoređeni su glikanski profili IgG-a iz miševa divljeg tipa te miševa s uklonjenim genima za receptore Fcγ i γ lanac. Djelomično je optimizirana metoda CGE-LIF kojom je analizirana *N*-glikozilacija ljudskog IgG-a.

(49 stranica, 15 slika, 45 literarnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102A, 10000 Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: imunoglobulin G, *N*-glikozilacija, receptori Fcγ, tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa, kapilarna gel elektroforeza,

Mentor: dr. sc. Gordan Lauc, prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Olga Zaytseva

Nastavnik: dr. sc. Marko Močibob, doc.

Ocenjivači: dr. sc. Marko Močibob, doc.

dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.

dr. sc. Biserka Prugovečki, izv. prof.

Zamjena: dr. sc. Mirta Rubčić, izv.prof.

Rad je prihvaćen: 31. svibnja 2017.

## **Abstract**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma thesis

### **Optimisation of high-throughput analysis of mouse immunoglobulin G N-glycosylation**

*Mia Mrčela*

Glycoscience Laboratory, Genos d.o.o., 10000 Zagreb, Hrvatska

*N*-glycosylation has structural roll and modulate immunoglobulin G (IgG) effector functions. Glycosylation changes are associated with complex diseases and mouse model organism is used for studies of disease development mechanism. Fragment crystallizable  $\gamma$  receptor (Fc $\gamma$ R) knockout mouse can provide insight into how IgG *N*-glycosylation affects the fragment crystallizable (Fc) and Fc $\gamma$ R interaction during immune reaction. It is necessary to bring into practice sensitive high-throughput methods not only for large number of samples, but also for *N*-glycosylation analysis in samples with low IgG concentrations as for example mouse IgG. *N*-glycosylation of Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ IV and  $\gamma$ -chain knockout mouse IgG is analysed by LC-MS method. Furthermore, glycoprofiles of IgG glycoforms from wild type mouse strains are compared with Fc $\gamma$ R and  $\gamma$  chain knockouts. CGE-LIF method is partially optimised and human IgG *N*-glycosylation is analysed.

(49 pages, 15 figures, 45 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb, Croatia

**Key words:** *N*-glycosylation, immunoglobulin G, Fc $\gamma$  receptors, liquid chromatography coupled with mass spectrometry, capillary gel electrophoresis

**Mentor:** dr. sc. Gordan Lauc, Prof.

**Supervisor:** dr. sc. Olga Zaytseva

**Instructor:** dr. sc. Marko Močibob, Assist. Prof.

**Reviewers:** dr. sc. Marko Močibob, Assist. Prof.

dr. sc. Sanda Rončević, Assoc. Prof.

dr. sc. Biserka Prugovečki, Assoc. Prof.

**Replacement:** dr. sc. Mirta Rubčić, Assoc. Prof.

**Thesis accepted:** 31<sup>st</sup> May 2017.

## **Popis kratica**

ADCC - stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (eng. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)

Asn - asparagin

C<sub>L</sub> - laki lanac imunoglobulina (eng. *light chain*)

C<sub>H</sub> - teški lanac imunoglobulina (eng. *heavy chain*)

CDC - citotoksičnost ovisna o komplementu (eng. *complement dependent cytotoxicity*)

CE - kapilarna elektroforeza (eng. *capillary electrophoresis*)

CGE - kapilarna gel-elektroforeza (eng. *capillary gel electrophoresis*)

CV - koeficijent varijacije (eng. *coefficient of variation*)

Dol-P - dolikol fosfat

Dol-P-P - dolikol pirofosfat

ER - endoplazmatski retikulum

ESI - ionizacija elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionisation*)

EOF - elektroosmotska pokretljivost (eng. *electroosmotic flow*)

Fab - fragment koji veže antigen (eng. *fragment antigen binding*)

Fc - fragment koji kristalizira (eng. *fragment crystallizable*)

Fc $\gamma$ R - receptor specifičan za fragment Fc (eng. *fragment crystallizable  $\gamma$  receptor*)

GlcNAc - *N*-acetilglukozamin

GlcNAc-P - *N*-acetilglukozamin fosfat

GlcNAcT-I - *N*-acetilglukozaminiltransferaza I

GlcNAcT-II - *N*-acetilglukozaminiltransferaza II

GlcNAcT-III - *N*-acetilglukozaminiltransferaza III

GlcNAcT-IV - *N*-acetilglukozaminiltransferaza IV

GlcNAcT-V - *N*-acetilglukozaminiltransferaza V

HILIC - tekućinska kromatografija koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

Ig - imunoglobulin

IgG - imunoglobulin G

LacNAc - 2-N-acetillaktozamin

LC - tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)

LIF - laserom inducirana fluorescencija (eng. *laser-induced fluorescence*)

MALDI - matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*)

MS - spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*)

OST - oligosaharil-transferaza

PNGaza F - peptidil-*N*-glikozidaza F

SD - standardna devijacija

Ser - serin

UPLC - tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. *ultra performance liquid chromatography*)

Thr - treonin

TOF - analizator koji mjeri vrijeme leta (eng. *time of flight*)

$t_R$  - vrijeme zadržavanja (eng. *retention time*)

## 1. Uvod

*N*-glikozilacija je ko-translacijska i post-translacijska modifikacija koja osim strukturne ima i funkciju ulogu glikoproteina. Jedan od najzastupljenijih i dobro proučavanih antitijela u ljudskoj krvi je imunoglobulin G (IgG). Glikozilacijsko mjesto na položaju Asn297 polipeptidnog lanca domene CH<sub>2</sub> fragmenta koji kristalizira (eng. *Fragment crystallizable*, Fc) može vezati stotine različitih glikovarijanti kompleksnog bi-antenarnog *N*-glikana, a promjene u *N*-glikozilaciji IgG-a povezane su s kompleksnim bolestima kao što su autoimune, upalne i bolesti raka.<sup>1,2</sup> Također, *N*-glikozilacija utječe na afinitet vezanja fragmenta Fc IgG-a na receptore specifične za fragment Fc (eng. *Fragment crystallizable γ Receptor*, FcγR), čime stimulira staničnu citotoksičnost ovisnu o antitijelima koja je važan mehanizam djelovanja imunološkog sustava.<sup>3</sup> Miševi s uklonjenim genima (eng. *knockout*) koji kodiraju za FcγR mogu dati informacije o ulozi Fc *N*-glikozilacije IgG-a tijekom interakcije Fc-FcγR. Poznate su četiri podklase mišjeg IgG-a: IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3 koje imaju različit afinitet vezanja FcγR-a za IgG te imunološki odgovor u kojem sudjeluju (aktivirajući ili inhibirajući). Osim fragmenta Fc, IgG-a se sastoji i od fragmenta koji veže antigen (eng. *Fragment antigen binding*, Fab) koji je glikoziliran u 15-20 % molekula IgG-a, a nekovalentnim interakcijama veže se na antigene.<sup>3</sup>

Najčešće korištene optimizirane visokoprotočne metode za analizu *N*-glikozilacije su: tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. *Ultra performance liquid chromatography*, UPLC), tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (eng. *Liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS), spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (eng. *Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry*, MALDI-MS) te kapilarna gel elektroforeza (eng. *Capillary gel electrophoresis*, CGE).<sup>4</sup> Međutim, analiza i interpretacija *N*-glikanskih profila kod imunoglobulina nižih koncentracija kao što je IgG iz mišjeg seruma (2-5 mg mL<sup>-1</sup>) zahtijeva daljnji razvoj metodologije kao i software-a za analizu dobivenih podataka.

U ovome radu analizirana je *N*-glikozilacija IgG-a izoliranog iz ljudske plazme metodom CGE-LIF te glikopeptidi fragmenta Fc IgG-a izoliranog iz divljeg tipa i miševa s uklonjenim genima za receptore FcγI, FcγIIB, FcγIII i FcγIV te teški γ lanac IgG-a metodom LC-MS. Metodom LC-MS moguće je razdvojiti glikopeptide po podklasama IgG-a te tako dobiti informaciju o mjesno-specifičnoj *N*-glikozilaciji fragmenta Fc. Cilj analize je dobiti ponovljivu metodu LC-MS kojom će se moći usporediti *N*-glikanski profili kod miševa divljeg tipa te jedinki kojima su uklonjeni geni za receptore Fcγ i γ teški lanac.

Metodom CGE-LIF moguće je analizirati ukupnu promjenu *N*-glikozilacije IgG-a (*N*-glikani fragmenta Fc i Fab) korištenjem DNA analizatora. Svrha analize je optimizacija pripreme uzorka i načina obrade dobivenih podataka za što se analiziraju fluoroforom obilježeni *N*-glikani standardnog uzorka ljudskog IgG-a, a potom analiza *N*-glikozilacije miševa s uklonjenim genima koji kodiraju za Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII i Fc $\gamma$ RIV te  $\gamma$  teški lanac.

## 2. Literaturni pregled

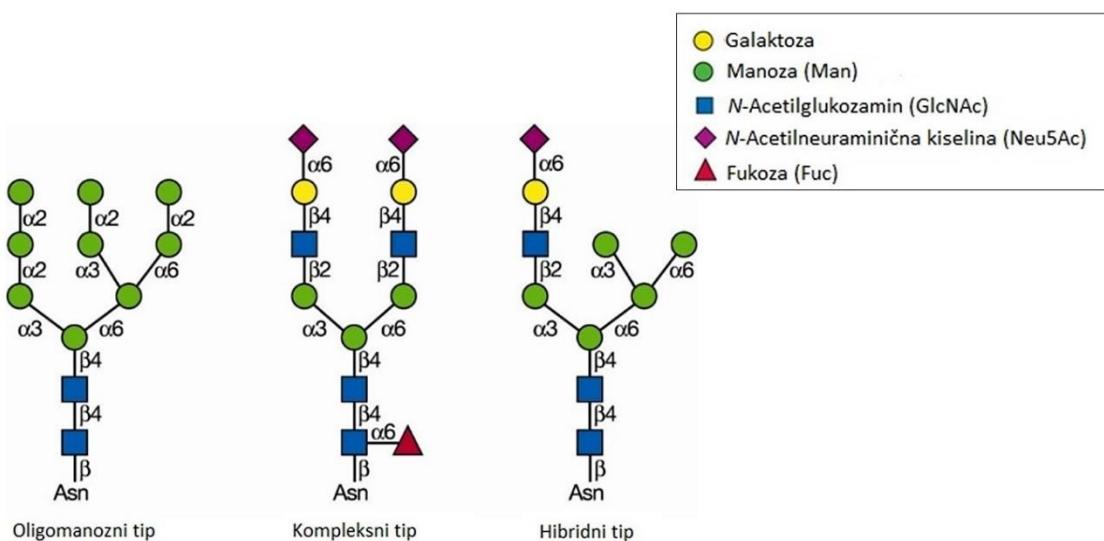
### 2.1. Glikozilacija

Kovalentnim vezanjem polisaharida (glikana) na aminokiselinski ostatak polipeptidnog lanca nastaju glikoproteini, a sami proces modifikacije naziva se glikozilacija. Odvija se u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu u ko-translacijskoj i post-translacijskoj fazi biosinteze proteina. Iako se glikoproteini direktno ne sintetiziraju po uputi DNA, otprilike 5 % genoma kodira glikotransferaze, glikozidne hidrolaze, šećerne transportere i ostale enzime koji sudjeluju u sintezi i metaboliziranju glikana.<sup>5,6</sup> Prema mjestu vezanja glikana na aminokiselinski slijed glikoproteina, najčešće ih dijelimo na *O*-vezane i *N*-vezane glikane. *O*-vezani glikani vežu se glikozidnom vezom preko kisika bočnih ogranka serina i treonina, dok se *N*-vezani glikani povezuju preko dušika asparaginskog ostatka polipeptida.<sup>6</sup> Budući da su se analizirali ukupni *N*-glikani i glikopeptidi koji potječu s konzerviranog mjesta Asn279 fragmenta Fc imunoglobulina G, detaljnije će biti objašnjena samo *N*-glikozilacija.

#### 2.1.1. *N*-glikozilacija

*N*-glikani se kovalentno vežu preko *N*-acetilglukozamina (GlcNAc $\beta$ 1) na dušikov atom asparaginskog bočnog ogranka polipeptida na konsenzusnoj sekvenci Asn-X-Ser/Thr, gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu koja nije prolin. Strukturno se dijele na oligomanozni, kompleksni i hibridni tip kojima je zajednički „sržni“ motiv Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-Asn-X-Ser/Thr (slika 1). Kod oligomanoznog tipa *N*-glikana, manozni ostaci vežu se za sržnu strukturu, dok kompleksni tip ima dvije takozvane „antene“ koje počinju *N*-acetilglukozaminom. Karakteristična struktura hibridnog tipa su manozni ostaci na Man $\alpha$ 1-6 ruci te dvije antene na Man $\alpha$ 1-3 ruci.<sup>5</sup> Biosinteza eukariotskih *N*-glikana odvija se u ER-u, Golgijevom aparatu te plazmatskoj membrani, a ovisi o vrsti i fiziologiji stanice, konformaciji proteina i dostupnosti slijeda Asn-X-Ser/Thr kao i vrsti aminokiseline X. *N*-glikozilacija među ostalim, mijenja fizikalna svojstva te omogućuje pravilno smatanje proteina prije izlaska iz ER-a.<sup>1,5,6</sup> Započinje vezanjem GlcNAc-P na prekursor dolikol fosfat (Dol-P) te nastankom dolikol-pirofosfata *N*-acetilglukozamina (Dol-P-P-GlcNAc) na citoplazmatskoj strani ER-a.

Prekursor Dol-P sastoji se od pet povezanih izoprenskih jedinica te fosfata koji se nalazi na kraju lipidne molekule. Tijekom translokacije glikanskog prekursora po ER-u, četvrnaest šećernih jedinica dodaje se na Dol-P djelovanjem specifičnih glikotransferaza te nastaje Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol čiji se glikanski dio djelovanjem oligosahariltransferaze (OST) prenosi do slijeda Asn-X-Ser/Thr novosintetiziranog polipeptidnog lanca. Slijedi uzastopno odcjepljivanje monomera hidrolazama  $\alpha$ -glukozidazom I i II, a prije izlaska glikoproteina iz ER-a, ER  $\alpha$ -manozidaza I odcjepljuje manozu s centralne ruke Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> te se u *cis*-Golgijev aparat prenosi *N*-glikan s osam manoznih jedinica. Nadalje,  $\alpha$ 1-2 manozidaze IA, IB i IC odcjepljuju  $\alpha$ 1-2Man ostatke do nastanka Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, intermedijera u sintetskom putu hibridnih i kompleksnih glikana.<sup>5</sup> Ukratko će biti objašnjena sinteza kompleksnog tipa *N*-glikana koji započinje u središnjem dijelu Golgijeva aparata, a čiji je put sinteze prikazan na slici 2. *N*-acetilglukozaminiltransferaza I (GlcNAcT-I) dodaje GlcNAc na monomer  $\alpha$ 1-3Man sržnog dijela intermedijera Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> nakon čega slijedi odcjepljenje  $\alpha$ 1-3Man i  $\alpha$ 1-6Man ostataka  $\alpha$ -manozidazom II i dodatak drugog GlcNAc-a djelovanjem *N*-acetilglukozamintransferaze II (GlcNAcT-II). Vezanje drugog GlcNAc-a omogućuje stvaranje dvije „antene“ ili „grane“ kompleksnog *N*-glikana, a djelovanjem enzima *N*-acetilglukozaminiltransferaze IV i V (GlcNAc-IV i GlcNAc-V) nastaju *N*-glikani s tri i četiri „antene“. Također, moguća je i sinteza „račvajućeg“ (eng. *bisecting*) GlcNAc-a koji nastaje dodatkom GlcNAc-a *N*-acetilglukozaminiltransferazom III (GlcNAcT-III) na  $\beta$ -manozu sržne strukture bi-antenarnih, a i višerazgranatih kompleksnih *N*-glikana.<sup>6</sup>



Slika 1. Klasifikacija *N*-glikana. Redom su prikazani oligomanozni, kompleksi i hibridni tip<sup>6</sup>

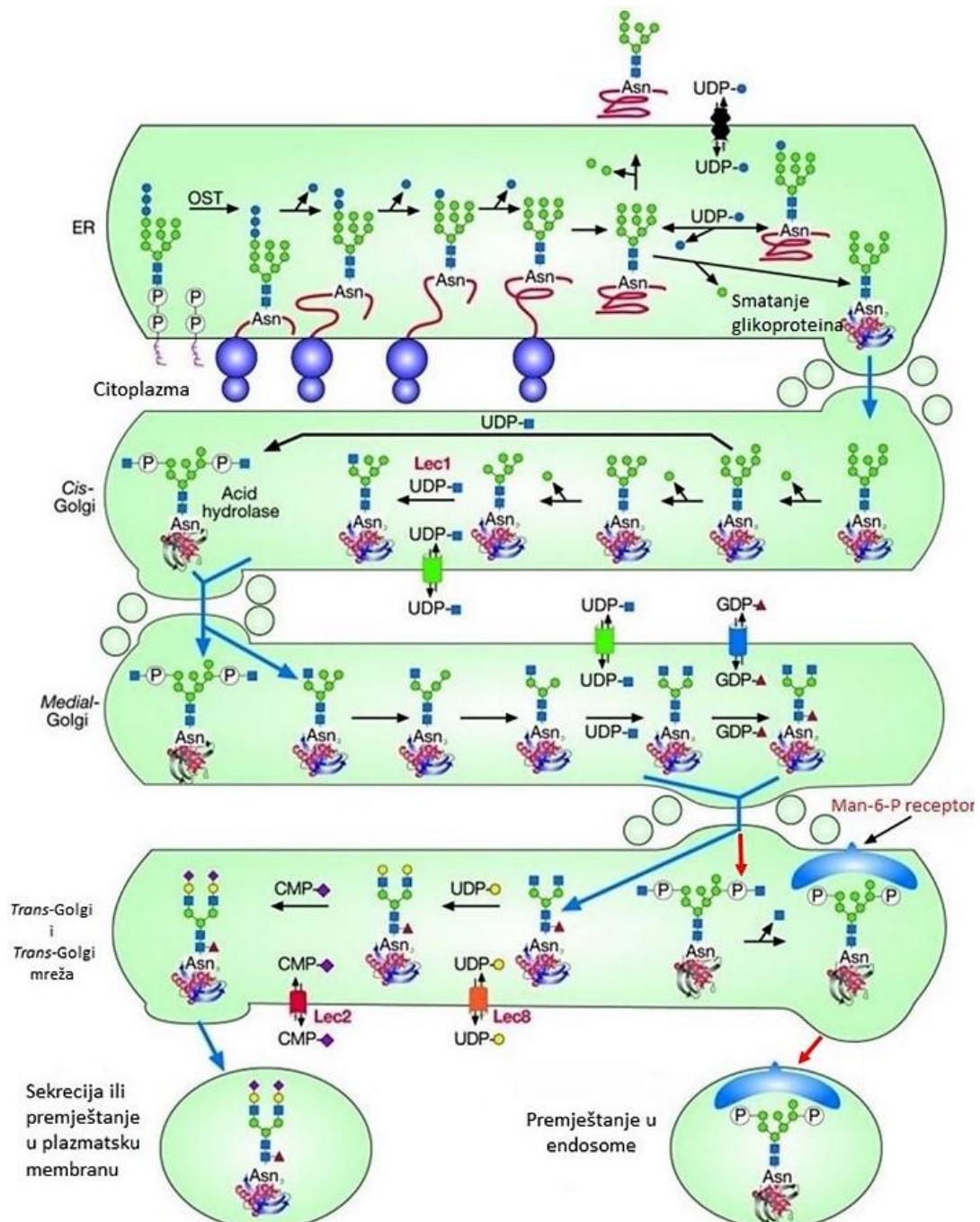
GlcNAcT-III katalizira vezanje GlcNAc-a netom nakon djelovanja  $\alpha$ -manozidaze II, GlcNAcT-II te GlcNAcT-IV i GlcNAcT-V ukoliko se sintetiziraju kompleksni glikani s više grana, a daljnje vezanje monosaharida na premoščujući GlcNAc izostaje, osim u slučaju ako je GlcNAcT-II neaktivna.<sup>1,6</sup> Daljnja biosinteza *N*-glikana odvija se u *trans*-Golgijevom aparatu gdje na grane *N*-glikana  $\beta$ -glikozidnom vezom spaja GlcNAc s galaktozom i nastaje 2-*N*-acetillaktozamin (LacNAc), a moguće je i uzastopno vezanje više LacNAc blokova. Slijedi povezivanje kranjih šećernih jedinica preko  $\alpha$ -glikozidne veze, fukoze, galaktoze, sijalinske kiseline te fosfata.

Kod kralježnjaka, na sržni dio kompleksnog *N*-glikana najčešće se na  $\alpha$ 1-6 mjesto sržne strukture dodaje fukoza djelovanjem  $\alpha$ (1,3) fukoziltransferaze (FucT-VIII).<sup>6</sup> Takva struktura kompleksnog *N*-glikana prikazana je na slici 1. Osim dostupnosti šećernih supstrata, elongacija i krajnje dodavanje šećera (eng. *capping*) ovisi o prisutnosti i aktivnosti enzima koji sudjeluju u transportu i vezanju šećernih jedinica.<sup>1,6</sup> Zreli glikoprotein se izlučuje putem sekrecijskih vezikula ili se transportira u plazmatsku membranu. Glikozilacijsko mjesto Asn-X-Ser/Thr može sadržavati različite strukture *N*-glikana na istoj molekuli glikoproteina što podrazumijeva pojam mjesno-specifične heterogenosti ili mikroheterogenosti, a glicoforma (glikovarijanta) obuhvaća homogene glikoproteine obzirom na strukturu *N*-glikana vezanih na polipeptidni slijed.

## 2.2. Imunoglobulini

Imunoglobulini (Ig) ili antitijela su glikoproteini koje sintetiziraju plazma stanice tijekom humoralnog imunološkog odgovora. Njihova uloga je identifikacija i neutralizacija antigena, stranih tijela u organizmu kao što su npr. bakterije i virusi.<sup>7</sup> Građeni su od dva laka lanca (C<sub>L</sub>, eng. *light chain*) i dva teška lanca (C<sub>H</sub>, eng. *heavy chain*) povezana disulfidnim mostovima. Svaki lanac sastoji se od jednog amino-terminalnog varijabilnog kraja (V) i jednog ili više karboksi-terminalnih konstantnih regija (C) koji imaju 110-130 aminokiselina. Laki lanci, koje dijelimo na lance  $\kappa$  i  $\lambda$ , imaju po jednu domenu C koja zajedno s domenom V ima 25 kDa, a svaki od teških lanaca može imati od 3-4 C domene. Kod Ig-a s 3 C domene kakav je prikazan na slici 3, C<sub>H1</sub> i C<sub>H2</sub> su međusobno povezane disulfidnim vezama u takozvanoj „zglobnoj“ regiji, a njihova masa je otprilike 55 kDa.<sup>7,8</sup> Imunoglobulini se strukturno dijele na fragmente Fc i Fab.

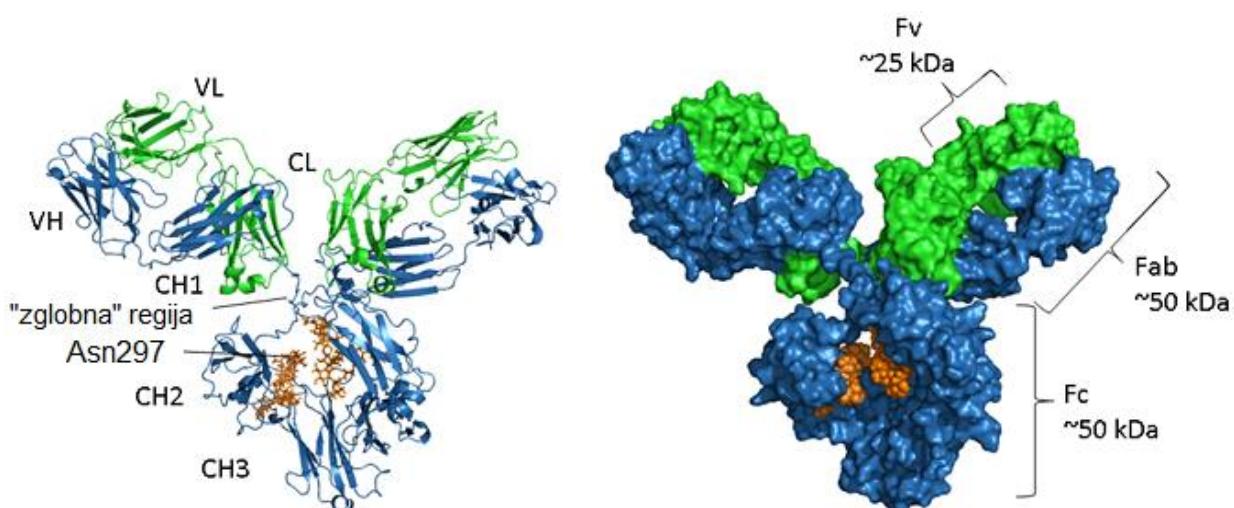
Fragment Fab obuhvaća područje cijelog lakog lanca s domenama  $V_H$  i  $C_{H1}$  teškog lanca, a 6-10 aminokiselina Fab-a koje stupaju u nekovalentne interakcije s antigenom nazivaju se paratop. Fragment Fc sastoji se od domena  $C_{H2}$  i  $C_{H3}$ , a ima regulatornu i funkciju ulogu imunološkog sustava te se prema lancu Fc-a određuju izotipovi i podklase Ig-a. Izotip podrazumijeva istovjetne aminokiselinske slijedove teškog lanca fragmenta Fc koji se označavaju grčkim slovima  $\gamma, \mu, \alpha, \epsilon$  i  $\delta$ , a prema toj podjeli kod sisavaca razlikujemo pet klase Ig-a: IgG, IgM, IgA, IgE i IgD.<sup>7</sup>



Slika 2. Biosintetski put kompleksnih  $N$ -glikana (plave strelice)<sup>6</sup>

### 2.2.1. Biološka uloga N-glikozilacije imunoglobulina G

Imunoglobulini su glikoproteini, a glikozilacijska mjesta, ovisno o klasi Ig-a nalaze se na različitim aminokiselinskim ostacima polipeptida te imaju različite strukturne i funkcionalne uloge.<sup>6</sup> IgG je najzastupljeniji izotip Ig-a u krvi na kojem je provedeno najviše studija među svim klasama Ig-a. Ljudski IgG dijeli se na četiri podklase: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 koje sudjeluju u sekundarnom imunološkom odgovoru te neutralizaciji toksina i virusa, a strukturno se razlikuju u primarnom aminokiselinskom slijedu i broju disulfidnih veza između dva teška lanca. *N*-glikozilacijsko mjesto IgG-a nalazi se na položaju Asn297 polipeptidnog lanca domene CH2 što je prikazano na slici 3. Najčešće su to kompleksni bi-antenarni *N*-glikani od kojih su najviše zastupljene strukture bez galaktoze (H3N4F), s jednom galaktozom (H4N4F) ili dvije galaktoze (H5N4F). U manjoj mjeri zastupljeni su *N*-glikani s tzv. „račvajućim“ GlcNAc-om (H3N5F1), te krajnjim sijalinskim kiselinama (H5N4F1G1 i H5N4F1G2).<sup>9</sup> Spomenute glikoforme označene su prema nomenklaturi *N*-glikana preuzetih iz komercijalnog softwera *LaCy tools*.<sup>10</sup> Interakcijom sa hidrofobnim „džepom“ fragmenta Fc, glikani stabiliziraju strukturu IgG-a pa tako glikovarijante bez dva GlcNAc-a destabiliziraju, dok glikoforme bez galaktoze na obje antene ne utječu na stabilnost glikoproteina.<sup>11,12</sup>



Slika 3. Struktura IgG-a. Plavom su prikazani teški lanci, a zelenom bojom laci lanci čije su varijabilne regije označene slovom V, a konstantne slovom C. Označeno je glikozilacijsko mjesto na asparaginskom ostatku na poziciji 297 aminokiselinskog slijeda. Fv označava varijabilni fragment, Fab fragment koji veže antigen, a Fc fragment koji kristalizira<sup>13</sup>

Prijašnje studije pokazale su kako *N*-glikani fragmenta Fc, osim stabiliziranja IgG-a, interakcijom s receptorima Fc $\gamma$  mijenjaju afinitet vezanja za fragment Fc čime utječu na efektorske funkcije IgG-a. Receptori Fc $\gamma$  pripadaju obitelji imunoglobulinskih proteina, a nalaze se na stanicama koje sudjeluju u obrani imunološkog sustava kao što su makrofagi, stanice ubojice (eng. *killer cells*), neutrofili i bazofili. Kod čovjeka postoje tri klase Fc $\gamma$ R, I, II i III, a razlikuju se prema afinitetu vezanja za fragment Fc i prema signalnom putu kojeg stimuliraju. Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIIA i Fc $\gamma$ RIIIB su aktivirajući receptori, a Fc $\gamma$ RIIB ima ulogu inhibitora od kojih jedino Fc $\gamma$ RI pokazuje veliki afinitet vezanja za fragment Fc.<sup>3</sup> Osim što prepoznaju antigene, imunoglobulini G interakcijom s Fc $\gamma$ R utječu na mehanizme razaranja ciljnih stanica kao što su stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (ADCC, eng. *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*), a vezanjem na komplement C1q na citotoksičnost ovisnu o komplementu (CDC, eng. *Complement Dependent Cytotoxicity*).<sup>7</sup> U današnje vrijeme, monoklonska antitijela koriste se kao terapeutici u liječenju raznih bolesti, a njihove funkcije ovise o sastavu *N*-glikana vezanih na Fc.<sup>2,3,14</sup> Oko 85 % *N*-glikana vezanih na Asn279 fragmenta Fc fukozilirano je na  $\alpha$ 1-6 poziciji sržne strukture, a potvrđeno je da nefukozilirani *N*-glikani povećavaju afinitet vezanja antitijela na Fc $\gamma$ RIIIa, čime pospješuju aktivnost ADCC u *in vivo* i *in vitro* studijama.<sup>15,16</sup> Suprotno tomu, povećan udio krajnjih ostataka sijalinske kiseline smanjuje afinitet vezanja Fc-Fc $\gamma$ RIIIa zbog čega slabi aktivnost ADCC. Također, sijalinizacija fragmenta Fc pospješuje protupalni odgovor, a smanjena razina sijaliniziranih i galaktoziliranih IgG-a uočena je kod ljudi oboljelih od reumatoidnog artritisa.<sup>17-19</sup> Povećan udio galaktoziliranih *N*-glikanskih struktura pojačava afinitet za komplement C1q čime pospješuje aktivnost CDC te lizira ciljne stanice.<sup>20</sup> IgG je nefunkcionalan ukoliko se odcijepe Fc *N*-glikani, zbog čega ne dolazi do vezanja Fc-a i receptora.<sup>11</sup> Kako bi se razjasnila uloga *N*-glikozilacije i način interakcije fragmenta Fc i Fc $\gamma$ R-a tijekom imunološkog odgovora, proučavaju se modelni organizmi.

### 2.3. Miševi s uklonjenim genima za receptore Fc $\gamma$ i $\gamma$ lanac

Uklanjanje gena (eng. *knockout*) podrazumijeva ciljanu deleciju ili inaktivaciju gena organizma. Miševi dijele 99 % homolognih gena s čovjekom, stoga se miševi s uklonjenim genima često koriste kao modelni organizmi za pronalazak i definiranje funkcija gena povezanih s bolestima te za ispitivanje efikasnosti djelovanja novih terapeutika.<sup>21,22</sup>

Kao što je spomenuto, u radu je analizirana *N*-glikozilacija IgG-a izoliranog iz mišjeg seruma divljeg tipa soja C57BL/6 i miševa istog soja s uklonjenim genima koji kodiraju za receptore Fc $\gamma$  te  $\gamma$  teški lanac. Mišji IgG dijeli se na četiri podklase: IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3, a koncentracije kod odrasle jedinke C57BL/6 za svaku podklasu IgG-a iznose  $0,28\text{ mg mL}^{-1}$  za IgG1,  $0,7\text{ mg mL}^{-1}$  za IgG2a,  $1,22\text{ mg mL}^{-1}$  za IgG2b te  $0,18\text{ mg mL}^{-1}$  za IgG3 što je niža zastupljenost IgG-a u serumu u usporedbi s ljudskim IgG-om čija se koncentracija ukupnog IgG-a kreće od  $7,5 - 22\text{ mg mL}^{-1}$ .<sup>23</sup> Receptori Fc $\gamma$  dijele se na četiri klase, a kao kod ljudskog Fc $\gamma$ R-a razlikuju se prema afinitetu vezanja za fragment Fc i prema signalnom putu kojeg stimuliraju. Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ IV su aktivirajući receptori, a Fc $\gamma$ RIIB ima ulogu inhibitora od kojih jedino Fc $\gamma$ RI pokazuje veliki afinitet vezanja za fragment Fc.

*N*-glikozilacijsko mjesto Asn295 konzervirano je kod svih kralježnjaka, međutim postoje razlike u glikozilaciji Fc-a mišjeg i ljudskog IgG. Tako se na primjer kod miševa sintetizira citidin-monofosfo-*N*-glikolineuraminična kiselina (CMP-Neu5Gc) koja se sialil-transferazama prenosi do novosintetizirajućeg *N*-glikana u *trans*-Golgijevom kompleksu, dok je kod ljudi supstrat sialil-transferaze *N*-acetilneuraminična kiselina (CMP-Neu5Ac).<sup>6</sup> Udio fukoziranih *N*-glikana IgG-a (95 %) veći je u usporedbi s ljudskim IgG kod kojeg otprilike 85 % *N*-glikana ima vezanu fukozu na sržnom dijelu strukture. Prema dosadašnjim istraživanjima, mišji IgG nema „račvajući“ GlcNAc, dok su glikoforme većinom monogalaktozilirane na  $\alpha$ 1-3 ruci.<sup>24</sup> Prijašnjim studijima na miševima s uklonjenim genima koji kodiraju za  $\gamma$  teški lanac istražena je i pokazana važnost interakcija Fc-Fc $\gamma$  u humoralanom imunološkom odgovoru.<sup>25,26</sup>

## 2.4. Visokoprotečne metode za analizu *N*-glikozilacije

Promjena *N*-glikozilacije IgG-a povezuje se s nastankom mnogih bolesti, a svojstva monoklonskih antitijela u terapeutima određena su sastavom *N*-glikana fragmenta Fc. Zbog toga je potreban razvoj osjetljivih i robustnih visokoprotečnih metoda za analizu *N*-glikozilacije kod velikog broja uzoraka (do nekoliko tisuća). U današnje vrijeme najčešće se koriste: UPLC, LC-MS, MALDI-MS te CGE.<sup>4</sup> Karakteristike navedenih metoda prikazane su u Tablici 1., a detaljnije će biti objašnjen princip metoda LC-MS i CGE koje su korištene za analizu *N*-glikozilacije mišjeg i ljudskog IgG-a.

Tablica 1. Usporedba visokoprotočnih metoda za analizu *N*-glikozilacije<sup>4</sup>

	<b>UPLC</b>	<b>CGE-LIF</b>	<b>MALDI-TOF-LIF</b>	<b>LC-ESI-MS</b>
Visokoprotočnost	Umjerena, analiza do 50 uzoraka dnevno	Visoka, korištenje multipleksnih kapilara – analiza do 1000 uzoraka dnevno	Visoka, analiza uzorka unutar 1 minute	Umjerena, analiza do 100 uzoraka dnevno
Primjena u glikomici	Jako često	Rijetka	Jako često	Umjerena
Razlučivost	Visoka	Visoka	Vrlo visoka	Vrlo visoka
Razdvajanje izomera	Dobro	Vrlo dobro	Nije moguće	Loše
Kvantifikacija	Jako dobra	Dobra	Umjerena	Dobra
Prednosti za genetska i epidemiološka istraživanja	Pouzdana kvantifikacija, robustnost	Jednostavnost pripreme uzorka, niski troškovi, visoka robustnost i protočnost, pouzdana relativna kvantifikacija, osjetljivost	Niski troškovi, visoka protočnost, mjesno-specifična i strukturna glikozilacijska analiza	Pouzdana kvantifikacija, mjesno-specifična i strukturna glikozilacijska analiza
Nedostaci genetskih i epidemioloških istraživanja	Niska protočnost, visoki troškovi, nemogućnost mjesno-specifične glikozilacijske analize	Nemogućnost mjesno-specifične glikozilacijske analize, nedostupnost baza podataka	Gubitak sijalinskih ostataka tijekom analiza, niska reproducibilnost	Visoki troškovi
Troškovi opreme (u eurima)	40 - 70 000	100 000	100 - 150 000	200 - 500 000

## 2.5. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Tekućinska kromatografija je analitička tehnika u kojoj se analit raspodjeljuje između pokretne faze (tekućine) i nepokretne faze. Prema načinu odjeljivanja na kromatografskoj koloni razlikujemo tehnike koje se temelje na razdjeljenju između dvije faze, adsorpciji, ionskoj izmjeni, odvajanju prema veličini te specifičnim interakcijama analita i nepokretne faze.<sup>27</sup> Zbog različitih brzina gibanja, sastojci uzorka stvaraju vrpce (zone) koje imaju različito vrijeme ispiranja (eluacije) s kromatografske kolone u kojem se bilježi odziv detektora. Vrijeme koje se mjeri od unošenja uzorka do odziva detektora naziva se vrijeme zadržavanja  $t_R$  (eng. *retention time*). To je mjera koja se izražava kao zbroj vremena koje je potrebno da sastojak prođe kroz kolonu bez zadržavanja  $t_M$  (mrvo vrijeme) i vremena za koje se sastojak zadržava na nepokretnoj fazi  $t_N$ :

$$t_R = t_M + t_N.$$

Ovisi o nepokretnoj fazi, vrsti i protoku mobilne faze te radnim uvjetima kromatografije kao što su temperatura uzorka i kolone, tlak i protok mobilne faze. Gradijentnim eluiranjem, odnosno mijenjanjem udjela pokretnih faza tijekom ispiranja, moguće je postići bolju rezoluciju tijekom analize nego korištenjem takozvanog izokratnog eluiranja pri kojem se udio pokretnih faza ne mijenja.<sup>26</sup> U ovome radu koristila se kromatografija obrnutih faza uz gradijentno eluiranje. Kromatografijom obrnutih faza nazivamo metodu kod koje se koristi nepolarna nepokretna faza (najčešće C-18, C-8) i polarna pokretna faza (vodena otopina). Odvajanje glikopeptida temelji se na hidrofobnim interakcijama polipeptidnog lanca i nepokretne faze (C-18). Eluiranje počinje s većim udjelom polarnog otapala prilikom čega s kolone najprije izlaze hidrofilne molekule dok se hidrofobne molekule iz polarne faze vežu na nepokretnu fazu. Povećavanjem udjela manje polarnog otapala, smanjuju se hidrofobne interakcije analita i nepokretne faze te se s kolone eluiraju nepolarne molekule. Što su molekule hidrofobnije jače će se vezati za nepokretnu fazu te je potrebna veća koncentracija nepolarnog otapala za eluaciju.<sup>26,28</sup> Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) najviše se primjenjuje među tehnikama razdjeljivanja. Uređaj se sastoji od spremnika otapala te crpki i ventila za dovođenje otapala, uređaja za otklanjanje mjeđurića, kućišta u kojem se nalaze uzorci (eng. *autosampler*) i sustava za unošenje uzorka, kućišta za kolonu i detektora. Uzorci koji se nalaze u *autosampler-u* uvode se u kolonu premosnim injektorom s petljom pri visokom tlaku (do 600 bara), uz stalan protok pokretne faze.

Kolone koje se upotrebljavaju su duljine 30-70 mm s unutrašnjim promjerom  $\leq 1$  mm i promjerom punila  $\leq 5\mu\text{m}$ . Za osjetljiviju, efikasniju i bržu analizu koristi se tekućinska kromatografija nano-ultra-visoke djelotvornosti (eng. *nano-Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, nano-UHPLC ili kraće nano-UPLC) čije su karakteristike unutrašnji promjer 0,05 do 0,1 mm, protok pokretne faze od 0,1 do 1  $\mu\text{L min}^{-1}$ .<sup>26,29</sup> Detektori koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji temelje se na apsorpciji (UV-Vis detektori), fluorescenciji, vodljivosti i indeksu loma. Također moguće je povezati dvije tehnike pa se kao detektor može koristiti spektrometar masa (eng. *mass spectrometry*, MS).<sup>26</sup> U ovome radu koristio se spektrometar masa s ionizacijom elektroraspršenja (eng. *Electrospray Ionisation*, ESI), kvadrupolom i analizatorom koji mjeri vrijeme leta (eng. *Time Of Flight*, TOF).

MS je tehnika kojom se detektiraju prethodno ionizirane molekule razdvojene u vremenu ili prostoru prema omjeru mase i naboja. Analit se najprije ionizira, a zatim se pri stalnom protoku pokretne faze, preko međuspoja ESI prihvata protok do 1  $\text{mL min}^{-1}$  te eliminira otapalo prije uvođenja u komoru za prijenos iona pri tlaku do  $3 \times 10^{-4}$  mbara.<sup>30,31</sup> ESI se temelji na raspršivanju tekućine u sitne nabijene kapljice primjenom jakog električnog polja. Isparavanjem otapala smanjuje se veličina kapljica uz nakupljanje naboja na površini pa se pod utjecajem Coulombovih sila kapljica neprestano dijeli do nastanka iona. Ioni se potom usmjeravaju na kvadrupol te se sustavom leća ubrzavaju prema TOF-u.<sup>29</sup> TOF koji se koristio za analizu glikopeptida sastoji se od ortogonalnog akceleratora, reflektrona (ionsko zrcalo) i detektora. Mjeri se vrijeme  $t$  za koje ion prijeđe udaljenost  $l$  od izvora do detektora, a proporcionalno je omjeru mase  $m$  i naboja iona  $z$  prema izrazu:

$$t = \sqrt{\frac{m \times l^2}{z \times 2 \times V \times e}}$$

gdje je  $V$  električki potencijal, a  $e$  naboј elektrona.<sup>29,31</sup> Ioni se u ortogonalnom akceleratoru propuštaju u pulsevima i ubrzavaju prema reflektronu gdje se normalizira razlika kinetičkih energija iona te povećava razlučivost. To se postiže na način da ioni iste mase, ali različite kinetičke energije, različitom dubinom prodiru u električno polje. Ioni s višom kinetičkom energijom dulje se zadržavaju u zrcalu zbog čega na detektor stižu u isto vrijeme kao i ionii iste mase, a niže kinetičke energije. Detektor pretvara ionski signal u električni preko ploče mikrokanalnog detektora koji je građen od velikog broja malih pora, a svaka zasebno radi kao elektronski multiplikator.<sup>29,30</sup>

## 2.6. Kapilarna gel-elektoforeza s laserom induciranim fluorescencijom

Elektroforeza je kretanje nabijenih čestica u električnom polju. Osnovna instrumentacija kapilarne elektroforeze (eng. *Capillary Electrophoresis*, CE) uključuje izvor visokog napona (0-30 kV), kapilaru s unutarnjim promjerom  $\leq 200 \mu\text{m}$ , dvije posude s puferskim otopinama i vodljivim elektrodama te detektor. Kapilara ispunjena puferom povezuje posude u kojima se nalaze puferske otopine pa se primjenom napona, ovisno o polarnosti, analit kreće prema katodi, odnosno anodi. Separacija analita se temelji na različitoj brzini pokretanja iona  $v$  primjenom električnog polja prema jednadžbi:

$$v = \mu_e \times E$$

gdje je  $\mu_e$  elektroforetska pokretljivost, a  $E$  jakost električnog polja.<sup>33</sup> Elektroforetska pokretljivost ( $\mu_e$ ) je fizikalna konstanta koja se određuje pri potpunoj disocijaciji ( $\alpha = 1$ ) ekstrapolacijom pri beskonačnom razrijeđenju, a razlikuje se od eksperimentalno određene elektroforetske pokretljivosti  $\mu_{ep}$  koja je definirana prema:

$$\mu_{ep} = \frac{L}{t \times E}$$

gdje je  $L$  udaljenost koju ion prijeđe u vremenu  $t$  primjenom električnog polja  $E$ .<sup>34,35</sup> Ovisi o naboju, veličini, obliku molekule, viskoznosti, veličini pora, pH pufera, ionskoj jakosti i temperaturi medija.<sup>28</sup> Brzina pokretljivosti iona  $v$  ovisi i o elektroosmotskoj pokretljivosti otopine elektrolita (eng. *Electroosmotic flow*, EOF), koja se za otopine elektrolita  $v_{eo}$  definira kao:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon \times \zeta}{4\pi\eta} \times E$$

gdje je  $\epsilon$  dielektrična konstanta otopine,  $\eta$  je viskoznost otopine elektrolita, a  $\zeta$  zeta potencijal na unutrašnjoj strani kapilare. Kvarcne kapilare koje se najčešće koriste u CE, obložene su nabijenim silanolnim grupama koje privlače pozitivno nabijene ione iz pufera stvarajući električni dvosloj. Primjenom napona, zbog utjecaja EOF-a, kationi iz električnog dvosloja migriraju prema negativno nabijenoj katodi rezultirajući u jednolikom pokretanju pufera prema katodi. Time je omogućeno istovremeno analiziranje kationa, aniona i neutralnih molekula. EOF utječe na vrijeme potrebno za separaciju analita, pa je sukladno tome potrebno prilagoditi duljinu kapilare i pH pufera.

Pri niskom pH može doći do adsorpcije kationa na površinu kapilare što posljedično može smanjiti reproducibilnost analize, dok pri visokom pH može doći do prebrzog eluiranja analita i smanjene efikasnosti. Optimiziranjem uvjeta kao što su pH, ionska jakost, temperatura i jakost električnog polja može se kontrolirati EOF, no u današnje vrijeme više se primjenjuje modifikacija unutarnje površine kapilare ionskim ili hidrofobnim prevlakama te automatska zamjena polimera nakon svake analize.<sup>32</sup>

Kod kapilarne gel elektroforeze, kapilara je ispunjena prikladnim polimerom koji ima ulogu „molekulskog sita“ te se molekule prolaskom kroz pore razdvajaju prema molekulskoj veličini. Iako se najčešće koristi detekcija UV-Vis-om, laserom inducirana fluorescencija (eng. *Laser induced fluorescence*, LIF) mnogo je osjetljivija metoda kojom se može mjeriti koncentracija u rasponu  $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  mol dm<sup>-3</sup>.<sup>28,29</sup> DNA sekvenci primjenjuju se za analizu glikozilacije metodom CGE-LIF. Poliakrilamidni polimeri obično se koriste za razdvajanje fluorescentno obilježenih glikana, dok se ionski argonski laser koristi za pobudu elektrona korištenih fluorofora. Mjesto za uzorke omogućava kontakt uzoraka s katodom i jednim krajem staklene kapilare napunjene polimerom. Anoda je na drugom kraju kapilare uronjena u pufer. Primjenom električnog polja, uzorak ulazi u kapilaru kako struja teče od katode prema anodi u procesu elektrokinetičkog injektiranja. Nakon injektiranja, jedan kraj kapilare blizu katode uranja se u pufer te se ponovnom primjenom napona nastavi elektroforeza. Kada analit dođe u područje kapilare na kojem se nalazi detektor, laserom se pobuđuju elektroni fluorofora kojima je prethodno obilježen analit, a emitirana fluorescencija fokusira se na CCD kameru.<sup>36</sup> Budući da se radi o detektoru koji mjeri fluorescenciju, prije analize nužno je derivatizirati uzorke koji ne sadrže fluorofore. Važno je istaknuti kako su *N*-glikani većinom neutralne molekule pa zbog toga derivatizacija fluoroforom koji nosi jedan ili više negativnih naboja, osim detekcije, omogućava separaciju u električnom polju. 1-aminopiren-3,6,8-trisulfonat (APTS) je fluorescencijski reagens koji se koristi za označavanje slobodnih glikana u dva koraka mehanizmom reduktivne aminacije.<sup>37</sup> U prvom koraku aciklički monosaharid i APTS tvore Schiffovu bazu, a potom se nastali imin reducira korištenjem natrijeva cijanoborohidrida ili 2-pikolin borana. Valna duljina pobude nakon vezanja na slobodni glikan je 434 nm, dok je valna duljina emisije pri 520 nm jednaka valnoj duljini emisije boje koja se koristi prilikom DNA sekvenciranja.<sup>38</sup> Budući da APTS ima tri sulfonske skupine APTS-glikani razdvajaju se u širokom rasponu pH vrijednosti. Zbog mogućnosti primjene jakog električnog polja, analize metodom CGE-LIF su kratke, a efikasnost razdvajanja i rezolucija su visoke. Korištenjem više kapilara poredanih u niz, moguća je visokoprotočna analiza istovremenim mjeranjem do 96 uzoraka.

### 2.6.1. Metoda HILIC

APTS-om vezani *N*-glikani pročišćavaju se od nevezanih fluorofora metodom hidrofilne interakcijske tekućinske kromatografije (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC). Metodom HILIC analit se razdvaja između hidrofilne nepokretne faze i vodene polarne pokretne faze (najčešće vodena otopina acetonitrila). Mehanizam odjeljivanja temelji se na takozvanom tekućina-tekućina razdjeljenju kod kojeg se analit razdvaja između sloja u kojem se nalazi voda (uz površinu nepokretne faze) i sloja bez vode (pokretne faze). Polarne komponente uzorka jače se vežu za vodenih hidrofilnih slojeva nepokretne faze te se analiti eluiraju povećanjem polarnosti pokretne faze. Kod pročišćavanja *N*-glikana obilježenih APTS-om, polarni glikani zadržavaju se na poliakrilamidnoj nepokretnoj fazi, dok se nevezane molekule APTS-a ispiru vodenom otopinom acetonitrila uz dodatak trietilamina (TEA). Pročišćeni obilježeni *N*-glikani eluiraju se vodom.<sup>26,27</sup>

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1 Materijali**

##### *3.1.1. Kemikalije*

Acetonitril, UV-HPLC čistoće (ACN) (*Scharlab*), acetonitril, LC-MS čistoće (*J.T.Baker*), amonijev hidrogenkarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) (*Acros Organics*), citratna kiselina (*Sigma-Aldrich*), formamid (*Applied biosystems*), dimetil sulfoksid (DMSO), etanol (*Carlo Erba*), formijatna kiselina (FA) (*Merck*), Igepal CA-630 (*Sigma-Aldrich*), izopropanol (*Sigma-Aldrich*) kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (*Sigma-Aldrich*), kalijev klorid (KCl) (*EMD Milipore*), natrijev dodecil-sulfat (SDS) (*Sigma-Aldrich*), natrijev klorid (NaCl) (*Carlo Erba*), natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (*Acros Organics*), natrijev hidroksid (NaOH) (*Kemika*), trietilamin (TEA) (*Sigma-Aldrich*), trifluoroctena kiselina (TFA) (*Chromasolv*), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (*Acros Organics*), 2-pikolin boran (PB) (*Sigma-Aldrich*), (*Sigma-Aldrich*), propionska kiselina (*Sigma-Aldrich*)

##### *3.1.2. Enzimi, boje i standardi za veličinu*

Tripsin (*Promega*) - 0,2  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  enzima se pomiješa s octenom kiselinom koncentracije 20  $\text{mmol dm}^{-3}$ , pohranjen na -20 °C. Koristi se za razgradnju IgG-a tijekom pripreme uzorka za analizu metodom LC-MS.

Peptidil-*N*-glikozidaza-F (*PNGaza F, Promega*) - 10 U  $\mu\text{L}^{-1}$  (1 U - količina PNGaze F koja katalizira oslobođanje *N*-vezanih oligosaharida s 10  $\mu\text{g}$  denaturirane ribonukleaze B pri pH 7,5 i temperaturi od 37 °C u 10  $\mu\text{L}$  tijekom jednog sata).<sup>39</sup> Koristi se za deglikozilaciju *N*-glikana tijekom pripreme uzorka za metodu CGE-LIF.

APTS (*Sigma-Aldrich*) - fluorofor koji se koristi za označavanje glikana reakcijom reduktivne aminacije za analizu metodom CGE-LIF.<sup>40</sup>

GeneScan 500 Rox Size Standard (*Thermo Fisher Scientific*) - unutarnji standard za veličinu fragmenta DNA prema čijem se migracijskom vremenu određuju relativna migracijska vremena fluoroforom obilježenih *N*-glikana tijekom analize metodom CGE-LIF.<sup>41</sup>

### *3.1.3. Puferske otopine*

10 x PBS - 1,370 mol dm<sup>-1</sup> otopine NaCl, 0,097 mol dm<sup>-1</sup> otopine Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,022 mol dm<sup>-1</sup> otopine KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,027 mol dm<sup>-1</sup> otopine KCl (pH = 6,6).

1 x PBS - razrijediti 100 mL pufera 10x PBS u 1 L ultra čiste vode, podesiti pH = 7,4 korištenjem otopine NaOH.

Pufer za eluaciju IgG-a - 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopine formijatne kiseline (pH = 2,5).

Pufer za neutralizaciju IgG-a - 1 mol dm<sup>-3</sup> otopine NaHCO<sub>3</sub>.

Pufer za pohranu Protein G pločice - 20 % otopina EtOH u 20 mmol dm<sup>-3</sup> otopini Tris i 0,1 mol dm<sup>-3</sup> otopini NaCl, podesiti pH = 7,4 otopinom HCl.

310x *Genetic Analyser* pufer s EDTA (*Applied Biosystems*) - koristi se za analizu metodom CGE-LIF korištenjem 3130 *Genetic Analyzer*.<sup>42</sup>

### *3.1.4. Pločice*

0,45 µm GHP AcroPrep (Pall) - filter pločica s 96 jažica koje mogu zaprimiti volumen od 1 mL i polipropilenskom membranom veličine pora 0,45 µm. Koristi se za filtriranje uzorka plazme prije izolacije IgG-a.

0,1 µm PE Frit (*Orochem*) - filter pločica s 96 jažica koje mogu zaprimiti volumen od 700 µL i polipropilenskom membranom veličine pora 0,1 µm. Koristi se pročišćavanje glikopeptida na C-18 čvrstoj fazi.

Pločica s Proteinom G (*BIA Separations*) – pločica s 96 jažica volumena 200 µL. Koristi se za izolaciju IgG-a iz ljudske plazme.

0,2 µm GHP *AcroPrep* (Pall) – filter pločica s 96 jažica volumena 350 µL i polipropilenskom membranom veličine pora 0,2 µm. Koristi se za pročišćavanje APTS-om obilježenih glikana.

2 mL Pločica za skladištenje uzorka (*Waters*) - pločica s 96 jažica koje mogu zaprimiti volumen od 2 mL. Koristi se sakupljanje uzorka prilikom izolacije IgG-a na Protein G pločici i sakupljanje eluata obilježenih N-glikana.

200 µL PCR Robotic pločica (*Thermo scientific*) - pločica s 96 jažica koje mogu zaprimiti volumen od 200 µL. Koristi za tripsinizaciju IgG-a i sakupljanja pročišćenih glikopeptida.

MicroAmp Optical Reaction pločica (*Thermo scientific*) - pločica s 96 jažica koje mogu zaprimiti volumen od 200 µL. Koristi se za analizu uzorka metodom CGE-LIF.

### *3.1.5. Čvrste faze za pročišćavanje*

Chromabond C-18 (*Macherey-Nagel*) - silika gel, veličina pora: 60 Å, veličina čestica 45 µm

Bio-gel P-10 (*Bio-Rad*) - poliakrilamidni gel, veličina čestica 45-90 µm

### *3.1.6. Uredaji*

Centrifuge 5804 (*Eppendorf*) - višenamjenska centrifuga

SpeedVac Concentrator Savant SC210A (*Thermo*) - uređaj za otparavanje uz centrifugiranje s hladnom stupicom za paru Savant RVT400 i vakuum pumpom OFP400. Koristi se za sušenje i ukoncentriravanje uzorka.

Vacuum Manifold (*Milipore*) - vakuum uređaj za pločice.

Lab. Incubator (*M.R.C.*) - inkubator termostatiran na 37 °C i 65 °C.

MicroSealer (*MicroSeal*) - uređaj za prijanjanje aluminijске mikrofolije na pločice.

## **3.2. Korišteni uzorci**

Za provođenje ovog istraživanja koriste se uzorci imunoglobulina G izolirani iz ljudske plazme zdravog ispitanika te uzorci mišjeg seruma iz soja C57BL/6 prikupljeni u Laboratoriju za genetiku Biološkog odsjeka Sveučilišta Erlangen-Nürnberg u sklopu projekta EU FP7 „High glycan“. Procjenom etičnosti znanstvenog istraživanja, istraživanje je odobreno odlukom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta.

Standardni i biološki uzorci mišjeg IgG-a izolirani su iz 250-300 µL krvnog seruma divljeg tipa soja C57BL/6 i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju receptore Fc $\gamma$ I, Fc $\gamma$ IIB, Fc $\gamma$ III i Fc $\gamma$ IV te teški  $\gamma$  lanac IgG-a. Standardni uzorci ljudskog IgG-a izolirani su iz 100 µL krvne plazme.

## **3.3. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme**

Afinitetna kromatografija za izolaciju IgG-a iz krvne plazme i seruma temelji se na vezanju IgG-a na monolitičku pločicu s Proteinom G. Uzorci mišjeg IgG-a prethodno su izolirani u svrhu drugih testiranja iz 250-300 µL seruma te su prije korištenja skladišteni na temperaturi od - 20 °C. Za potrebe optimizacije metode CGE-LIF, u ovome radu, izoliran je samo IgG iz standardnog uzorka ljudske plazme. Plazma se najprije centrifugira 3 minute na 3000 rpm kako bi se odvojili lipidi te se otpipetira po 100 µL u 2 mL pločicu za skladištenje uzorka. Svaki uzorak razrijedi se 7 puta s 1x PBS te se razrijeđena plazma prebaci u 1 mL 0,45 µL Acro Prep GHP filter pločicu. Uzorci se filtriraju korištenjem vakuum uređaja za pločice u novu 2 mL pločicu za skladištenje uzorka te se potresaju na uređaju na miješanje do korištenja.

### *3.3.1. Pripremanje pločice s Proteinom G*

Prije izolacije IgG-a na monolitskoj pločici s Proteinom G, potrebno je pripremiti pločicu za korištenje. U narednim koracima ispiranja, neutralizacije i uravnotežavanja uvjeta koristi se vakuum uređaj pri tlaku koji ne prelazi 430 mm Hg. Protein G pločica inspire se najprije pipetiranjem 2 mL ultra čiste vode, a potom po 2 mL 1x koncentrirane otopine PBS-a i 1 mL formijatne kiseline koncentracije 0,1 mol dm<sup>-3</sup> u svaku jažicu.

Nakon svakog dodavanja navedenih otopina primjeni se vakuum. Pipetira se po 1 mL 10x koncentrirane otopine PBS-a za neutralizaciju nakon čega se primjeni vakuum. Za uravnotežavanje uvjeta pločice s Proteinom G doda se 2 mL 1x koncentrirane otopine PBS-a nakon čega se primjeni vakuum.

### *3.3.2. Vezanje imunoglobulina G i eluacija*

Filtrirana plazma prebaci se na pločicu s Proteinom G te se primjeni vakuum uređaj za pločice pri tlaku koji ne prelazi 250 mm Hg. Otpipetira se po 2 mL 1x koncentriranog PBS-a koji veže IgG za čvrstu fazu pločice te se filtrira uz vakuum koji ne prelazi 430 mmHg. IgG se eluira s 1 mL otopine formijatne kiseline koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  u 2 mL pločicu za skladištenje. Primjeni se vakuum uz tlak od 250 mm Hg. IgG se neutralizira dodatkom  $170 \mu\text{L}$  otopine  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  koncentracije  $1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Nakon korištenja, pločicu potrebno je regenerirati ispiranjem s po 2 mL otopine formijatne kiseline koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , 2 mL 10x koncentriranog PBS-a i 2 mL 1x koncentriranog PBS-a. Iza svakog dodavanja navedenih otopina primjeni se vakuum od 430 mm Hg. Pločica s Proteinom G stavi se u pufer za skladištenje i čuva na temperaturi od  $4^\circ\text{C}$ .

### *3.3.3. Određivanje koncentracije imunoglobulina G*

Koncentracija IgG-a mjeri se pri valnoj duljini od 280 nm korištenjem spektrofotometra *NanoDrop 8000 (Thermo Scientific)*.

Koncentracija prethodno izoliranog standardnog uzorka ljudskog IgG-a iz alikvota od  $20 \mu\text{L}$  iznosi  $0,60 \text{ mg mL}^{-1}$ . Uzorci mišjeg IgG-a koji su prethodno bili skladišteni na  $-20^\circ\text{C}$ , odleđeni su na sobnoj temperaturi nakon čega je mjerena koncentracija. Budući da je koncentracija mišjeg IgG  $< 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  nije moguće precizno mjeriti koncentraciju spektrofotometrom *NanoDrop 8000*, zbog čega je potrebno ukoncentrirati uzorku sušenjem u uređaju za otparavanje uz centrifugu. Sav uzorak mišjeg IgG-a se posuši nakon čega se ponovno mjeri koncentracija. Uzorak se resuspendira u otopini amonijeva formijata koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , a nakon ponovnog mjerjenja prosječna vrijednost za standardne mišje uzorku u  $40 \mu\text{L}$  amonijeva formijata iznosi  $0,68 \text{ mg mL}^{-1}$ , a za biološke uzorku u  $45 \mu\text{L}$  otopine amonijeva formijata  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### **3.4. Analiza metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa**

#### *3.4.1. Razgradnja imunoglobulina G tripsinom*

Mišji IgG razgrađuje se u manje peptide tripsinizacijom. 100 µL tripsina razrijedi se u 1 mL hladne ultra čiste vode, a potom se doda 10 µL otopine tripsina u svaki uzorak uz miješanje pipetiranjem. Prije inkubacije uzorka potrebno je provjeriti pH uzorka koji ne smije prelaziti pH = 6. Pločica se hermetički zatvori mikrofolijom, centrifugira te inkubira 18 sati na 37 °C.

#### *3.4.2. Pročišćavanje glikopeptida*

Glikopeptidi se pročišćavaju kromatografijom obrnutih faza uz ekstrakciju na C-18 čvrstoj fazi. Ispiranje uzorka i eluiranje odvija se pri tlaku koji ne prelazi 50 mm Hg. Priredi se suspenzija C-18 sorbensa u 80 %-tnoj otopini ACN-a i 0,1 %-tne otopine TFA koncentracije 50 mg mL<sup>-1</sup> te se doda 100 µL suspenzije u svaku jažicu 0,1 µm PE Frit filter pločice. Prije nanošenja uzorka, potrebno je isprati i uravnotežiti uvjete pločice. Za ispiranje se koristi 80 %-tna otopina ACN-a i 0,1 %-tna otopina TFA. U jažice se nanese 3x po 200 µL otopine za ispiranje, a potom se iza svakog nanošenja primjeni vakuum. 3x po 200 µL 0,1 %-tne otopine TFA otpipetira se u jažice te se primjeni vakuum, nakon što je pločica spremna za ekstrakciju. U jažice se nanesu uzorci glikopeptida prethodno razrijeđeni 10 puta u 0,1 %-tnoj TFA. Slijedi inkubacija 2 min, nakon čega se primjeni vakuum. Za ispiranje uzorka doda se 3x po 200 µL 0,1 %-ne TFA te se primjeni vakuum. Filter pločica se stavi na pločicu za skladištenje uzorka koja služi kao stalak te se centrifugira 15 sekundi nakon čega se postavi na PCR Robotic pločicu za sakupljanje eluata. Glikopeptidi se eluiraju pipetiranjem po 200 µL 20 %-tne otopine ACN-a i 0,1 %-tne otopine TFA u svaku jažicu s uzorkom centrifugiranjem od 300 do 800 rpm u trajanju od 5 minuta. Brzina centrifugiranja povećava se za 100 rpm-a svake minute. Prije centrifugiranja, uzorci se inkubiraju u eluensu 2 minute. Eluati se osuše u uređaju za otparavanje uz centrifugiranje, a potom se PCR pločica hermetički zatvori mikrofolijom i pohrani na -20 °C do upotrebe ili se dalje koristi za analizu.

### *3.4.3. Analiza glikopeptida fragmenta Fc metodom LC-MS*

Eluati glikopeptida se prije analize resuspendiraju dodatkom 20 µL ultra čiste vode te se najprije razdvaje tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti korištenjem Nano AQUITY uređaja (*Waters*), a potom se analiziraju spektrometrom masa. Volumen injektiranja je 10 µL. Uzorci najprije prolaze C-18 SPE „trap“ kolonom (Acclaim PepMap100, 5mm x 300 µm, *Dionex*), eluiranjem s 0,1 %-tnom otopinom TFA pri protoku od 40 µL min<sup>-1</sup>. Nakon toga, razdvajaju se kromatografijom obrnutih faza korištenjem C-18 nano-kolone (*Halo*, 150 x 100 µm). Pokretne faze su 0,1 %-tna otopina TFA (pokretna faza A) te 80% -tna otopina ACN-a i 0,1 %-tna otopina TFA (pokretna faza B). Gradijent za razdvajanje podklasa IgG-a počinje s 18,5 % mobilne faze B, a završava s 26 % pokretne faze B uz protok 1 µL min<sup>-1</sup>. Uzorci s UPLC kolone uvode se preko međuspoja „sheat-flow“ ESI u spektrometar masa (micrOTOF-Q, *Brucker Daltonics*). Kako bi se smanjilo ionsko sparivanje TFA u plinovitom stanju prilikom korištenja ESI, smjesa 50 %-tnog izopropanola i 20 %-tne propionske kiseline dovodi se na izvor iona uz protok od 2 µL min<sup>-1</sup> što podrazumijeva „sheat-flow“. Ioni se dijele na temelju omjera m / z u TOF-u, a spektri masa snimani su u rasponu vrijednosti m / z od 600 Hz do 1900 Hz pri frekvenciji od 0,5 Hz u pozitivnom modu. Ukupno vrijeme analize po uzorku je 17 minuta.

### *3.4.4. Procesiranje i analiza podataka*

Analizirani glikopeptidi kalibriraju se listom poznatih vrijednosti m / z glikopeptida, a dobiveni spektri otvaraju se u mzXML formatu korištenjem Compas DataAnalysis 3.2 (*Bruker*) softwera. Kvantificiraju se površine 95 % izotopa u cjelokupnoj izotopnoj raspodjeli glikoformi za dvostruko i trostruko nabijene ione korištenjem komercijalnog programa *LaCy tools*.<sup>10</sup> Značajnost razlika među udjelima normaliziranih površina glikoformi za pojedinu klasu IgG-a divljeg tipa i miševa s uklonjenim genima za FcγR, testiraju se Mann-Whitneyevim U testom uz FDR (eng. *False Rate Discovery*) korekciju p vrijednosti.<sup>43</sup>

### **3.5. Analiza metodom kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranim fluorescencijom**

#### *3.5.1. Deglikozilacija*

20  $\mu\text{L}$  eluata IgG-a iz ljudske plazme prethodno izoliranog na pločici s Proteinom G koncentracije 0,6 mg  $\text{mL}^{-1}$  se prenese na 1 mL pločicu za skladištenje uzoraka, a zatim se osuše u uređaju za otparavanje uz centrifugiranje. IgG se resuspendira dodatkom po 3  $\mu\text{L}$  1,66x koncentriranog pufera PBS-a (1 mL ultra čiste vode + 0,5 mL 5x koncentriranog PBS-a) u svaki uzorak, a potom 4  $\mu\text{L}$  SDS-a volumnog udjela 0,5 %. Pločica se zatvori polipropilenskim kapičama te inkubira 10 minuta na 65 °C. U svaki uzorak doda se 2  $\mu\text{L}$  Igepal-a volumnog udjela 4 % uz miješanje pipetom. Potresa se 15 minuta nakon čega se doda 1  $\mu\text{L}$  svježe priređene enzimske otopine (0,12  $\mu\text{L}$  otopine PNG-aze F i 1  $\mu\text{L}$  5x koncentriranog PBS-a za svaki uzorak). Uzorci se resuspendiraju pipetiranjem te se pločica zatvori mikrofolijom nakon čega slijedi inkubacija 3 sata na 37 °C.

#### *3.5.2. Fluorescentno obilježavanje N-glikana*

Uzorci inkubirani PNG-azom F osuše se u uređaju za otparavanje uz centrifugu te se uz miješanje pipetiranjem doda po 2  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode u svaki uzorak. Slobodni N-glikani fluorescentno se obilježavaju APTS-om uz dodatak reducirajućeg agensa PB-a. Priredi se 30  $\text{mmol dm}^{-3}$  otopina APTS-a u otopini citratne kiseline koncentracije 3,6 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Otopina PB-a koncentracije 1,2 mol  $\text{dm}^{-3}$ , priređuje se otapanjem PB-a u DMSO-u. 2  $\mu\text{L}$  svježe priređene otopine APTS-a doda se u jažice, a zatim 2  $\mu\text{L}$  otopine PB-a uz miješanje. Pločica se prekrije folijom te se potresa 10 minuta nakon čega se centrifugira. Slijedi inkubacija 16 sati na 37 °C. Reakcija reduktivne aminacije završava dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  otopine 80 %-tnog ACN-a.

### 3.5.3. Pročišćavanje N-glikana obilježenih APTS-om

*N*-glikani prethodno obilježeni APTS-om, pročišćavaju se metodom HILIC na poliakrilamidnom Bio-gelu P-10. U jažice 0,2 GHP *AcroPrep* filter pločice doda se po 100 µL prethodno priređene suspenzije Bio-gel P-10 u ultra čistoj vodi koncentracije 100 mg mL<sup>-1</sup>. U postupcima uravnotežavanja uvjeta čvrste faze, nanošenja uzorka te eluiranja koristi se vakuum uređaj za pločice pri tlaku koji ne prelazi 50 mm Hg. Otpipetira se 5x po 100 µL ultra čiste vode u svaku jažicu uz primjenu vakuma nakon svakog ispiranja vodom. Čvrstu fazu potrebno je dovesti u stanje ravnoteže ispiranjem 3x po 100 µL otopinom ACN-a volumnog udjela 80 %. Nakon svakog ispiranja otopinom ACN-a primjeni se vakuum. 110 µL svakog uzorka prenese se na pločicu nakon čega se inkubiraju 5 minuta uz potresanje, a potom se primjeni vakuum. Za pročišćavanje APTS-om označenih *N*-glikana koristi se 80 %-tna otopina ACN-a i 80%-tna otopina ACN-a pomiješana s 0,1 %-tnom otopinom TEA titrirana s octenom kiselinom do pH = 8,5. U jažice se odpipetira 5x po 100 µL otopine 80%-tnog ACN i 0,1 %-tne TEA za ispiranje nevezanog APTS-a, a nakon toga 3x po 100 µL 80%-tne otopine ACN-a. Nakon svakog dodatka otopine, uzorci se najprije inkubiraju 2 min na sobnoj temperaturi, a potom se primjeni vakuum. Pločica s uzorcima centrifugira se 5 minuta na 500 rpm te se premjesti na čistu *ABgene PCR* pločicu za skupljanje eluata. U jažice s uzorcima doda se 50 µL ultra čiste vode kako bi čestice Bio-gela nabubrile te se pločica inkubira 5 minuta. Primjeni se vakuum, a zatim se *N*-glikani obilježeni APTS-om eluiraju sa 100 µL ultra čiste vode po uzorku. Pločice se inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi te se eluat uz primjenu uređaja za vakuum uz tlak koji ne prelazi 50 mm Hg sakupi u *ABgene PCR* pločicu. Uzorci se odmah analiziraju ili se pohrane na -20 °C do korištenja.

Osim volumena Bio-gela P-10 od 100 µL i eluiranja sa 100 µL ultra čiste vode, prilikom optimizacije predanalitičkog postupka pročišćavanja *N*-glikana obilježenih APTS-om testiran je i volumen čvrste faze Bio-gela P-10 od 200 µL uz eluiranje 2x po 200 µL ultra čiste vode. Svi ostali koraci postupka pročišćavanja obilježenih *N*-glikana ostaju isti.

### *3.5.4. Analiza N-glikana obilježenih APTS-om metodom CGE-LIF*

Fluorescentno obilježeni *N*-glikani analiziraju se korištenjem *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Uređaj je opremljen s 4 kapilare duge 50 cm, ispunjene polimerom POP-7 (*Applied Biosystems*). Uzorci za injektiranje prirede se miješanjem s 9 µL formamida *HiDi*, 0,02 µL standarda za veličinu DNA *GeneScan-500 Rox* i 1 µL uzorka u novoj *MicroAmp Optical Reaction* pločici. Pločica se centrifugira nakon čega se prekrije septom. Za analizu i relativnu kvantifikaciju više zastupljenih glikana, zbog cijepanja i „rezanja“ maksimuma pikova, uzorci se razrijede 10 x u ultra čistoj vodi, dok za kvantifikaciju manje zastupljenih pikova, uzorke nije potrebno dodatno razrijedjivati. Napon injektiranja je 12 eV u trajanju od 15 s. Vrijeme analize je 2500 s, a napon tijekom analize 15 kV. Temperatura je 60 °C. Prilikom optimizacije mijenjaju se samo napon i vrijeme injektiranja. Fluorescencija se mjeri korištenjem 4 mW ionskog lasera argona s valnom duljinom pobude 488 nm i emisije pri 520 nm.

### *3.5.5. Procesiranje i analiza podataka*

Rezultati analize metodom CGE-LIF procesiraju se u software-skom programu Data Collecton (*Applied Biosystems*). Migracijsko vrijeme *N*-glikana obilježenih APTS-om normalizira se u odnosu na migracijsko vrijeme DNA fragmenata standarda za veličinu *GeneScan-500 Rox*. Glikanski pikovi kvantificiraju se korištenjem aplikacije OpenChrom 1.1.0. (*Lablicate UG*), a dobiveni rezultati obrađuju korištenjem R programske jezika.<sup>44</sup>

## **4. Rezultati i rasprava**

### **4.1. Analiza N-glikozilacije imunoglobulina G metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa**

Metodom LC-MS, glikopeptide je moguće razdvojiti po podklasama IgG-a te analizirati mjesno-specifičnu *N*-glikozilaciju fragmenta Fc. Analizirani su uzorci IgG-a izoliranog iz 250-300 µL seruma miševa soja C57BL/6 divljeg tipa te miševa istog soja kod kojih su uklonjeni geni koji kodiraju Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIB Fc $\gamma$ RIII Fc $\gamma$ IV te  $\gamma$  teški lanac IgG-a. Provedena su dva eksperimenta prema radnim uvjetima metode LC-MS navedenima u *Poglavlju 3.4.3.* U prvome eksperimentu, analizirana je *N*-glikozilacija standardnih uzoraka IgG-a iz seruma koji je prethodno sakupljen iz više uzoraka (eng. *pooled samples*) tj. seruma miševa divljeg tipa te miševa kod kojih su uklonjeni geni za navedene receptore Fc $\gamma$ . Analizom standardnih uzoraka testirana je ponovljivost metode LC-MS koja je prethodno razvijena i optimizirana na uzorcima ljudskog IgG-a. Nakon što se metoda LC-MS pokazala zadovoljavajućom za analizu uzoraka mišjeg IgG-a, u drugom eksperimentu analizirana je *N*-glikozilacija IgG-a izoliranog iz bioloških uzoraka, odnosno seruma jedinki divljeg tipa i jedinki miševa s uklonjenim genima za Fc $\gamma$ R i  $\gamma$  lanac.

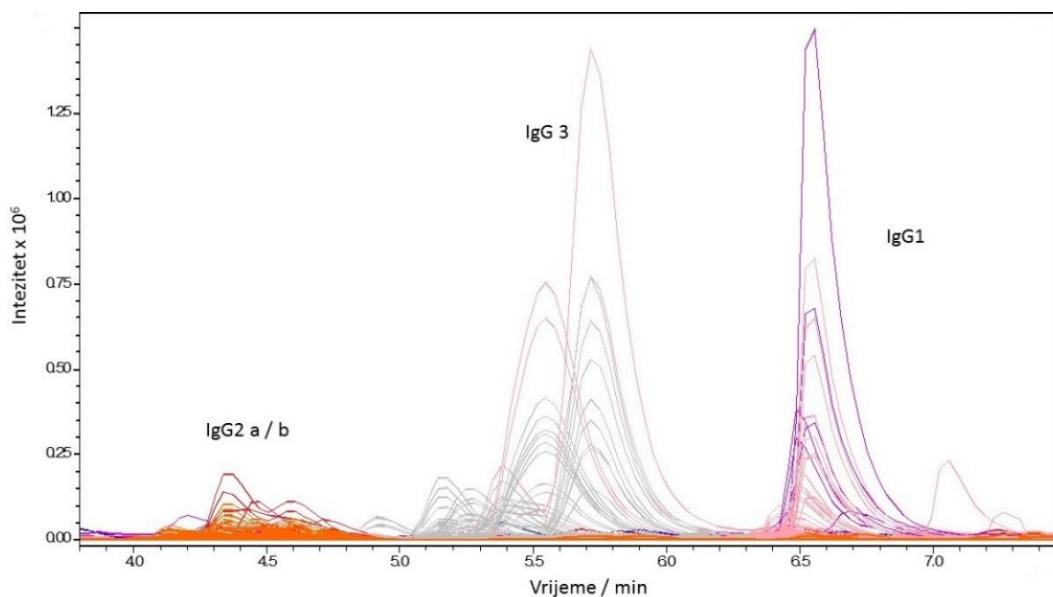
#### *4.1.1. Analiza N-glikozilacije standardnih uzoraka mišjeg imunoglobulina G*

Prethodno je razvijena i optimizirana metoda LC-MS za analizu ljudskog IgG-a čiji su uvjeti mjerena i metodologija pripreme uzorka opisani u *Poglavlju 3.4.3.* Potrebno je ispitati mogu li se uz prihvatljivu ponovljivost, istom metodom analizirati uzorci mišjeg IgG-a koji imaju manju koncentraciju IgG-a u serumu u usporedbi s ljudskim IgG-om te različito vrijeme eluiranja s kromatografske kolone.

Pročišćenim, standardnim uzorcima IgG-a koji su izolirani iz seruma miševa divljeg tipa i miševa s uklonjenim genima za Fc $\gamma$ R i  $\gamma$  lanac mjerena je koncentracija. Prosječna koncentracija svih uzoraka nakon sušenja u uređaju za otparavanje uz centrifugiranje te resuspendiranja u 40 µL otopine amonijeva formijata, iznosila je 0,68 mg mL<sup>-1</sup>.

Uzorci IgG-a razgrađeni su tripsinom, nakon čega slijedi pročišćavanje na čvrstoj fazi C-18 i eluacija glikopeptida prema detaljno opisanoj metodologiji u Poglavlju 3.4. Osušeni uzorci pročišćenih glikopeptida resuspendirani su u 20  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode prije injektiranja i analiziranja metodom LC-MS. Jednom su injektirane po četiri tehničke replike za svaki od uzoraka IgG-a iz seruma miševa divljeg tipa. Također, jednom su injektirane po četiri tehničke replike IgG-a iz miševa kojima su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$ IIB, Fc $\gamma$ III, Fc $\gamma$ IV te  $\gamma$  teški lanac IgG-a te po jedna tehnička replika za IgG izoliran iz seruma miševa s uklonjenim genima za receptor Fc $\gamma$ I. Starost svih miševa je 8 tjedana. Uzorci seruma prije izolacije IgG-a randomizirani su kako bi se izbjegla varijacija koju nosi ista pojedina serija analiziranih uzoraka.

Za svaku od glikoformi, integrirano je 95 % površine izotopa u cjelokupnoj izotopnoj raspodjeli za dvostruko i trostruko nabijene ione korištenjem software-a *LaCy tools*.<sup>10</sup> Izračunati su udjeli površina prema ukupnoj površini za sedam najzastupljenijih glikoformi prema čijim je koeficijentima varijacije (eng. *Coefficient of Variation*, CV) procijenjena ponovljivost metode. Budući da se radi o standardnim uzorcima mišjeg IgG-a, izračunate varijacije su tehničke, odnosno varijacije proizašle iz pripreme uzorka i samog mjerjenja. Teorijske vrijednosti  $m / z$  i strukture za sedam glikoformi H3N4F1, H4N4F1, H5N4F1, H4N4F1G1, H5N4F1G1, H5N4F1G2 i H3N5F1 prikazane u Tablici 2. Različite podklase imaju različitu zastupljenost glikanskih struktura, a eluacijski profil mišjeg IgG-a prikazan je na slici 4.



Slika 4. Kromatogram podklasa mišjeg IgG-a

Tablica 2. Teorijske vrijednosti  $m/z$  glikopeptida fragmenta Fc mišjeg IgG-a koje odgovaraju peptidnim slijedovima EEQINSTFR (mIgG1), EDYNSTLR i EDYNSTIR (mIgG2) i EAQYNSTFR (mIgG3) na koje su vezani  $N$ -glikani: H3N4F1, H4N4F1, H5N4F1, H4N4F1G1, H5N4F1G1, H5N4F1G2 i H3N5F1.

Glikanska struktura	mIgG1 A075B5P4 <sup>a</sup>		mIgG2 A0A0A6YY53 <sup>a</sup> A0A075B5P3 <sup>a</sup>		mIgG3 P03987-2 <sup>a</sup>	
	2+	3+	2+	3+	2+	3+
H3N4F1 	1284,5394	856,6954	1221,4998	814,6689	1280,5263	854,0200
	1285,0410	857,0297	1222,0013	815,0033	1281,0279	854,3543
	1285,5424	857,3640	1222,5027	815,3376	1281,5293	854,6886
	1286,0437	857,6982	1223,0041	815,6718	1282,0306	855,0228
	1286,5451	858,0324	1223,5054	816,0060	1282,5320	855,3571
H4N4F1 	1365,5658	910,7130	1302,5262	868,6865	1361,5527	908,0376
	1366,0674	911,0473	1303,0277	869,0209	1362,0543	908,3719
	1366,5688	911,3816	1303,5292	869,3552	1362,5557	908,7062
	1367,0702	911,7159	1304,0305	869,6894	1363,0571	909,0405
	1367,5715	912,0501	1304,5318	870,0236	1363,5584	909,3747
H5N4F1 	1446,5923	964,7306	1383,5526	922,7041	1442,5792	962,0552
	1447,0938	965,0650	1384,0542	923,0385	1443,0807	962,3895
	1447,5952	965,3992	1384,5556	923,3728	1443,5821	962,7238
	1448,0966	965,7335	1385,0570	923,7070	1444,0835	963,0581
	1448,5979	966,0677	1385,5583	924,0413	1444,5849	963,3923
H4N4F1G1 	1519,1110	1013,0764	1456,0714	971,0500	1515,0979	1010,4010
	1519,6126	1013,4108	1456,5729	971,3844	1515,5995	1010,7354
	1520,1140	1013,7451	1457,0743	971,7186	1516,1009	1011,0697
	1520,6154	1014,0793	1457,5757	972,0529	1516,6023	1011,4039
	1521,1167	1014,4135	1458,0770	972,3871	1517,1036	1011,7382
H5N4F1G1 	1600,1374	1067,0940	1537,0978	1025,0676	1596,1243	1064,4186
	1600,6390	1067,4284	1537,5993	1025,4020	1596,6259	1064,7530
	1601,1404	1067,7627	1538,1008	1025,7363	1597,1273	1065,0873
	1601,6418	1068,0969	1538,6022	1026,0705	1597,6287	1065,4215
	1602,1431	1068,4312	1539,1035	1026,4047	1598,1301	1065,7558
H5N4F1G2 	1753,6826	1169,4575	1690,6429	1127,4310	1749,6695	1166,7821
	1754,1842	1169,7918	1691,1445	1127,7654	1750,1711	1167,1164
	1754,6856	1170,1261	1691,6460	1128,0997	1750,6725	1167,4507
	1755,1870	1170,4604	1692,1473	1128,4340	1751,1739	1167,7850
	1755,6883	1170,7946	1692,6487	1128,7682	1751,6752	1168,1192
H3N5F1 	1756,1897	1171,1289	1693,1500	1129,1024	1752,1766	1168,4535
	1386,0791	924,3885	1323,0395	882,3621	1382,0660	921,7131
	1386,5807	924,7229	1323,5410	882,6964	1382,5676	922,0474
	1387,0821	925,0571	1324,0424	883,0307	1383,0690	922,3817
	1387,5834	925,3914	1324,5438	883,3649	1383,5703	922,7160
	1388,0848	925,7256	1325,0451	883,6992	1384,0717	923,0502

a - polipeptidni slijedovi preuzeti su iz baze podataka UniProt<sup>45</sup>

Pojedina glikoforma ima različit udio normalizirane površine za različite podklase IgG-a pa su izračunate standardne devijacije (eng. *Standard Deviation*, SD) te vrijednosti CV za glikoforme za svaku podklasu IgG1, IgG2 i IgG3 pojedinačno, čije su vrijednosti dane u Tablici 3. Premaščujući GlcNAc ne može se identificirati na podklasama IgG2 i IgG3 izoliranog IgG-a iz divljeg tipa i miševa kojima su uklonjeni geni za Fc $\gamma$ R i  $\gamma$  lanac metodom LC-MS pri korištenim uvjetima. Za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju potrebno je korištenje instrumentne tehnike veće osjetljivosti kao npr. metode CGE-LIF.<sup>4</sup> Iz rezultata prikazanih u Tablici 3. vidljivo je da se uđeli normaliziranih površina glikoformi za različite podklase IgG-a istog uzorka razlikuju, a općenito najmanju varijaciju po svim podklasama i uzorcima imaju dvije najzastupljenije glikoforme H3N4F1 i H4N4F1. Nadalje, najveću varijaciju imaju sijalinizirane glikoforme H4N4F1G1, H5N4F1G1 i H5N4F1G2.

Prilikom razdvajanja na kromatografskoj koloni i ionizacije može doći do gubitka sijalinske kiseline, pa je očekivano je da će varijacija za navedene glikoforme biti veća u usporedbi s ostalim glikoformama za sve podklase IgG-a.<sup>28</sup> Budući da se radi o prvom testiranju *N*-glikozilacije mišjeg IgG-a na metodi koja je optimizirana za analizu *N*-glikozilacije ljudskog IgG-a, vrijednost CV-a za najzastupljeniju strukturu (H3N4F1) podklase IgG1 manja od 3 % uzima se kao zadovoljavajući kriterij za daljnju analizu *N*-glikozilacije IgG-a izoliranog iz divljeg tipa i miševa kojima su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$ IIB, Fc $\gamma$ III, Fc $\gamma$ IV te  $\gamma$  teški lanac. Rezultati pokazuju da je metoda LC-MS ponovljiva te da se *N*-glikozilacija IgG-a izoliranog iz bioloških uzoraka, odnosno iz seruma jedinki divljeg tipa te jedinki miševa s uklonjenim genima za receptore Fc $\gamma$  i  $\gamma$  lanac može dalje analizirati.

Tablica 3. Ponovljivost metode LC-MS testirana na standardnim uzorcima mišjeg IgG-a. Prikazani su udjeli normaliziranih površina, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) za sedam najzastupljenijih glikanskih struktura IgG-a izoliranog iz seruma C57BL/6 miševa divljeg tipa (n = 4) i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju Fc $\gamma$ RI (n = 1), Fc $\gamma$ RIIB (n = 4), Fc $\gamma$ RIII (n = 4), Fc $\gamma$ RIV (n = 4) te  $\gamma$  teški lanac (n = 4) gdje n označava broj tehničkih replika.

Glikanska struktura	Divlji tip (WT)								
	mIgG I			mIgG II			mIgG III		
	Udjio / %	SD / %	CV / %	Udjio / %	SD / %	CV / %	Udjio / %	SD / %	CV / %
H3N4F1	59,18	1,03	1,74	15,55	2,37	15,24	40,58	0,37	0,90
H3N5F1	1,39	0,27	19,34	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	23,25	0,26	1,10	39,13	0,64	1,63	38,49	0,55	1,44
H4N4F1G1	8,66	0,88	10,19	10,04	0,32	3,14	6,24	0,45	7,17
H5N4F1	3,07	0,10	3,16	14,47	0,52	3,60	11,30	0,30	2,62
H5N4F1G1	3,43	0,56	16,41	16,49	1,39	8,41	3,05	0,31	10,23
H5N4F1G2	1,01	0,13	12,46	4,32	0,52	12,06	0,34	0,12	34,96
Fc $\gamma$ RI									
H3N4F1	56,45	-	-	6,66	-	-	43,92	-	-
H3N5F1	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	24,85	-	-	35,59	-	-	38,57	-	-
H4N4F1G1	9,62	-	-	8,98	-	-	4,98	-	-
H5N4F1	3,27	-	-	18,51	-	-	10,02	-	-
H5N4F1G1	4,04	-	-	23,76	-	-	2,28	-	-
H5N4F1G2	1,13	-	-	6,49	-	-	0,22	-	-
Fc $\gamma$ RIIB									
H3N4F1	57,13	1,48	2,59	22,52	3,37	14,96	41,76	1,81	4,33
H3N5F1	1,35	0,08	5,88	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	22,97	0,23	0,99	45,89	0,45	0,97	40,87	0,30	0,73
H4N4F1G1	9,86	0,71	7,21	7,23	0,87	12,08	4,14	0,66	15,88
H5N4F1	3,67	0,21	5,69	14,24	0,38	2,67	10,43	1,10	10,51
H5N4F1G1	3,94	0,39	9,95	8,43	2,75	32,69	2,38	0,37	15,36
H5N4F1G2	1,08	0,16	15,18	1,69	0,24	14,02	0,42	0,09	20,77
Fc $\gamma$ RIII									
H3N4F1	61,40	1,78	2,89	14,81	1,09	7,39	40,24	4,05	10,06
H3N5F1	1,22	0,09	7,50	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	22,04	0,15	0,70	41,79	0,97	2,31	38,65	1,53	3,96
H4N4F1G1	7,24	0,61	8,36	10,54	0,79	7,54	5,91	1,98	33,42
H5N4F1	2,91	0,20	6,80	13,58	0,44	3,22	10,59	2,13	20,09
H5N4F1G1	3,46	0,93	26,80	15,18	0,62	4,09	3,98	1,49	37,29
H5N4F1G2	1,73	0,23	13,22	4,10	0,10	2,38	0,62	0,13	21,37
Fc $\gamma$ RIV									
H3N4F1	59,97	0,61	1,02	15,69	2,59	16,54	40,34	2,45	6,08
H3N5F1	1,21	0,10	8,14	-	-	0,00	-	-	0,00
H4N4F1	21,78	0,34	1,55	39,84	1,89	4,75	36,50	1,22	3,34
H4N4F1G1	9,59	0,27	2,87	10,52	0,82	7,75	7,50	1,72	22,95
H5N4F1	2,81	0,10	3,70	14,46	0,58	4,04	10,91	0,20	1,86
H5N4F1G1	3,41	0,04	1,20	15,25	0,75	4,91	4,19	1,94	46,38
H5N4F1G2	1,23	0,12	9,46	4,25	0,75	17,70	0,55	0,21	38,68
$\gamma$ lanac									
H3N4F1	60,49	0,52	0,86	27,83	3,29	11,84	46,12	1,45	3,14
H3N5F1	1,31	0,08	6,32	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	22,26	0,34	1,52	42,35	0,77	1,81	38,72	1,25	3,22
H4N4F1G1	8,91	0,18	2,05	7,46	0,43	5,81	3,31	0,58	17,41
H5N4F1	2,81	0,08	2,78	12,26	0,86	7,02	9,76	0,85	8,68
H5N4F1G1	3,14	0,14	4,49	8,58	2,55	29,76	1,78	0,41	23,18
H5N4F1G2	1,09	0,08	7,34	1,51	0,35	22,88	0,31	0,12	37,55

#### 4.1.2. Analiza N-glikozilacije bioloških uzoraka mišjeg imunoglobulina G

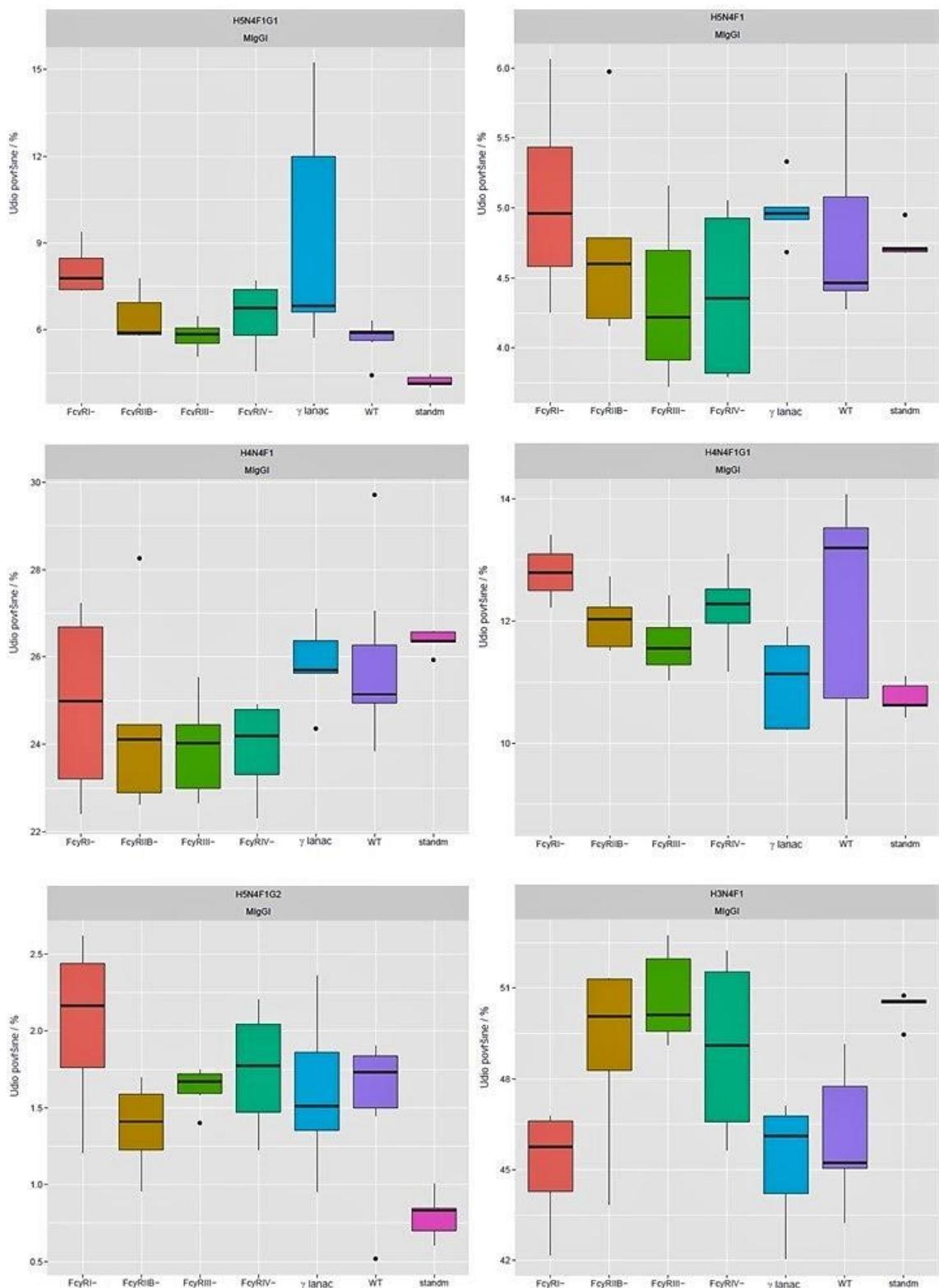
Optimizirana metoda LC-MS za analizu ljudskog IgG-a pokazala se prihvatljivom za daljnju analizu bioloških uzoraka IgG-a izoliranih iz mišjeg seruma divljeg tipa soja C57BL/6 te miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ IV i  $\gamma$  teški lanac. Uzorci seruma prije izolacije IgG-a randomizirani su kako bi se izbjegla varijacija koju nosi ista pojedina serija analiziranih uzoraka. Prosječna koncentracija eluata IgG-a nakon izolacije iznosila je  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ , nakon čega su uzorci ukoncentrirani i resuspendirani svaki u  $45 \mu\text{L}$  amonijeva formijata. Konačna prosječna koncentracija iznosila je  $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ . Za standard se koristio IgG izoliran iz mišjeg seruma soja C57BL/6, čija je mjerena koncentracija iznosila  $0,22 \text{ mg mL}^{-1}$ . Uzorci IgG-a razgrađeni su tripsinom, nakon čega slijedi pročišćavanje i eluacija glikopeptida prema opisanoj metodologiji u Poglavlju 3.4. Osušeni uzorci pročišćenih glikopeptida resuspendirani su u  $20 \mu\text{L}$  ultra čiste vode prije injektiranja. Uspoređeni su medijani normaliziranih udjela površina sedam glikoformi za podklase mišjeg IgG1 (slika 5.), IgG2 (slika 6.) i IgG3 (slika 7.), a raspršenje mjereneh podataka prikazano je *box-plot* dijagramima. Za svaku glikoformu izračunate su vrijednosti SD i CV koje su prikazane u Tablici 5. u Prilogu 6.1. Izračunata varijacija odnosi se na biološku i tehničku varijaciju, a njihove vrijednosti za sedam glikoformi komentirane su za svaki od uzoraka posebno. Iz rezultata analize 5 tehničkih replika standarnog uzorka IgG-a, na temelju izračunatog CV-a (Tablica 5., Prilog 6.1.) procjenjuje se tehnička varijacija svake glikoforme koju nosi postupak pripreme uzoraka i samog mjerjenja. Sijalinizirane glikoforme za sve podklase standardnog uzorka pokazuju najveću tehničku varijaciju što je očekivano s obzirom da prilikom razdvajanja na kromatografskoj koloni i ionizacije može doći do gubitka sijalinske kiseline.

Glikopeptidi IgG-a iz miševa divljeg tipa izolirani su iz seruma 4 jedinke starih 7, 14, 15 i 16 tjedana. Svaki uzorak injektira se jedanput, a analizirane su po dvije tehničke replike za svaku jedinku, osim glikopeptida IgG-a iz seruma jedinke stare 15 tjedana za koji je analizirana jedna tehnička replika. Rezultati pokazuju da glikoforma H3N4F1 podklase IgG1 glikopeptida IgG-a iz seruma miševa divljeg tipa ima varijaciju udjela normalizirane površine na ukupnu površinu  $< 5 \%$ , što je očekivano budući da se radi o najzastupljenijoj strukturi u IgG1 podklasi. Strukture H4N4F1, H5N4F1 i H5N4F1G1 IgG1 podklase istog tipa imaju varijaciju od 5 do 15 %, a H3N5F1, H4N4F1G1 i H5N4F1G1 veću od  $> 15 \%$ . Za podklasu IgG2 glikopeptida IgG-a divljeg tipa, H3N4F1 ima varijaciju  $> 15 \%$ , dok ostale strukture imaju varijaciju od 5 do 15 %.

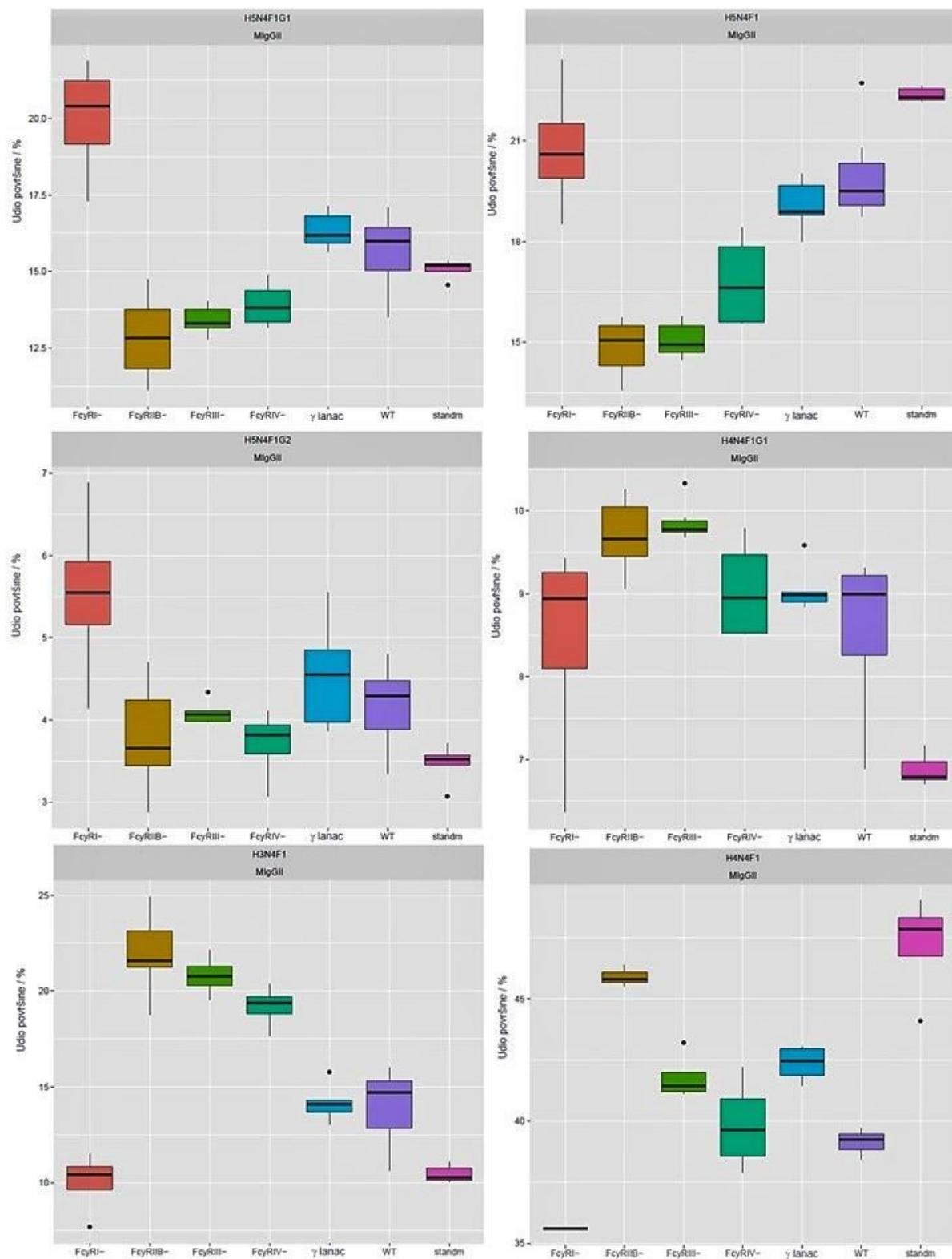
Nadalje, glikoforme H3N4F1, H4N4F1, H5N4F1 podklase IgG3 imaju varijaciju od 5 do 15 %, dok ostale strukture imaju varijaciju > 15 %. Analizirane su 4 tehničke replike uzorka IgG-a iz jedinke miša starosti 9 tjedana kojem su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$ RI. Glikoforme H3N4F1 i H4N4F1G1 podklase IgG1 iz seruma jedinke miša kojem su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$ RI imaju varijaciju < 5 %, H3N4F1, H4N4F1 i H5N4F1G1 od 5 do 15 %, dok H5N4F1 i H5N4F1G2 imaju varijaciju > 15 %. Kod podklase IgG2 iz istog uzorka struktura H4N4F1 ima varijaciju < 5 %, H5N4F1 i H5N4F1G1 od 5 do 15 %, a ostale strukture imaju varijaciju > 15 %. Struktura H5N4F1G1 podklase IgG3 ima varijaciju > 15 %, a sve strukture između 5 i 15 %. Analizirano je 5 tehničkih replika IgG-a izoliranog iz seruma jedinke miša starosti 8 tjedana kojem su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$ RIIB. Glikoforma H4N4F1G1 podklase IgG1 ima varijaciju < 5 %, H3N4F1, H4N4F1 i H5N4F1G1 od 5 do 15 %, a H3N5F1, H5N4F1 i H5N4F1G1 varijaciju > 15 %. Strukture H4N4F1 i H4N4F1G1 podklase IgG2 imaju varijaciju < 5 %, H3N4F1, H5N4F1 i H5N4F1G1 od 5 do 15 %, a H5N4F1G2 > 15 %. Nadalje, H4N4F1 ima varijaciju > 5 %, H3N4F1, H4N4F1G1 i H5N4F1 od 5 do 15 %, a ostale strukture podklase IgG3 > 15 %. Izračunati su udjeli normaliziranih površina glikoformi za 6 replika mišjeg IgG-a iz seruma jedinke miša starosti 10 tjedana kojem su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$ RIII. Strukture H3N4F1, H4N4F1 i H4N4F1G1 IgG1 podklase IgG-a imaju varijaciju < 5 %, H3N4F1 ima varijaciju > 15 %, a ostale strukture od 5 do 15 %. Nadalje, sve strukture podklase IgG2 imaju varijaciju < 5 %, dok za podklasu IgG3 glikoforme H3N4F1 i H4N4F1 imaju varijaciju < 5%, a sve ostale glikoforme imaju varijaciju udjela normalizirane površine od 5 do 15 %. Analizirane su po dvije tehničke replike za IgG izoliran iz seruma 2 jedinke miša starosti 8 i 14 tjedana kojima su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$ RIV. Glikoforme H3N4F1, H4N4F1 i H4N4F1G1 podklase IgG1 imaju varijaciju od 5 do 15 %, a strukture H3N4F1, H5N4F1, H5N4F1G1 i H5N4F1G2 > 15 %. Kod IgG2 podklase IgG-a iz seruma miševa kojima su uklonjeni geni za Fc $\gamma$ RIV, struktura H4N4F1 ima varijaciju < 5 %, a ostale strukture od 5 do 15 %. Glikoforme H3N4F1, H4N4F1 i H5N4F1 podklase IgG3 imaju varijaciju < 5 %, dok sijalinizirane glikoforme imaju varijaciju > 15 %. Analizirane su glikoforme iz 5 replika IgG-a iz seruma miševa starosti 7 tjedana kojima su uklonjeni geni za  $\gamma$  lanac prema čijim rezultatima, H3N4F1, H4N4F1 i H5N4F podklase IgG1 imaju varijaciju < 5 %, H3N5F1 i H4N4F1G1 od 5 do 15 %, a H5N4F1G1 i H5N4F1G1 > 15 %. Kod podklase IgG2, H4N4F1 ima varijaciju < 5 %, a ostale strukture od 5-15 %. Rezultati zastupljenosti glikoformi po podklasama na slici 5., slici 6. i slici 7. pokazuju da pojedina glikoforma ima različite medijane udjela normalizirane površine za različite podklase IgG-a unutar istog uzorka te za iste podklase različitih uzoraka.

Za izračunate medijane udjela normaliziranih površina glikoformi potrebno je ispitati postoje li razlike *N*-glikozilacije između miševa s uklonjenim genima koji kodiraju receptore Fc $\gamma$  i  $\gamma$  lanac u odnosu na divlji tip. Značajnost razlika između udjela površina glikoformi normaliziranih na ukupnu površinu između istih podklasa IgG-a izoliranih iz seruma divljeg tipa i svakog od miševa kojima su uklonjeni geni koji kodiraju za Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ RIV te  $\gamma$  lanac ispitana je Mann-Whitney U testom. Uzima se da je vrijednost statistički značajna za  $p < 0,05$ , a promatrane  $p$  vrijednosti korigirane su FDR korekcijom. Korigirane  $p$  vrijednosti prikazane u Tablici 4. pokazuju da se udio normalizirane površine strukture H5N4F1G1 kod podklasa IgG1 i IgG2 iz seruma jedinke kojima su uklonjeni geni za Fc $\gamma$ RI značajno razlikuje od udjela normalizirane površine iste glikoforme divljeg tipa. Također, značajna razlika udjela normaliziranih površina uočena je kod sljedećih glikoformi: H3N4F1 podklase IgG2 glikopeptida jedinke miša s uklonjenim genima za Fc $\gamma$ RIIB, H3N4F1 iz podklase IgG1 te strukture H3N4F1, H4N4F1G1, H5N4F1 i H5N4F1G1 iz podklase IgG2 iz seruma jedinke miša kojem su uklonjeni geni za Fc $\gamma$ RIII, H3N4F1 i H5N4F1 podklase IgG2 glikopeptida iz miševa kojima su uklonjeni geni koji kodiraju za Fc $\gamma$ RIV te H4N4F1 iz podklase IgG2 iz seruma jedinke miša kojem su uklonjeni geni za  $\gamma$  lanac teškog fragmenta Fc.

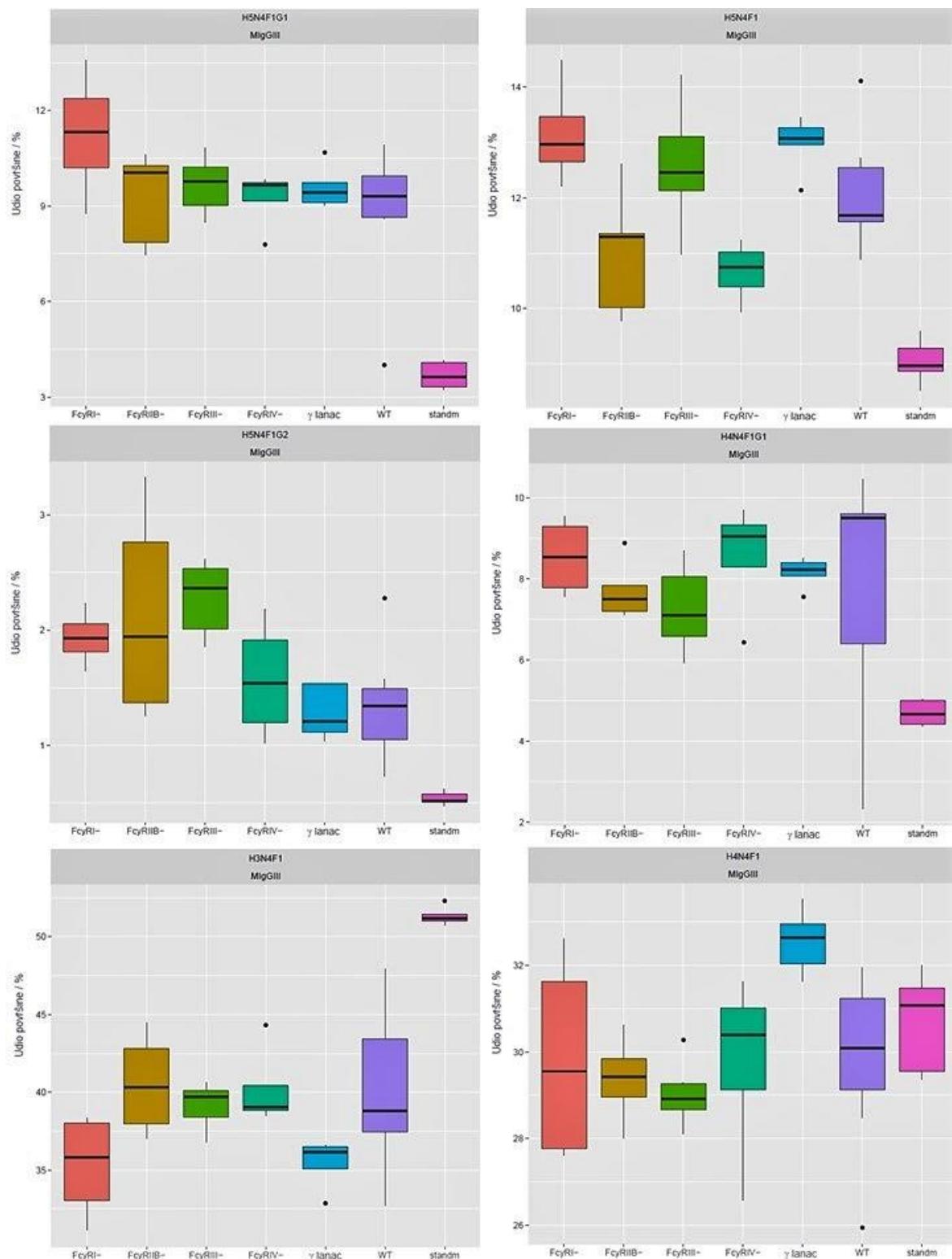
Kao i u prethodnom eksperimentu, premoščujući GlcNAc ne može se identificirati na podklasama IgG2 i IgG3 izoliranog IgG-a iz divljeg tipa i miševa kojima su uklonjeni geni za receptore Fc $\gamma$  i  $\gamma$  lanac pri uvjetima analize koji su navedeni u *Poglavlju 3.4.3*. Budući da testirani uzorci IgG-a nisu izolirani iz seruma jedinki iste starosti, iz ovoga eksperimenta ne može se zaključiti radi li se o statistički značajnoj razlici udjela površina glikoformi proizašloj iz inaktivacije gena za navedene receptore ili je različita zastupljenost struktura u odnosu na divlji tip posljedica različite starosti jedinki. Također, testiranje bi se trebalo provesti na većem broju uzoraka.



Slika 5. Usporedba medijana za udjele normaliziranih površina glikoformi podklase IgG1 izolirane iz seruma C57BL/6 miševa divljeg tipa ( $n = 7$ ) i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju Fc $\gamma$ RI ( $n = 4$ ), Fc $\gamma$ RIIB ( $n = 5$ ), Fc $\gamma$ RIII ( $n = 6$ ), Fc $\gamma$ RIV ( $n = 4$ ) te  $\gamma$  teški lanac ( $n = 5$ ) analiziranih metodom LC-MS gdje je  $n$  broj tehničkih replika. Standardni uzorak IgG-a izoliran je iz soja C57BL/6 ( $n = 5$ ). Box-plot prikazuje vrijednosti od prvog do trećeg kvartila.



Slika 6. Usporedba medijana za udjele normaliziranih površina glikoformi podklase IgG2 izolirane iz seruma C57BL/6 miševa divlјeg tipa ( $n = 7$ ) i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju Fc $\gamma$ RI ( $n = 4$ ), Fc $\gamma$ RIIB ( $n = 5$ ), Fc $\gamma$ RIII ( $n = 6$ ), Fc $\gamma$ RIV ( $n = 4$ ) te  $\gamma$  teški lanac ( $n = 5$ ) analiziranih metodom LC-MS gdje je n broj tehničkih replika. Standardni uzorak IgG-a izoliran je iz soja C57BL/6 ( $n = 5$ ). Box-plot prikazuje podatke od prvog do trećeg kvartila.



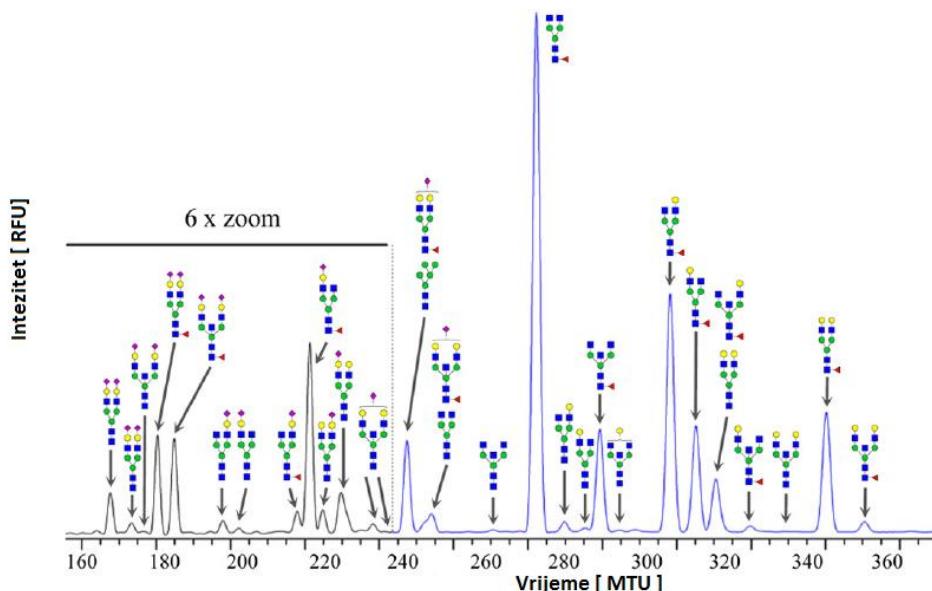
Slika 7. Usporedba medijana za udjele normaliziranih površina glikoformi podklase IgG3 izolirane iz seruma C57BL/6 miševa divlјeg tipa ( $n = 7$ ) i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju  $Fc\gamma RI$  ( $n = 4$ ),  $Fc\gamma RIIB$  ( $n = 5$ ),  $Fc\gamma RIII$  ( $n = 6$ ),  $Fc\gamma RIV$  ( $n = 4$ ) te  $\gamma$  teški lanac ( $n = 5$ ) analiziranih metodom LC-MS gdje je  $n$  broj tehničkih replika. Standardni uzorak IgG-a izoliran je iz soja C57BL/6 ( $n = 5$ ). Box-plot prikazuje podatke od prvog do trećeg kvartila.

Tablica 4. Korigirane vrijednosti vjerojatnosti ( $p$ ) dobivene usporedbom medijana udjela normaliziranih površina Mann-Whitneyevim U testom za glikoforme IgG-a izoliranog iz seruma miševa divljeg tipa sa svakim od uzoraka IgG-a miševa s uklonjenim genima koji kodiraju Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ RIV te  $\gamma$  teški lanac.  $p$  vrijednosti su korigirane FDR korekcijom, a statistički značajnom smatra se vrijednost  $< 0,05$ .

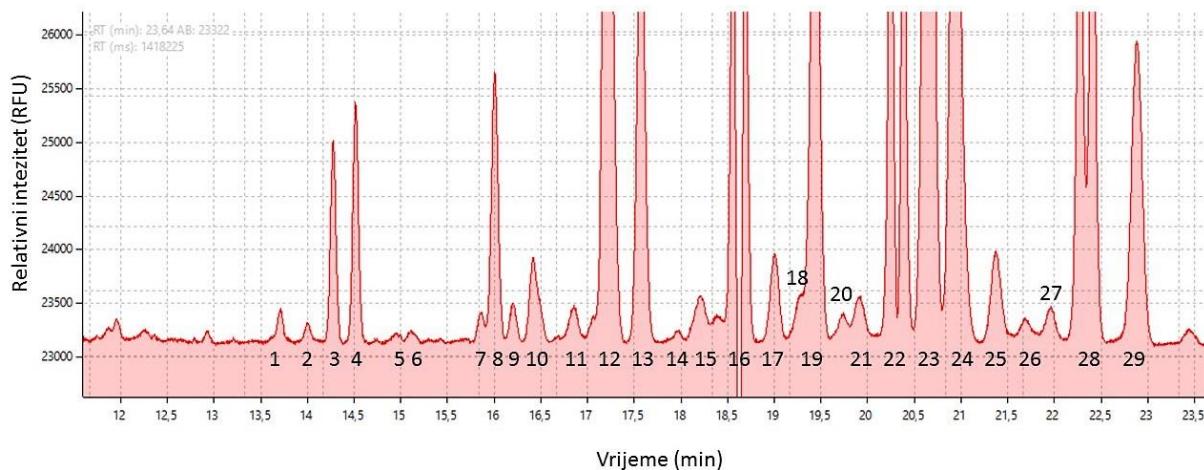
Glikan	mIgG I	mIgG II	mIgG III
	Fc $\gamma$ RI		
H3N4F1	0,8325	0,1279	0,5176
H3N5F1	0,5758	/	/
H4N4F1	0,8325	0,2906	1,0000
H4N4F1G1	0,9018	0,9680	0,9018
H5N4F1	0,8325	0,7683	0,3455
H5N4F1G1	0,0480	0,0480	0,3455
H5N4F1G2	0,4201	0,3455	0,2906
Fc $\gamma$ RIIB			
H3N4F1	0,4163	0,0400	0,9353
H3N5F1	0,4163	/	/
H4N4F1	0,4163	0,9018	0,6725
H4N4F1G1	0,6042	0,1120	0,5298
H5N4F1	0,9353	0,0400	0,3455
H5N4F1G1	0,6725	0,1120	0,9353
H5N4F1G2	0,4921	0,6725	0,4921
Fc $\gamma$ RIII			
H3N4F1	0,0400	0,0369	0,9018
H3N5F1	0,5176	/	/
H4N4F1	0,2906	0,7683	0,5603
H4N4F1G1	0,5603	0,0369	0,5176
H5N4F1	0,4163	0,0369	0,6321
H5N4F1G1	0,9760	0,0480	0,8325
H5N4F1G2	0,8325	0,6822	0,0596
Fc $\gamma$ RIV			
H3N4F1	0,3455	0,0480	0,8325
H3N5F1	0,4201	/	/
H4N4F1	0,1279	0,9680	1,0000
H4N4F1G1	0,6725	0,5758	0,9018
H5N4F1	0,7683	0,0480	0,1279
H5N4F1G1	0,5176	0,2015	1,0000
H5N4F1G2	0,8325	0,4201	0,9018
$\gamma$ lanac			
H3N4F1	0,9018	0,8325	0,2171
H3N5F1	0,5298	/	/
H4N4F1	0,7683	0,9353	0,0480
H4N4F1G1	0,5298	0,9018	0,5298
H5N4F1	0,5298	0,6042	0,3455
H5N4F1G1	0,1515	0,6725	0,9018
H5N4F1G2	0,9353	0,6725	0,9353

## 4.2. Analiza N-glikozilacije imunoglobulina G metodom kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranoj fluorescencijom

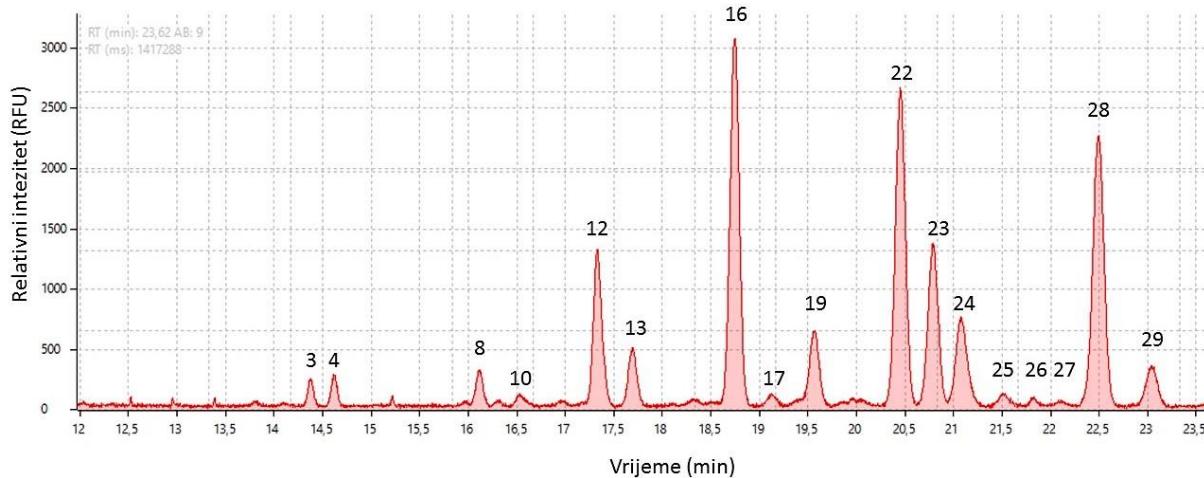
Metodom CGE-LIF analiziraju se slobodni glikani Fab i Fc dijela IgG-a što može dati uvid u strukturu glikana, međutim gubi se informacija mjesno-specifične N-glikozilacije fragmenata. Na slici 8. prikazan je reprezentativan elektroforegram N-glikozilacije ljudskog IgG-a čijim su pikovima pridružene glikanske strukture. Kao što je detaljno opisano u Poglavlju 3.5., priprema uzorka za analizu metodom CGE-LIF sastoji se od odcjepljivanja N-glikana korištenjem PNG-aze F, obilježavanja glikana APTS-om uz reducirajući agens 2-pikolin boran te čišćenja obilježenih N-glikana metodom HILIC. U sljedećim eksperimentima djelomično su optimizirani koraci pročišćavanja N-glikana obilježenih APTS-om na nepokretnoj fazi Biogel P-10 te vrijeme i napon elektrokinetičkog injektiranja uzorka za što su se koristili standardni uzorci IgG-a izoliranog iz ljudske plazme. Cilj je optimizirati metodu, a potom analizirati N-glikozilaciju IgG-a iz seruma miševa divljeg tipa i miševa kojima su uklonjeni geni koji kodiraju Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIB Fc $\gamma$ RIII Fc $\gamma$ IV i  $\gamma$  teški lanac te usporediti dobivene profile N-glikozilacije obje metode. Direktnim injektiranjem uzorka bez prethodnog razrijedjenja signali najzastupljenijih glikanskih struktura su previški zbog čega dolazi do cijepanja i „rezanja“ maksimuma pikova (slika 9.). Razrijedenjem uzorka, gubi se na osjetljivosti metode zbog čega se manje zastupljene strukture ne mogu identificirati (slika 10.).



Slika 8. Reprezentativan elektroforegram N-glikozilacije ljudskog IgG-a korištenjem metode CGE-LIF.<sup>4</sup>



Slika 9. Elektroforegram obilježenih *N*-glikana iz standardnog uzorka ljudskog IgG-a. 1  $\mu$ L eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om pomiješano je s 9  $\mu$ L HiDi formamida i 0,02  $\mu$ L standarda *Gene scan 500 Rox* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, a napon injektiranja 12 kV. 3130 *Genetic Analyzer* je opremljen s 4 kapilare duge 50 cm, ispunjene polimerom POP-7.



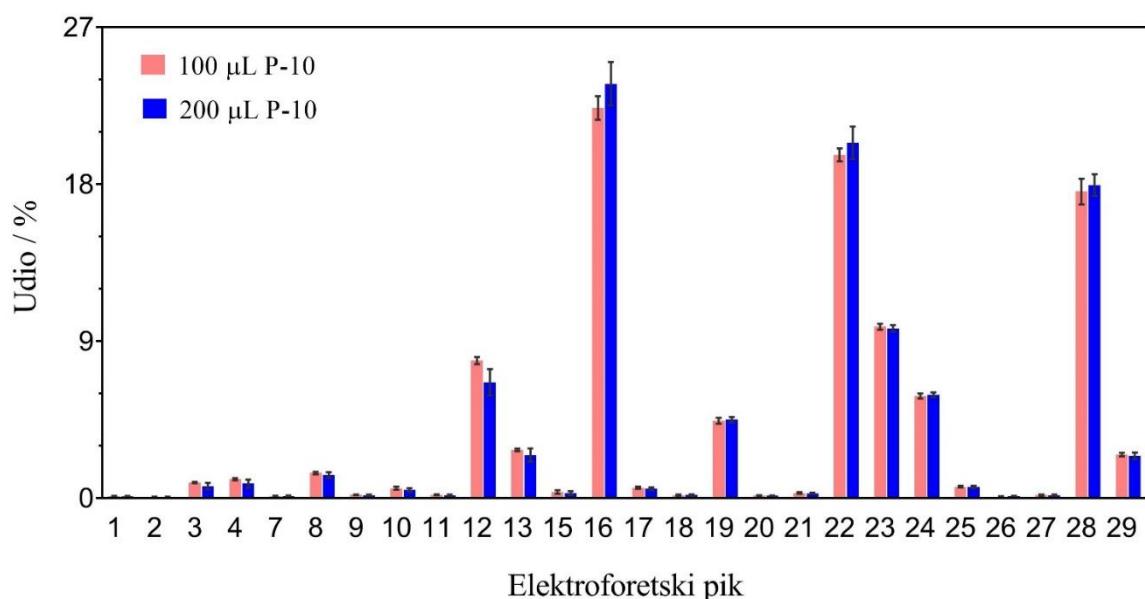
Slika 10. Elektroforegram obilježenih *N*-glikana iz standardnog uzorka ljudskog IgG-a. 1  $\mu$ L eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om prethodno razrijeđenog u vodi 10x, pomiješan je s 9  $\mu$ L HiDi formamida i 0,02  $\mu$ L standarda *Gene scan 500 Rox* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, a napon injektiranja 12 kV. 3130 *Genetic Analyzer* je opremljen s 4 kapilare duge 50 cm, ispunjene polimerom POP-7.

#### 4.2.1. Optimizacija pročišćavanja metodom HILIC

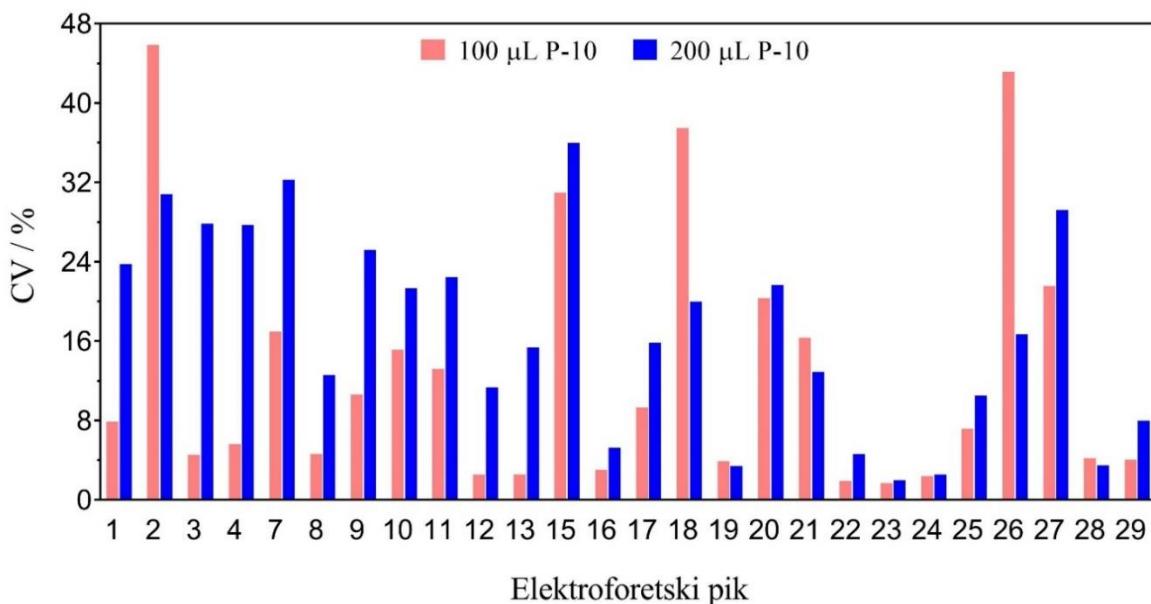
Metoda HILIC na poliakrilamidnoj nepokretnoj fazi Bio-gel P-10 omogućava pročišćavanje glikana obilježenih APTS-om, a u ovome radu testirani su različiti volumeni nepokretne i pokretne faze kako bi se pronašli optimalni uvjeti eluiranja obilježenih *N*-glikana. Uzorci su *N*-glikani iz alikvota od 20 µL standardnog uzorka IgG-a iz ljudske plazme koncentracije 0,60 mg mL<sup>-1</sup>. Testirano je 8 tehničkih replika eluiranih s 100 µL ultra čiste vode za 100 µL faze Bio-gel P-10 te 6 tehničkih replika eluiranih s 2x po 200 µL za volumen od 200 µL nepokretne faze Bio-gel P-10. Uzorci su prije koraka pročišćavanja sakupljeni te nakon toga alikvotirani po 100 µL u jažice kako bi se otklonila varijacija koju nose postupci odcjepljivanja i obilježavanja *N*-glikana.

Kao što je spomenuto ranije, direktnim injektiranjem uzorka bez prethodnog razrijedjenja signali najzastupljenijih glikanskih struktura su previški, što prelazi detekcijske granice metode, a razrijedenjem uzorka gubi se na osjetljivosti. Kako bi se istovremeno mogli kvantificirati pikovi manje i više zastupljenih glicoformi u uzorcima, svaki uzorak je injektiran dvaput. Kod 1. injektiranja, 1 µL eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om pomiješano je s 9 µL HiDi formamida i 0,02 µL standarda *Gene scan 500 Rox*. Za 2. injektiranje 1 µL eluata obilježenih *N*-glikana (10x razjeđenog u ultra čistoj vodi) pomiješano je s 9 µL HiDi formamida i 0,02 µL standarda *Gene scan 500 Rox*. Iz elektroforegrama 1. injektiranja, određuju se pikovi manje zastupljenih glicoformi, a iz elektroforegrama 2. injektiranja istog uzorka, određuju se najzastupljenije glicoforme uzorku. Pik koji se nalazi u elektroforegramu 1. injektiranja i 2. injektiranja koristi se kao referentni pik. Referentni pik odabire se prema omjeru površina istih pikova za elektroforegrame 1. i 2. injektiranja tako da dobivena vrijednost bude približno 1, također bitno je da je odabrani pik simetričan i razdvojen od ostalih pikova. Na slikama 9. i 10., brojevima su označeni kvantificirani pikovi iz elektroforegrama, a zadnji pik (broj 29) odabran je kao referentni pik. Pikovi elektroforegrama za 1. i 2. injektiranje normaliziraju se najprije u odnosu na referentni pik, a zatim se nove dobivene vrijednosti pikova normaliziraju u odnosu na ukupnu površinu svih pikova u elektroforegramu. Integrira se površina pikova korištenjem software-a OpenChrom 1.1.0. Za pikove prisutne u oba elektroforegrama uzima se srednja vrijednost dobivenog omjera pikova (1. i 2. injektiranje) i referentnog pika. Na slici 11. uspoređeni su udjeli normaliziranih površina 26 pikova za dva različita uvjeta eluiranja. Kod *N*-glikana eluiranih s 100 µL ultra čiste vode za volumen od 100 µL faze Biogel P-10, 11 struktura ima varijaciju < 5 %, 6 struktura ima od 5 do 15 %, a ostatak preko 15 %.

Tri strukture imaju vrijednost CV-a veću od 30 %, no kako se radi o strukturama male zastupljenosti (označenim 2 i 16), čiji udio u ukupnoj površini ne prelazi 0,1 % veliki CV je očekivan za te strukture. Također, na elektroforegramu (slika 9.) vidljivo je da je pik 18 „rame“ pika velikog intenziteta, pa je varijacija  $> 30 \%$  također očekivana. Za N-glikane obilježene APTS-om eluirane u volumenu od  $2 \times 200 \mu\text{L}$  ultra čiste vode na  $200 \mu\text{L}$  nepokretne faze Bio-gel P-10, 5 struktura ima varijaciju normaliziranih udjela površine  $< 5 \%$ , 9 struktura od 5 do 15 %, a 12 struktura  $> 15 \%$  od kojih tri glikanske strukture imaju varijaciju  $> 30 \%$ . Radi se o glikanskim strukturama male zastupljenosti, za koju je očekivana veća varijacija u površinama pikova. Općenito, glikani veće zastupljenosti pokazuju manju varijaciju udjela normalizirane površine od oko 5 %. Na slici 12. uspoređeni su koeficijenti varijacije udjela normaliziranih površina za oba uvjeta pročišćavanja N-glikana obilježenih APTS-om. Rezultati pokazuju da je prosječna varijacija udjela normalizirane površine pikova za volumen nepokretne faze gela P-10 od  $100 \mu\text{L}$  koja iznosi 13 %, manja u odnosu prosječnu varijaciju udjela normalizirane površine pikova za volumen nepokretne faze od  $200 \mu\text{L}$  koja iznosi 17 %.



Slika 11. Usporedba udjela normaliziranih površina pikova N-glikana iz IgG-a standardnog uzorka ljudske plazme nakon pročišćavanja na  $100 \mu\text{L}$  ( $n = 8$ ) i  $200 \mu\text{L}$  ( $n = 6$ ) faze Bio-gel P-10, analiziranih metodom CGE-LIF.  $1 \mu\text{L}$  eluata N-glikana obilježenih APTS-om je pomiješano s  $9 \mu\text{L}$  HiDi formamida i  $0,02 \mu\text{L}$  standarda *Gene scan 500 Rox* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, a napon injektiranja 12 kV. Broj analiziranih tehničkih replika označen je  $n$ .



Slika 12. Usporedba varijacije udjela normaliziranih površina *N*-glikana iz IgG-a standardnog uzorka ljudske plazme nakon pročišćavanja na 100  $\mu\text{L}$  ( $n = 8$ ) i 200  $\mu\text{L}$  ( $n = 6$ ) faze Bio-gel P-10, analiziranih metodom CGE-LIF. 1  $\mu\text{L}$  eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om pomiješano je s 9  $\mu\text{L}$  HiDi formamida i 0,02  $\mu\text{L}$  standarda *Gene scan 500 Rox* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, a napon injektiranja 12 kV. Broj analiziranih tehničkih replika označen je  $n$ .

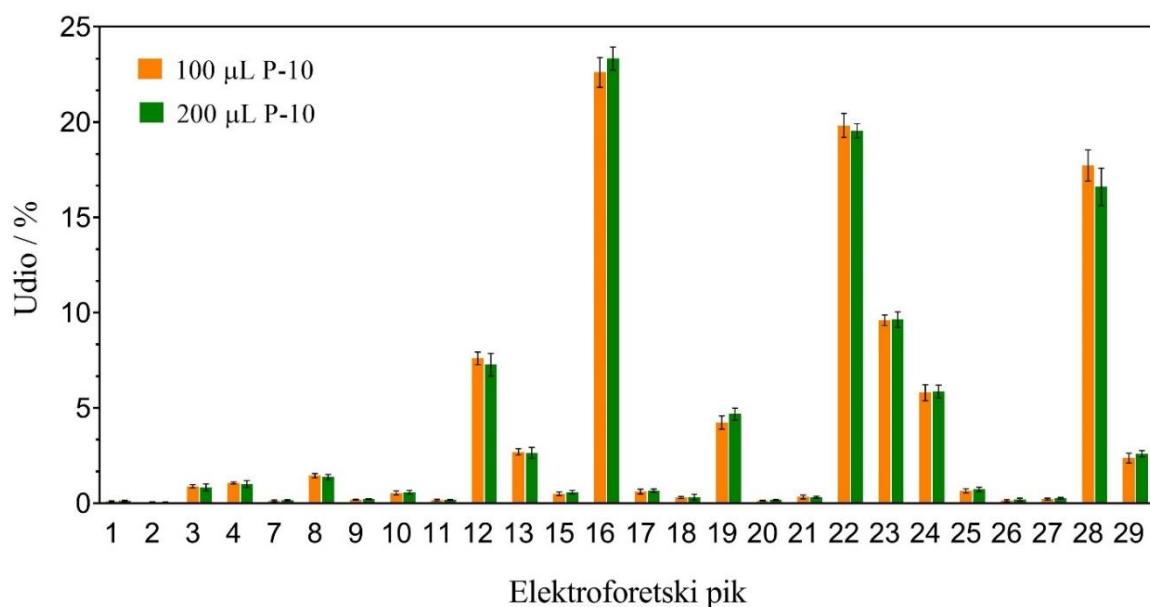
U sljedećem eksperimentu analizirano je 28 tehničkih replika pročišćenih, obilježenih *N*-glikana iz IgG-a izoliranog iz standardnog uzorka ljudske plazme, koji se koristio i u prethodnom eksperimentu. Prilikom pročišćavanja, 14 tehničkih replika *N*-glikana obilježenih APTS-om eluirani su s 100  $\mu\text{L}$  vode uz korištenje 100  $\mu\text{L}$  faze Bio-gel P-10 te 14 tehničkih replika koji su eluirani s 2x po 200  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode na 200  $\mu\text{L}$  nepokretnoj fazi Bio-gel P-10. Analogno prethodnom eksperimentu, izračunata je varijacija udjela normalizirane površine glikana, a promijenjen je napon i vrijeme injektiranja umjesto razrijeđenja uzoraka prije injektiranja. Testirani su uvjeti injektiranja: 8 sekundi i 6 kV, 6 sekundi i 6 kV, 4 sekunde i 6 kV, 8 sekundi i 5 kV. Uzorci su prije koraka pročišćavanja sakupljeni te nakon toga alikvotirani u volumenu od 100  $\mu\text{L}$  u jažice. Za analizu i relativnu kvantifikaciju manje zastupljenih glikana koristio se napon injektiranja od 12 kV i vrijeme injektiranja od 15 sekundi (1. injektiranje). To su isti uvjeti injektiranja korišteni u prethodnom eksperimentu. Za kvantificiranje glicoformi jačeg intenziteta vrijeme injektiranja smanjeno je na 4 sekunde, a napon injektiranja na 6 kV (2. injektiranje).

Pikovi elektroforegrama iz 1. i 2. injektiranja normaliziraju se najprije u odnosu na referentni pik, a zatim se dobivene vrijednosti površina pikova normaliziraju u odnosu na ukupnu površinu svih pikova u elektroforegramu kao što je opisano u prethodnom eksperimentu. Odabrani referentni pik je zadnji pik (broj 29).

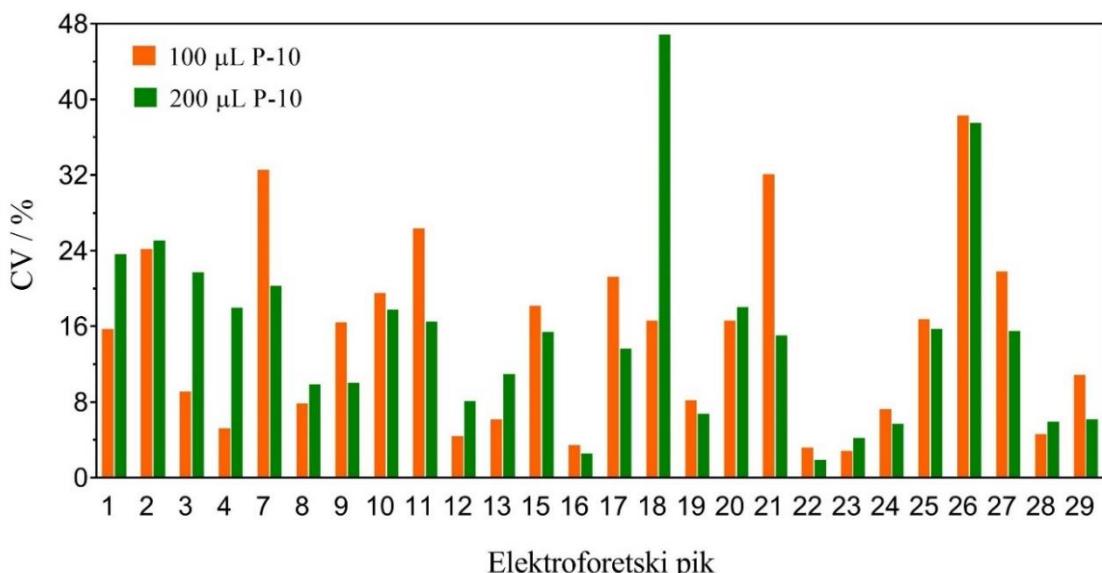
Na slici 13. uspoređeni su udjeli normaliziranih površina 26 pikova za dva različita uvjeta eluiranja metodom HILIC na volumenu nepokretne faze Bio-gel P-10 od 100 i 200  $\mu\text{L}$  za spomenute uvjete injektiranja. 5 glikanskih struktura koje su ujedno i najzastupljenije strukture kod eluiranja na 100  $\mu\text{L}$  Biogel P-10 faze imaju varijaciju < 5 %, 7 glikanskih struktura ima varijaciju udjela normalizirane površine glikana od 5 do 15 %, a 14 struktura > 15 % od kojih 3 strukture (na slici 9. označene brojevima 7, 21 i 26) imaju varijaciju > 30 %. Budući da su to pikovi slabijeg relativnog intenziteta, veća varijacija udjela normalizirane površine je očekivana. Za eluiranje *N*-glikana obilježenih APTS-om na 200  $\mu\text{L}$  faze Bio-gel P-10, strukture označene brojevima 16, 22 i 23 imaju varijaciju udjela normalizirane površine < 5 %. To su ujedno i najzastupljenije strukture, pa kod njih očekujemo najmanju varijaciju. 9 glikoformi ima varijaciju od 5 do 15 %, a 14 struktura preko 15 %, od čega 2 strukture (18 i 26) imaju varijaciju udjela površine > 30 %. Kao što je već spomenuto pik 18 je „rame“ pika velikog intenziteta, a 26 je pik malog relativnog intenziteta. Na slici 14. uspoređeni su koeficijenti varijacije za oba uvjeta pročišćavanja obilježenih *N*-glikana. Rezultati pokazuju da je prosječna varijacija udjela normalizirane površine pikova za volumen gela P-10 od 100  $\mu\text{L}$  koja iznosi 14,98 % nešto manja u odnosu na prosječnu varijaciju udjela normalizirane površine pikova za volumen nepokretne faze od 200  $\mu\text{L}$  koja iznosi 15,11 %. Iako rezultati prijašnjeg eksperimenta pokazuju da je varijacija manja za eluiranje na 100  $\mu\text{L}$  Bio-gela P-10, ovim eksperimentom pokazano je da zapravo nema velike razlike između eluacije obilježenih *N*-glikana na nepokretnoj fazi volumena 100 i 200  $\mu\text{L}$ .

Također, kako bi se ispitao utjecaj načina integriranja na varijaciju udjela normaliziranih površina pikova, umjesto integriranja površine pikova, integrirana je površina pikova ekstrapolirana iz maksimalne visine pika u istome software-u. Evaluirani su rezultati iz prijašnjeg eksperimenta te su ponovno integrirani pikovi za 14 tehničkih replika *N*-glikana ljudskog IgG-a eluiranih na 100  $\mu\text{L}$  Biogela P-10. Na slici 15. uspoređene su vrijednosti CV udjela normaliziranih površina 26 pikova za koje je integrirana površina te visina pika. Integriranjem površine preko maksimalne visine pika, 10 glikana ima varijaciju > 5 %, 12 struktura od 5 do 15 %, a 4 strukture > 15 %.

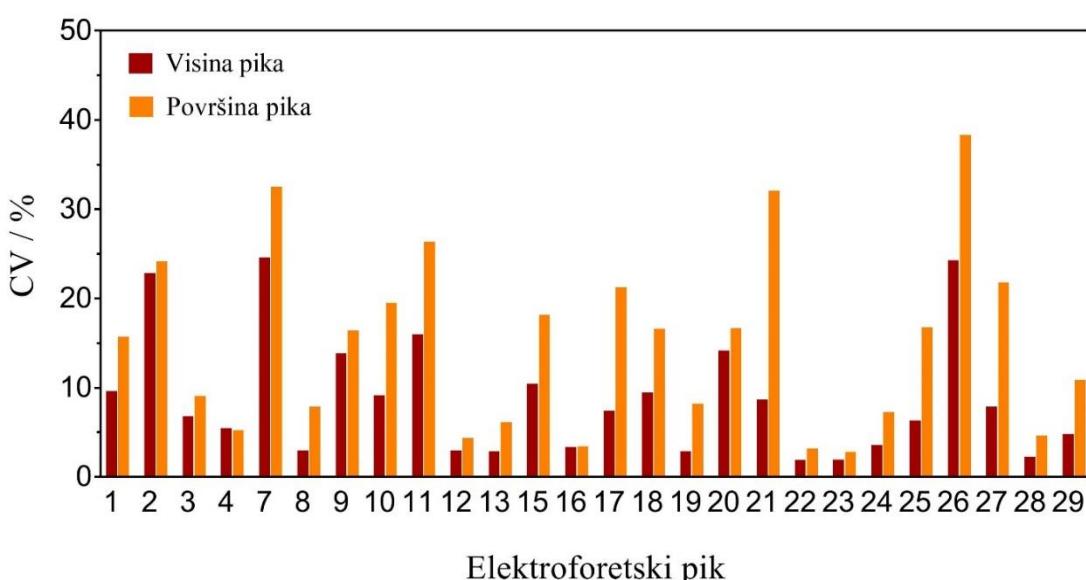
Ukupna prosječna varijacija udjela normalizirane površine pikova je 8,71 % što je manje od prosječne varijacije udjela istih pikova *N*-glikana integriranih preko površine pika koja iznosi 14,98 %. Iz toga proizlazi da način integriranja bitno utječe na varijaciju mjerjenih podataka. Budući da korištenje OpenChrom-a zahtijeva mjerjenje svakog uzorka po 2 puta zbog nemogućnosti mjerjenja relativnog intenziteta fluorescencije više i manje zastupljenih *N*-glikana odjednom, mjerjenje većeg broja uzoraka zahtijeva puno vremena, zbog čega se ograničava visokoprotočnost metode. Usporedbom varijacije udjela normaliziranih površina *N*-glikana iz IgG-a ljudske plazme integriranjem površine pika i visine pika, pokazano je da način integriranja uvelike mijenja varijaciju udjela normaliziranih glikanskih površina, zbog čega se ne može ispitati ponovljivost metode za različite uvjete eluiranja te injektiranja uzorka. Analiza metodom CGE-LIF zahtijeva korištenje drugačijeg pristupa u obradi podataka te ponovnu analizu različitih uvjeta pročišćavanja i injektiranja *N*-glikana obilježenih APTS-om kako bi daljnja optimizacija bila moguća. Budući da metoda CGE-LIF nije optimizirana analizom obilježenih *N*-glikana iz standardnih uzoraka ljudskog IgG-a, *N*-glikozilacija mišjeg IgG-a izoliranog iz divljeg tipa i miševa s uklonjenim genima za Fc $\gamma$ R i  $\gamma$  lanac nije analizirana.



Slika 13. Usporedba udjela normaliziranih površina *N*-glikana iz IgG-a ljudske plazme nakon pročišćavanja na 100  $\mu$ L ( $n = 14$ ) i 200  $\mu$ L ( $n = 14$ ) faze Bio-gel P-10, analiziranih metodom CGE-LIF. 1  $\mu$ L eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om pomiješano je s 9  $\mu$ L HiDi formamida i 0,02  $\mu$ L standarda *Gene scan 500 Rox* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, napon injektiranja 12 kV (1. injektiranje) te 4 s i 6 kV (2. injektiranje). Broj analiziranih tehničkih replika označen je  $n$ .



Slika 14. Usporedba varijacije udjela normaliziranih površina *N*-glikana iz IgG-a ljudske plazme nakon pročišćavanja na 100 μL (n = 14) i 200 μL (n = 14) faze Bio-gel P-10, analiziranih metodom CGE-LIF. 1 μL eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om pomiješano je s 9 μL HiDi formamida i 0,02 μL *Gene scan 500 Rox standarda* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, napon injektiranja 12 kV (1. injektiranje), i 4 s i 6 kV za (2. injektiranje). Broj analiziranih tehničkih replika označen je n.



Slika 15. Usporedba varijacije udjela normaliziranih površina *N*-glikana iz IgG-a ljudske plazme integriranjem površine pika i visine pika nakon pročišćavanja na 100 μL Bio-gel P-10 (n = 14). 1 μL eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om pomiješano je s 9 μL HiDi formamida i 0,02 uL standarda *Gene scan 500 Rox* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, napon injektiranja 12 kV za 1. injektiranje, a 4 s i 6 kV za 2. injektiranje. Broj analiziranih tehničkih replika označen je n.

## **5. Zaključak**

- Metoda tekućinske kromatografije spregnuta sa spektrometrijom masa ponovljiva je za analizu glikopeptida fragmenta Fc IgG-a izoliranog iz mišjih seruma.
- Značajne razlike među udjelima normaliziranih površina glikoformi za iste podklase IgG-a izoliranih iz seruma divljeg tipa i svakog od miševa kojima su uklonjeni geni za receptore  $Fc\gamma$  i  $\gamma$  lanac testirane Mann Whitneyevim U testom, pokazuju sljedeće glikoforme: H3N4F1 podklase IgG2 iz seruma jedinke miša kojem su uklonjeni geni za receptore  $Fc\gamma$ IIB, H3N4F1 podklase IgG1 te strukture H3N4F1, H4N4F1G1, H5N4F1 i H5N4F1G1 podklase IgG2 iz seruma jedinke miša kojemu su uklonjeni geni za receptore  $Fc\gamma$ III, H3N4F1 i H5N4F1 podklase IgG2 iz seruma jedinki miševa kojima su uklonjeni geni za receptore  $Fc\gamma$ IV te H4N4F1 podklase IgG2 iz seruma jedinke miša kojemu su uklonjeni geni za  $\gamma$  lanac fragmenta Fc.
- Metoda kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranim fluorescencijom zahtjeva korištenje drugačijeg pristupa za obradu podataka kako bi se mogli optimizirati predanalitički postupci te zadovoljiti uvjet visokoprotočnosti, što podrazumijeva analizu velikog broja uzorka u kratkom vremenu.

## Literatura

1. Owens, R. J. Owens, J.E. Nettleship, *Functional and Structural Proteomics of Glycoproteins*, 1st Edition, Springer Netherlands (2011)
2. O. Gornik, T. Pavić i G. Lauc, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820** (2012) 1318–1326.
3. F.Nimmerjahn, J.V. Ravetch, *Nat. Rev. Immunol.* **8** (2008) 34-47.
4. J. E. Huffman, M. Pučić-Baković, L. Klarić, R. Hennig, M. H. J. Selman, F. Vučković, M. Novokmet, J. Krištić, M. Borowiak, T. Muth, O. Polašek, G. Razdorov, O. Gornik, R. Plomp, E. Theodoratou, A. F. Wright, I. Rudan, C. Hayward, H. Campbell, A. M. Deelder, U. Reichl, Y. S. Aulchenko, E. Rapp, M. Wuhrer i G. Lauc, *Mol. Cell. Proteomics* **13** (2014) 1598–610.
5. M. Cooper, R. E. Hausman ,*The Cell: A Molecular Approach*, 4th Edition Boston University Sinauer Associates (2007).
6. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart i M. E. Etzler, *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd edition., 2009.
7. K. Murphy, A. A. Janeway, *Janeway's immunobiology*, 8th Edition, Garland Science, London and New York (2012)
8. H.W. Schroeder, L.Cavacini, *J.Allergy. Clin. Immunol.* **125** (2010) 41-51.
9. A.Alavi, J. S Axford, *Reumatology* **47** (2008) 760-770.
10. B.C. Jansen, D. Falck, N. de Haan, A.L. Ederveen Hipgrave, G. Razdorov, G. Lauc, M. Wuhrer, *J. Proteome Res.*, **1** (2016) 2198-2210.
11. H. Liu, G.G. Bulseco, J. Sun, *Immunol. Lett.* **106** (2006) 144-153.
12. Y. Mimura,S. Church, R. Ghirlando, P.R. Ashton, S. Dong, M. Goodall, J. Lund, R. Jefferis, *Mol. Immunol.* **37** (2000) 697–706.
13. <http://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-structure/> (22.3.2017.)
14. T. Dashivets, M. Thomann, P. Rueger, A. Knaupp, J. Buchner, T. Schlothauer, *PLoS ONE* **10** (2015) 1-24.
15. S. Iida, H. Misaka, M. Inoue, M. Shibata, R. Nakano, N. Yamane-Ohnuki, M.Wakitani, K. Yano, K. Shitara, M. Satoh, *Clin.Cancer Res.* **12** (2006) 2879–2887.

16. K. Masuda, T. Kubota, E. Kaneko, S. Iida, M. Wakitani, Y. Kobayashi-Natsume, A. Kubota, K. Shitara i K. Nakamura, *Mol. Immunol.* **44** (2007) 3122–3131.
17. S. Böhm, I. Schwab, A. Lux i F. Nimmerjahn, *Semin. Immunopathol.* **34** (2012) 443–453.
18. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV, *Science* **313** (2006) 670–673.
19. T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, D. Isenberg, G. Rook, J. S. Axford, and I. Roitt, *Springer Semin Immunopathol* **10** (1988) 231-249.
20. F. Nimmerjahn, R.M. Anthony, J.V. Ravetch, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104** (2007) 8433–8437.
21. C.P. Austin et al., *Nat. Gent.* **36** (2004) 921-924.
22. G. Morahan, L.Balmer, *Mamm. Genome*, **19** (2008) 390-393.
23. A.S. Klein-Schneegans, L. Kuntz, P. Fonteneau, F. Loor, *J. Autoimmun.* **2** (1989) 869-75.
24. T. Mizuochi, J. Hamako, and K. Titani, *G. Arch.Biochem. Biophys.* **257**(198) 387-394.
25. T. Takai. M Li, D. Sylestre, R. Clynes, J. V. Ravetch, *Cell* **76** (1994) 519-529.
26. R.Claynes, J.V. Ravetch, *Immunity* **3** (1995) 21-26.
27. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Chrouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6 th edition Thomson Brooks/Cole, Canada (2007).
28. I. Trbojević Akmačić, M. Vilaj, G. Lauc, *Expert. Rev. Proteomics.* **13** (2016) 523-534.
29. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija* (skripta za internu upotrebu), Zagreb (2016).
30. E. de Hoffman, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and applications*, 3 rd edition, England, John Wiley and Sons Ltd (2007.)
31. micrOTOF Q, User manul, Version 1.2, Bruker Daltonics (2008).
32. N. Galić, *Spektrometrija masa* (skripta za internu upotrebu), Zagreb (2004).
33. J. P. Landers, Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques, 3rd edition, New Yourk, Tylor nad Francis Group (2008).
34. *High Performance Capillary Electrophresis*, 2nd edition, Agilent Technologies (2014).
35. M. Krsnik-Rasol, B. Balen, B. Maček, D. Pavković, *Elektroforetske tehnike istraživanja protein*, skripta za internu uporabu.
36. ABI PRISM 310 Genetic Analyser User's manual, Applied Biosystems (2010).
37. Guttman, F. A. Chen, R. A. Evangelista, N. Cooke, *Anal. Biochem.* **233** (1996) 234–242.
38. N. Callewaert, S. Geysens, F. Moelmans, R. Contreras, *Glycobiology* **11** (2001) 275-81.

39. <https://www.neb.com/products/p0704-pngase-f> (10.1.2017.)
40. <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biology/glycobiology/glycan-labeling.html> (10.1.2017.)
41. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4310361> ( 10.1.2017.)
42. [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/general/documents/cms\\_042198.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/general/documents/cms_042198.pdf) (10.1.2017.)
43. Y.Benjamini, Y. Hochberg,*J.R. Stat. Soc. Series B* **57** (1995) 289–300.
44. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
45. <http://www.uniprot.org/> (16.3.2017.)

## 6. Prilozi

### 6.1. Tablice

Tablica 5. Ponovljivost metode LC-MS testirana na biološkim uzorcima mišjeg IgG-a. Izračunate su normalizirane površine sedam najzastupljenijih glikanskih struktura IgG-a izoliranog iz seruma C57BL/6 miševa divljeg tipa i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju Fc $\gamma$ RI (n = 4), Fc $\gamma$ RIIB (n = 5), Fc $\gamma$ RIII (n = 6), Fc $\gamma$ RIV (n = 4) i  $\gamma$  teški lanac (n = 5) gdje je n broj tehničkih replika. Standardni uzorak IgG-a izoliran je iz soja C57BL/6 (n = 5).

Glikanska struktura	Divlji tip (WT)											
	mIgG I				mIgG II				mIgG III			
	Udio / %	SD / %	CV / %	Udio / %	SD / %	CV / %	Udio / %	SD / %	CV / %	Udio / %	SD / %	CV / %
H3N4F1	46,17	2,19	4,75	13,94	2,17	15,53	40,18	5,66	14,09	-	-	-
H3N5F1	3,82	1,71	44,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	25,88	1,94	7,50	37,69	2,21	5,86	29,81	2,06	6,92	-	-	-
H4N4F1G1	12,08	2,21	18,31	8,59	0,88	10,19	7,76	3,31	42,70	-	-	-
H5N4F1	4,81	0,66	13,80	19,97	1,39	6,95	12,13	1,06	8,73	-	-	-
H5N4F1G1	5,69	0,60	10,61	15,64	1,22	7,80	8,77	2,25	25,67	-	-	-
H5N4F1G2	1,55	0,48	31,23	4,16	0,54	12,87	1,35	0,52	38,38	-	-	-
Fc $\gamma$ RI												
H3N4F1	45,11	2,12	4,70	10,02	1,63	16,29	35,28	3,48	9,86	-	-	-
H3N5F1	2,00	0,22	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	24,91	2,33	9,34	35,25	1,66	4,70	29,83	2,51	8,41	-	-	-
H4N4F1G1	12,80	0,51	4,00	8,42	1,40	16,67	8,55	0,98	11,50	-	-	-
H5N4F1	5,06	0,78	15,35	20,79	2,01	9,68	13,16	0,96	7,32	-	-	-
H5N4F1G1	8,08	0,95	11,70	19,99	2,00	9,99	11,24	2,04	18,12	-	-	-
H5N4F1G2	2,04	0,62	30,41	5,53	1,12	20,25	1,94	0,25	12,82	-	-	-
Fc $\gamma$ RIIB												
H3N4F1	48,96	3,12	6,37	21,94	2,28	10,40	40,53	3,15	7,77	-	-	-
H3N5F1	1,99	0,79	39,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	24,47	2,26	9,23	36,90	0,89	2,40	29,37	0,98	3,34	-	-	-
H4N4F1G1	12,02	0,49	4,12	9,70	0,47	4,88	7,71	0,72	9,27	-	-	-
H5N4F1	4,75	0,74	15,51	14,83	0,88	5,96	11,01	1,15	10,41	-	-	-
H5N4F1G1	6,45	0,88	13,68	12,85	1,45	11,30	9,25	1,47	15,85	-	-	-
H5N4F1G2	1,38	0,29	21,34	3,79	0,71	18,67	2,13	0,90	42,12	-	-	-
Fc $\gamma$ RIII												
H3N4F1	50,68	1,58	3,12	20,80	0,93	4,48	39,18	1,48	3,77	-	-	-
H3N5F1	2,02	0,40	19,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	23,91	1,11	4,62	36,78	1,16	3,15	29,02	0,74	2,55	-	-	-
H4N4F1G1	11,62	0,51	4,40	9,87	0,24	2,43	7,27	1,07	14,65	-	-	-
H5N4F1	4,33	0,57	13,07	15,07	0,53	3,52	12,57	1,10	8,76	-	-	-
H5N4F1G1	5,80	0,49	8,44	13,40	0,47	3,48	9,66	0,89	9,21	-	-	-
H5N4F1G2	1,63	0,13	7,95	4,09	0,14	3,35	2,28	0,33	14,36	-	-	-
Fc $\gamma$ RIV												
H3N4F1	49,03	3,24	6,61	14,17	1,02	5,83	40,22	2,75	6,83	-	-	-
H3N5F1	2,28	0,82	35,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	23,91	1,20	5,02	36,80	0,64	2,11	29,75	2,22	7,47	-	-	-
H4N4F1G1	12,20	0,79	6,46	9,06	0,30	6,99	8,56	1,45	16,95	-	-	-
H5N4F1	4,39	0,67	15,28	19,07	0,80	8,56	10,67	0,56	5,28	-	-	-
H5N4F1G1	6,45	1,39	21,53	16,34	0,62	5,64	9,23	0,97	10,47	-	-	-
H5N4F1G2	1,74	0,44	25,22	4,56	0,69	12,06	1,57	0,53	33,76	-	-	-
$\gamma$ lanac												
H3N4F1	45,25	2,11	4,67	14,17	1,02	7,19	35,43	1,55	4,39	-	-	-
H3N5F1	2,03	0,15	7,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	25,83	1,01	3,92	36,80	0,64	1,73	32,56	0,75	2,31	-	-	-
H4N4F1G1	11,02	0,77	6,99	9,06	0,30	3,31	8,16	0,37	4,57	-	-	-
H5N4F1	4,98	0,23	4,66	19,07	0,80	4,19	12,98	0,51	3,90	-	-	-
H5N4F1G1	9,28	4,14	44,64	16,34	0,62	3,82	9,59	0,67	7,02	-	-	-
H5N4F1G2	1,61	0,53	33,08	4,56	0,69	15,12	1,29	0,24	18,46	-	-	-

standard									
H3N4F1	50,38	0,52	1,03	10,45	0,44	4,20	51,34	0,60	1,16
H3N5F1	2,77	0,14	4,91	-	-	-	-	-	-
H4N4F1	26,36	0,26	1,00	41,75	0,45	1,07	30,69	1,17	3,83
H4N4F1G1	10,74	0,27	2,54	6,88	0,19	2,78	4,71	0,31	6,65
H5N4F1	4,75	0,11	2,39	22,38	0,21	0,93	9,04	0,41	4,54
H5N4F1G1	4,21	0,18	4,16	15,07	0,31	2,07	3,68	0,42	11,50
H5N4F1G2	0,80	0,15	19,15	3,47	0,24	6,99	0,54	0,06	11,12

## **6.2. Životopis**

Ime i prezime: Mia Mrčela

Datum i mjesto rođenja: 30.5.1991., Split

Obrazovanje:

2014. – 2017. Sveučilišni diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, istraživački smjer, grane: Biokemija i Analitička kemija
2010. – 2014. Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
2006. – 2010. V. Gimnazija Vladimir Nazor, Split

Sudjelovanja i priznanja:

2013. 6. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2014. 7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2015. 8. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2013. Posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje u organiziranju 6. Otvorenog dana Kemijskog odsjeka

Radno iskustvo:

veljača - svibanj 2017. Analitički laboratorij, Istraživanje i razvoj, Pliva d.o.o

rujan - prosinac 2016. Analytical laboratory, Research and development, Teva Industries Czech s.r.o., u sklopu razmjene Erasmus +