

Usporedba metoda izolacije imunoglobulina G iz krvne plazme čovjeka u svrhu određivanja N-glikanskog profila analizom CGE-LIF

Dabić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:713113>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ivona Dabić

**Usporedba metoda izolacije imunoglobulina G
iz krvne plazme čovjeka u svrhu određivanja N-
glikanskog profila analizom CGE-LIF**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju za glikobiologiju Genos d.o.o za vještačenje i analizu pod mentorstvom prof.dr.sc. Gordana Lauca u sklopu Sveučilišnog diplomskog studija kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc.dr.sc Jasmina Rokov Plavec.

Zahvale

Prije svega, zahvaljujem se svom mentoru, prof.dr. sc. Gordanu Laucu što mi je pružio priliku da svoj rad izradim u ugodnom okruženju Laboratorija za glikobiologiju tvrtke Genos, proširim svoja znanja i steknem nova iskustva.

Zahvaljujem se Maji Hanić na vremenu provedenom u laboratoriju, strpljenju, svim korisnim savjetima, svakoj inkubaciji koju je prekinula umjesto mene kako ja ne bih morala doći ranije i na tome što je sa mnom nesebično podijelila svoje znanje i vrijeme.

Zahvaljujem se svojoj neposrednoj voditeljici doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na strpljivim odgovorima na sve moje upite i njezinoj pomoći.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima na tome što me nisu pitali kako faks, što su sa mnom provodili studentske dane, ispijali kave, izlazili i učinili ovo razdoblje boljim i ljepšim.

Također, što su dokaz da prijateljstvo ne poznaje granice u atlasu.

Hvala svima na svakom izgovorenom možeš ti to, ponosan/na sam, ne sumnjam u tebe, možda nije puno, ali puno znači.

I za kraj, ono najvažnije, hvala mojoj obitelji, roditeljima i sestri na odricanju kako bih ja mogla ostvariti ono što sam zamislila i na njihovoj bezuvjetnoj podršci i ljubavi.

Posebno hvala mojoj mami, jer bez nje ništa ovo ne bi bilo moguće. Hvala mama, ti si moj vjetar u leđa. ♥

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Glikozilacija.....	3
2.2. N-glikani.....	6
2.2.1.1. Stvaranje prekursora oligosaharida.....	7
2.2.1.2. Prijenos prekursora u polipeptidni lanac.....	9
2.2.1.3. Početna obrada prekursora.....	10
2.2.1.4. Konačna obrada prekursora	11
2.2.1.5. Sazrijevanje N-glikana u trans-Golgiju.....	11
2.3. Imunoglobulini	13
2.3.1. Imunoglobulin G.....	13
2.3.1.2 Potklase imunoglobulina G.....	16
2.3.1.3. Promjene u N-glikomu IgG-a.....	16
2.4. Metode obogaćivanja IgG-a	18
2.5. Metode pripreme i analize N-glikana.....	19
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. Materijali	22
3.1.1. Kemikalije	22
3.1.2. Materijali	23
3.2. Instrumenti	24
3.3. Metode.....	25
3.3.1. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću Melon Gel-a	25
3.3.2. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću protein G agaroznih zrnaca	26
3.3.3. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću pločice monolita s proteinom G	26
3.3.4. SDS-PAGE	28
3.3.5. In solution deglikozilacija i APTS obilježavanje IgG-a za CGE-LIF analizu	29
3.3.6. HILIC-SPE čišćenje obilježenih N-glikana za CGE-LIF analizu	30
3.3.7. CGE-LIF analiza N-glikana i obrada podataka	31
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću Melon Gel-a i protein G agaroznih zrnaca	32
4.1.1. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 01	32

4.1.2. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 02	33
4.1.3. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 03	35
4.1.4. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 04	37
4.1.5. Izolacija IgG-a pomoću protein G agaroznih zrnaca	39
4.2. Izolacija IgG-a za potrebe xCGE-LIF analize i rezultati analize	42
ZAKLJUČAK.....	55
§ 5. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	56
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	58
§ 7. ŽIVOTOPIS	LXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Usporedba metoda izolacije imunoglobulina G iz krvne plazme čovjeka u svrhu određivanja *N*-glikanskog profila analizom CGE-LIF

Ivona Dabić

Glikozilacija je važna posttranslacijska modifikacija proteina koja ih oplemenjuje novim svojstvima te utječe na njihovu stabilnost i funkciju. Promjene u glikozilaciji proteina krvne plazme odnosno seruma primjećene su kod mnogih autoimunih bolesti i karcinoma. Jedan od takvih proteina je i imunoglobulin G (IgG), ključna molekula u obrani našeg organizma, a čiji su pripadajući *N*-glikani dosad pokazali snažan potencijal kod uporabe u dijagnostičke i prognostičke svrhe. Kako bi se ispitala *N*-glikozilacija IgG-a, ključan korak je njegovo pročišćavanje odnosno izolacija iz kompleksne smjese proteina krvne plazme i drugih sastojaka. Danas se u tu svrhu najčešće koristi afinitetno pročišćavanje uz pomoć proteina G u različitim formatima, no dostupne su i druge metode. Usporedbom tri metode izolacije IgG-a (protein G vezan za monolit, protein G vezan za agarozna zrnca, Melon Gel), Melon Gel se pokazao kao najbolja alternativa izolaciji IgG-a proteinom G vezanim za monolit pločice, metodi danas široko rasprostranjenoj u visoko-protočnoj *N*-glikanskoj analizi IgG-a.

(55 stranica, 22 slika, 8 tablica, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: imunoglobulin G, Melon Gel, *N*-glikozilacija, *N*-glikani, protein G

Mentor: prof. dr. sc. Gordan Lauc

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
 2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
 3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Datum diplomskog ispita: 29. rujan 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Comparison of immunoglobulin G isolation methods from human blood plasma in the determination of N-glycan profile by CGE-LIF analysis

Ivona Dabić

Glycosylation is an important posttranslational modification of proteins that enriches them with new properties and affects their stability and function. Changes in glycosylation of blood plasma or serum proteins have been observed in many autoimmune diseases and cancers. One of such proteins is immunoglobulin G (IgG), a key molecule in the defense of our body, whose associated *N*-glycans have shown strong potential for use in diagnostic and prognostic purposes. In order to examine the *N*-glycosylation of IgG, a key step is its purification or isolation from a complex mixture of blood plasma proteins and other ingredients. Today, affinity purification using protein G in various formats is most commonly used for this purpose, but other methods are also available. By comparing three methods of isolating IgG (protein G bound to a monolith, protein G agarose beads, Melon Gel), Melon Gel proved to be the best alternative to isolating IgG with protein G monolithic plate, a method widely used today in high-flow *N*-glycan analysis of IgG.

(55 pages, 22 figures, 8 tables, 52 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: immunoglobulin G, Melon Gel, *N*-glycosylation, *N*-glycans, protein G

Mentor: Dr. Gordan Lauc

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
 2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
 3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
- Substitute: Dr. Biserka Prugovečki, Professor

Date of exam: September 29th 2021.

§ 1. UVOD

Glikani su danas predmet raznih istraživanja zato što je glikozilacija kao kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija omogućila stvaranje novih molekula za koje ne postoji izravan genetski kalup kao što je to slučaj sa proteinima i nukleinskim kiselinama, već su glikani produkt složenog biosintetskog puta koji ovisi o mnogim genetskim i okolišnim čimbenicima.¹ Sve molekule imunoglobulina G (IgG), koji je važan čimbenik naše humoralne imunosti, nose *N*-glikane koji moduliraju njihovu biološku aktivnost. Promjene *N*-glikozilacije IgG-a povezuju se s raznim bolestima i utječu na aktivnost terapijskih protutijela i intravenoznih imunoglobulina što čini IgG jednim od najproučavanijih glikoproteina.

Prvi korak u ispitivanju *N*-glikozilacije IgG-a čini upravo njegovo pročišćavanje odnosno izolacija iz matriksa krvne plazme ili seruma. Metode koje se najčešće koriste u današnjoj glikomici su visoko-protočne (engl. *high-throughput*) metode pripreme uzoraka i analize koje omogućavaju obradu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu. Konkretno, za izolaciju IgG-a koristi se više afinitetnih metoda od kojih je najučestalija metoda rekombinantnog proteina G pomoću koje se IgG izolira u uvjetima niskih pH vrijednosti.² Kao alternativa ovim metodama izolacije postoji metoda pročišćavanja pomoću Melon Gel-a koji omogućava izolaciju IgG-a pri neutralnim pH vrijednostima što omogućava potencijalno očuvanje labilnih sijalinskih kiselina te potpomaže održavanje native strukture IgG-a važne kod ispitivanja efektorske funkcije pripadajuće Fc domene.³

U ovom radu korištena je i detaljnije će biti opisana kapilarna gel-elektroforeza uz detekciju fluorescencije inducirane laserom (CGE-LIF, engl. *Capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*) koja je korištena za dobivanje *N*-glikanskog profila IgG-a izoliranog iz ljudske plazme pomoću Melon Gel-a, protein G agaroznih zrnaca i pločice monolita s vezanim proteinom G.

Tema ovog diplomskog rada je usporedba visoko-protočnih metoda izolacije IgG-a iz krvne plazme pomoću proteina G vezanog za monolit i agarozna zrnca te Melon Gel-a, radi određivanja *N*-glikanskog profila IgG-a CGE-LIF metodom.

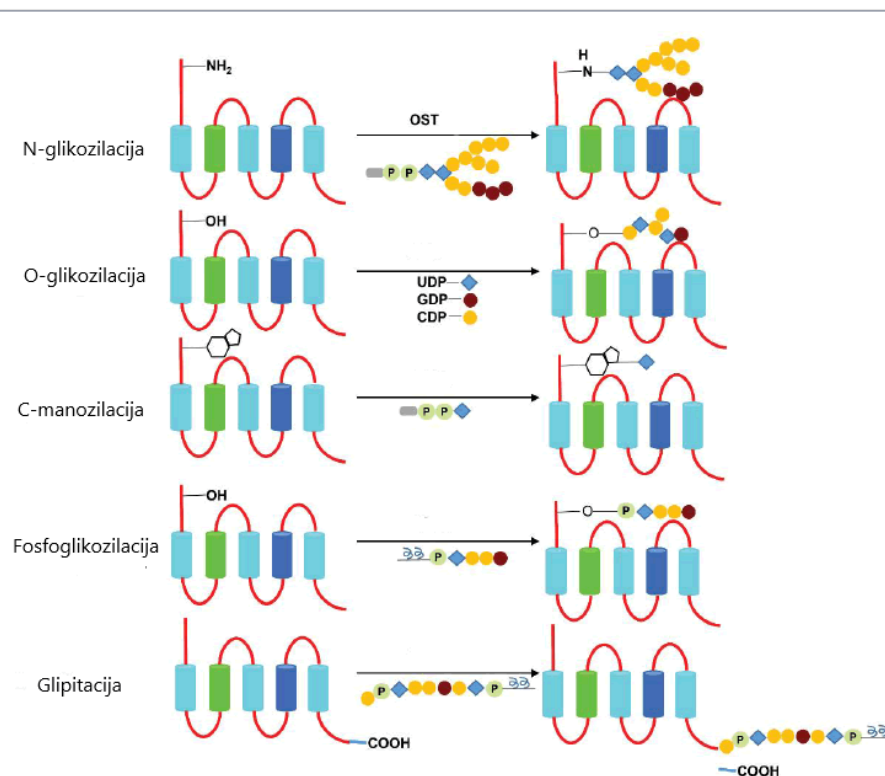
Cilj proučavanja jest odrediti optimalne volumene krvne plazme iz kojih je moguće izolirati IgG uz pomoć proteina G vezanog za monolit ili agarozna zrnca te Melon Gel-a, odrediti i usporediti koncentracije izoliranog IgG-a, ispitati čistoću izoliranog IgG-a, usporediti

N-glikanske profile dobivene nakon izolacije IgG-a, odrediti ponovljivost metoda te razinu sijalinizacije *N*-glikana IgG-a. Usporedba metoda provest će se na tri standardna biološka uzorka ljudske krvne plazme u osam tehničkih replikata kako bi se uočile moguće razlike u učinkovitosti izolacije i utjecaj na daljnju pripremu i analizu *N*-glikana IgG-a.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Glikozilacija

Glikozilacija proteina jedna je od najčešćih kotranslacijskih i posttranslacijskih modifikacija vezanja šećera odnosno glikana na proteinsku okosnicu pri čemu dolazi do promjene strukture i funkcije sintetiziranih glikoproteina.⁴ Budući da su gotovo svi proteini ljudskog seruma, bjelanjka kokoši te membrana životinjskih stanica glikozilirani, smatra se da se većina proteina zapravo može nazvati glikoproteinima.⁵ Glikani se uz proteine, lipide i nukleinske kiseline smatraju četvrtom ključnom komponentnom stanice, a procesom glikozilacije stvara se kovalentna veza upravo između oligosaharida, odnosno glikana, i proteina ili drugih molekula, poput lipida. Glikani sudjeluju u raznim biološkim procesima kao što su adhezija stanice, aktivacija receptora, transdukcija signala i endocitoza. Skup svih glikana nekog organizma naziva se glikom. Procjenjuje se da glikom sisavaca sadržava i do tisuću različitih glikana te da je veći od proteoma.⁶ Obzirom na vrstu šećera i aminokiselina te prirodu veze kojom se oni povezuju postoje različiti oblici glikozilacije (Slika 1). Najčešće su *N*-glikozilacija, *O*-glikozilacija, *C*-manozilacija, fosfoglikozilacija i glipitacija. Najviše su zastupljeni *N*-glikani koji su povezani *N*-glikozidnom vezom preko asparaginskog ostatka (Asn) u proteinima, posebno s onima koji sadrže motiv Asn-X(bilo koja aminokiselina osim prolina)-Ser/Thr, dok se *O*-glikani povezuju *O*-glikozidnom vezom preko kisikovog atoma serina i treonina te nemaju određeni motiv na koji se vežu kao što je to slučaj kod *N*-glikana. *C*-manozilacija podrazumijeva vezanje manozilnog ostatka na C-2 atom treonina preko C-C veze i za razliku od *N*- i *O*-glikozilacije ova glikopeptidna veza ne uključuje aminokiselinsku funkcionalnu skupinu.^{7,8} Fosfoglikozilacija je vezanje šećera na peptide pomoću fosfodieterske veze i predstavlja posebnu vrstu glikopeptidne veze dok glipitacija također predstavlja poseban tip vezanja u kojemu su proteini vezani na lipidno sidro preko glikanskog lanca.⁹



Slika 1. Klasifikacija reakcija glikozilacije proteina.⁷

Glikani nastaju uz pomoć enzima glikoziltransferaza i glikozidaza koje djeluju uzastopno te modificiraju glikane u Golgijevom aparatu i u konačnici određuju profil glikana cijele stanice.¹⁰ Glikoziltransferaze sintetiziraju glikanske lance dok glikozidaze hidroliziraju specifične veze između glikana. Glikozilacija u sekrecijskom putu je dinamičan proces koji ima mnogobrojne mehanizme koji reguliraju ekspresiju i strukturu glikoziltransferaza i glikozidaza te njihovu dostupnost supstratima.⁶ Glikani mogu biti prisutni u raznim strukturnim oblicima na istom proteinu i na istom mjestu glikozilacije što rezultira različitim glikoformama iste molekule. Smatra se da ove promjene odražavaju podrijetlo molekule, govoreći o fiziološkom i biokemijskom stanju organizma u trenutku njezinog oslobađanja. Najvažnija značajka glikoproteina je njihova heterogenost koja je vidljiva kroz manje, ali ponekada i izraženije razlike u grananju, gubitku monosaharida iz jedne od grana glikana te odsutnošću ili prisutnošću određenih monosaharida kao što su sijalinska kiselina, fukoza, *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) ili neke druge vrste veza između šećera.¹¹ Važno obilježje glikanskih lanaca jest to što oni, za razliku od proteinskih sekvenci koje su primarni genski produkti, nisu kodirani izravno u genomu nego predstavljaju sekundarne genske produkte.¹² Budući da ne postoji genski nacrt za

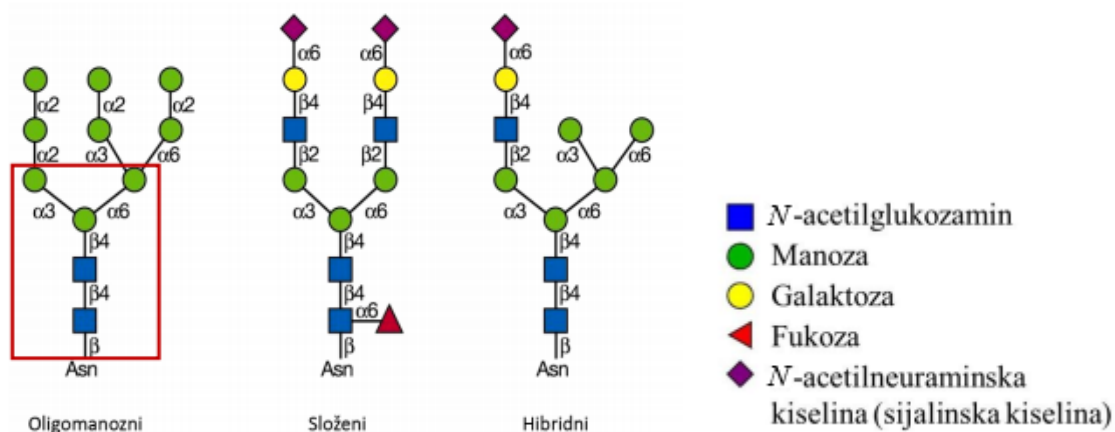
glikane, pojedinačne glikanske strukture variraju ovisno o trenutnoj razini ekspresije i unutarstaničnoj lokalizaciji biosintetskih enzima, glikoziltransferaza i glikozidaza, te dostupnosti supstrata. Posljedica toga jest to što su promijenjene strukture glikana često pričvršćene na istu proteinsku okosnicu kao rezultat fizioloških i patofizioloških procesa koji se događaju unutar stanice. Te promjene mogu biti vrlo specifične, a razne studije glikozilacije serumskih proteina nude dobru osnovu za dijagnozu i prognozu mnogih bolesti koje su povezane s promjenama u strukturi glikana.¹³

2.2. N-glikani

Prilikom sinteze *N*-glikana proteini koji prolaze kroz sekrecijski put kojeg čine endoplazmatski retikulum (ER) i Golgijev aparat prenose se na površinu stanice gdje se izvoze ili usidre u plazmatsku membranu, izvanstanični matriks ili na staničnu stijenku. Sve eukariotske stanice proizvode *N*-glikane i svi biosintetski koraci su evolucijski očuvani.¹⁴

N-glikani su kovalentno vezani za proteine na ostacima asparagina preko *N*-glikozidne veze. Razlikuje se pet različitih vrsta *N*-glikana, od kojih je *N*-acetilglukozamin na asparagin (GlcNAc β 1-Asn) jedna od najčešćih i najviše istraživanih. Slijed aminokiselina na koje se vežu *N*-glikani započinje asparaginom, a slijedi bilo koja aminokiselina, osim prolina te završava serinom ili treoninom (Asn-X-Ser / Thr). Prema tome, ne može svaki asparaginski ostatak prihvatiti *N*-glikan nego su Asn-X-Ser / Thr sljedovi u proteinima oni koji su kandidati za vezanje *N*-glikana. Svi *N*-glikani dijele zajedničku sekvencu šećera u jezgri, Man α 1–6 (Man α 1–3) Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser / Thr, i podijeljeni su u tri vrste:

- (1) oligomanozni tip u kojemu su samo ostaci manoze pričvršćeni na jezgru;
- (2) složeni tip, čije antene započinju *N*-acetilglukozaminom;
- (3) hibridni tip, u kojem su samo ostaci manoze pričvršćeni na Man α 1–6 krak srži, a jedan ili dva *N*-acetilglukozamina na Man α 1–3 kraku srži^{12,14} (Slika 2)



Slika 2. Tipovi *N*-glikana: oligomanozni, složeni i hibridni sa pripadajućim kraticama i simbolima označavanja. Crvenim kvadratom označena je srž zajednička svim *N*-glikanima.¹²

N-glikani se javljaju na mnogim izlučenim i membranski vezanim glikoproteinima u sekvencama Asn-X-Ser / Thr. Prijenos *N*-glikana u sekvence Asn-X-Ser / Thr odvija se na lumenalnoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma dok se proteinski dio sintetizira na

ER-vezanim ribosomima i translocira kroz ER membranu. Membranski glikoproteini ostaju usidreni u ER membrani s dijelovima koji su izloženi lumenu ER, ostalim dijelovima ugrađenim u membranu, ali i ostalim dijelovima unutar citoplazme. Samo će domene koje su dostupne ER lumenu primiti *N*-glikan. Glikoproteini bez transmembranske domene primaju *N*-glikane kotranslacijski i na kraju se u potpunosti translociraju u lumen ER. Prisutnost Asn-X-Ser / Thr sekvenca je neophodna za primanje *N*-glikana, ali usprkos tome prijenos *N*-glikana u ovu sekvencu ne događa se uvijek zbog konformacijskih ili nekih drugih ograničenja. Također, vrsta "X" aminokiseline može smanjiti učinkovitost glikozilacije, što se događa kada je "X" neka kisela aminokiselina kao što su aspartat ili glutamat.¹²

2.2.1. Biosinteza *N*-glikana

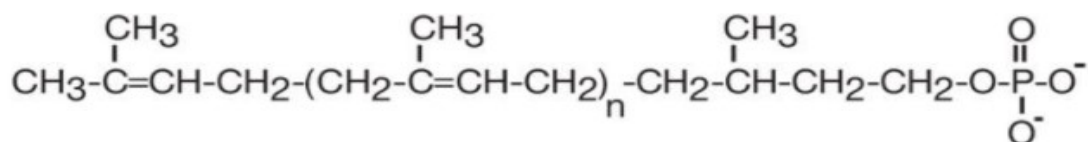
N-glikani se u početku sintetiziraju na lipidima sličnoj molekuli dolikol-fosfata (Dol-P), nakon čega slijedi "*en bloc*" prijenos cjelokupnog glikana od 14 šećera u protein. Razumijevanje načina sinteze *N*-glikana važno je jer *N*-glikani utječu na mnoga svojstva glikoproteina koja uključuju njihovu konformaciju, topljivost, antigenost i prepoznavanje proteina koji vežu glikan. Stanični biolozi koriste *N*-glikane kao oznake za lokaliziranje glikoproteina ili za praćenje njihovog kretanja kroz stanicu. Defekti u sintezi *N*-glikana dovode do raznih ljudskih bolesti.¹²

Sinteza *N*-vezanih glikana može se podijeliti u četiri faze: stvaranje lipidno povezanog prekursora oligosaharida, prijenos prekursora u polipeptidni lanac, početna obrada prekursora i konačna obrada koja podrazumijeva produljenje oligosaharida. Dok se prva tri koraka odvijaju u ER-u, konačna obrada i produljenje glikana odvijaju se na Golgijevom aparatu.¹⁵

2.2.1.1. Stvaranje prekursora oligosaharida

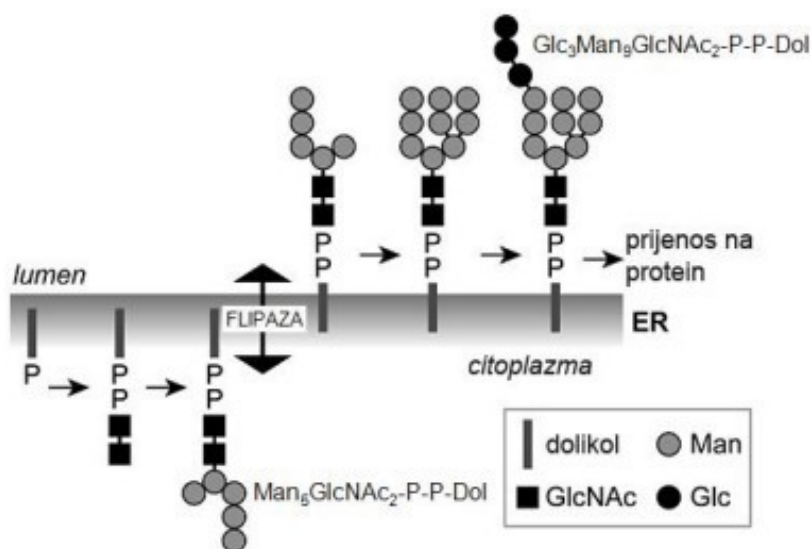
U sisavaca *N*-glikozilacija zahtijeva prethodnu pripremu lipidno povezanog prekursora koji se sastoji od tri glukoze (Glc), devet ostataka manoze (Man) i dva ostatka GlcNAc koji su povezani s pirofosfat-dolikolom (Dol-P-P).¹⁶ Biosinteza *N*-glikana započinje na citoplazmatskoj strani membrane ER-a prijenosom GlcNAc-P iz UDP-GlcNAc u Dol-P koji je vezan na membranu, kako bi nastao dolikol-pirofosfat-*N*-acetilglukozamin (Dol-P-P-GlcNAc). Dolikol je lipid koji sintetizira *cis*-preniltransferaza, a sinteza počinje od farnezilpirofosfata i

nastavlja se dodavanjem C5 izoprenskih jedinica koje su linearno povezane načinom glava-rep. Broj izoprenskih jedinica u dolikolu varira između različitih vrsta stanica i organizama. Promjene u biosintezi dolikola značajno utječu na proces *N*-glikozilacije, a u sintezi *N*-glikana koristi se Dol-P (Slika 3).¹⁷



Slika 3. Struktura dolikol-fosfata (Dol-P)¹².

Prvi korak sinteze, kojim nastaje Dol-P-P-GlcNAc, kataliziran je enzimom GlcNAc-1-fosfotransferazom koja prevodi GlcNAc-1-P u UDP-GlcNAc. Drugi GlcNAc i pet manoznih ostataka postupno se prenose s UDP-GlcNAc, odnosno GDP-manoze kako bi na citoplazmatskoj strani ER-a nastao Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol. Svaki dodatak šećera kataliziran je specifičnom glikoziltransferazom. Svi enzimi kataliziraju prijenos samo šećernog dijela nukleotidnog šećera dok GlcNAc-1-fosfotransferaza prenosi šećer povezan sa fosfatom.¹² Nastali prekursor Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol translocira se pomoću flipaze iz citosolnog dijela membrane ER-a u lumenalni tako da glikan bude izložen lumenu ER-a i na njega se zatim iz Man-P-Dol prenose još četiri manozna ostatka djelovanjem manozil-transferaze te dodatna tri ostatka glukoze pomoću glukozil-transferaze sa Glc-P-Dol čime se dovršava sinteza prekursora Dol-P-P glikana (Slika 4). Man-P-Dol i Glc-P-Dol također se sintetiziraju na citosolnoj površini ER membrane, a zatim se pomoću specifičnih flipaza translociraju na lumenalni sloj gdje služe kao donori glikozila.¹⁸ Nastali zreli prekursor *N*-glikana Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol spreman je za prijenos na asparagin u aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser/Thr.



Slika 4. Shematski prikaz biosinteze prekursora oligosaharida. Oznake: ER – endoplazmatski retikulum, GlcNAc - *N*-acetilglukozamin, Man – manoz, Glc – glukoza.¹⁸

2.2.1.2. Prijenos prekursora na polipeptidni lanac

Sintetizirani prekursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ s Dol-P-P na Asn-X-Ser/Thr u novosintetiziranim proteinima koji izlazi iz translokona u ER membrani prenosi kompleks bjelančevina oligosaharil-transferaza (OST). Ovaj multimerni enzimski kompleks u kvascu se sastoji od devet, a u viših eukariota od četiri podjedinice i integralni je dio ER membrane. Sve podjedinice kompleksa su transmembranski proteini.¹⁹ Njegova uloga je vezanje na Dol-P-P -oligosaharid koji je usidren u membrani i prijenos glikana na proteine u nastajanju pri čemu dolazi do cijepanja visokoenergetske veze GlcNAc-P i oslobađanja Dol-P-P . Katalitička podjedinica OST-a prisutna je u dvije izoforme Stt3A i Stt3B, a u sisavaca su identificirana tri kompleksa i svi sadrže riboforine I i II, OST48 te DAD1.²⁰ OST-I, OST-II i OST-III sisavaca razlikuju se po svojim kinetičkim svojstvima i sposobnostima prenošenja Dol-P-P -glikana koji imaju manje od 14 šećera.¹²

2.2.1.3. Početna obrada prekursora

Nakon kovalentnog vezanja glikana na Asn-X-Ser / Thr u polipeptidu započinje obrada *N*-glikana u ER-u nizom reakcijskih procesa (Slika 5). Ovi početni koraci obrade evolucijski su očuvani kod svih eukariota i njihova uloga ključna je za smatanje glikoproteina zato što osiguravaju supstrat koji omogućava interakciju sa dva ER lektina u funkciji chaperona, kalneksinom i kalretikulinom.²¹ Obrada $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ započinje uklanjanjem ostataka glukoze pomoću α -glukozidaza I i II. Obje glukozidaze djeluju u lumenu ER, a α -glukozidaza I djeluje specifično na terminalnu $\alpha 1-2\text{Glc}$ vezu dok α -glukozidaza II uzastopno uklanja dva unutarnja ostatka $\alpha 1-3\text{Glc}$. Prije izlaska iz ER-a na glikoproteine djeluje ER α -manozidaza I koja specifično uklanja terminalnu $\alpha 1-2\text{Man}$ vezu iz središnjeg kraka $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ pri čemu nastaje $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ izomer. U ER-u se nalazi i protein EDEM 1 (engl. *ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase I-like protein*) sličan α -manozidazi I, ali bez enzimske aktivnosti. Njegova uloga je prepoznavanje pogrešno smotanih glikoproteina. Većina glikoproteina koji izlaze iz ER-a na putu do Golgija nose *N*-glikane s osam ili devet ostataka manoze ovisno o tome je li na njih djelovala ER α -manozidaza I. Neki *N*-glikani u *cis*-Golgiju zadržavaju ostatke glukoze zbog nepotpune obrade u ER-u. Endo- α -manozidaza koja se nalazi u Golgiju cijepa između dva ostatka manoze u skupini $\text{Glc}\alpha 1-3\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2$ takvih *N*-glikana, precizno uklanjajući krajnju glukozu i manozu na koju je vezana, stvarajući drukčiji izomer od onog $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ koji se u ER proizvodi α -manozidazom I. U višestaničnim organizmima nastavlja se uklanjanje ostataka $\alpha 1-2\text{Man}$ djelovanjem $\alpha 1-2$ manozidaza IA, IB i IC u *cis*-Golgiju dajući $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ koji je ključni međuprodukt na putu do hibridnih i složenih *N*-glikana. Međutim, svi *N*-glikani nisu u potpunosti obrađeni u $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, i ne mogu se podvrgnuti preoblikovanju kako bi stvorili hibridne i složene strukture, a i neki $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ također mogu izbjeći daljnje modifikacije. U tim će slučajevima zrela membrana ili izlučeni glikoprotein nositi oligomanozne *N*-glikane tipa $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$. Većina zrelih glikoproteina ima neke oligomanozne *N*-glikane koji nisu prerađeni u *cis*-Golgiju.¹²

2.2.1.4. Konačna obrada prekursora

Biosinteza hibridnih i složenih *N*-glikana počinje u središnjem dijelu Golgijevog aparata djelovanjem *N*-acetilglukozaminiltransferaze (GlcNAcT-I) koja dodaje GlcNAc na ugljikov atom C2 α 1–3 manoze u srži $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Nakon ovog koraka sa većine *N*-glikana se pomoću α -manozide II uklanjaju terminalni ostatci α 1-3Man i α 1-6Man iz $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ kako bi nastao $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Ovaj enzim, α -manozidaza II, ne može djelovati na intermedijer $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ukoliko na njega prvo ne djeluje GlcNAcT-I. Nakon što su uklonjena dva ostatka manoze djelovanjem GlcNAcT-II dodaje se drugi GlcNAc na C-2 α 1–6 vezane manoze i nastaje prekursor za sve biantenarne složene *N*-glikane. Hibridni *N*-glikani nastaju ako na glikan $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ ne djeluje α -manozidaza II i ne ukloni α 1–3Man i α 1–6Man ostatke. Nepotpuno djelovanje α -manozidaze II može rezultirati hibridima $\text{GlcNAcMan}_4\text{GlcNAc}_2$.

Kompleksni *N*-glikani mogu imati i dodatne grane djelovanjem GlcNAcT-IV na α 1–3 manoznu srž i GlcNAcT-V na α 1–6 manoznu srž kako bi se dobili tri- i tetra-antenski *N*-glikani.¹²

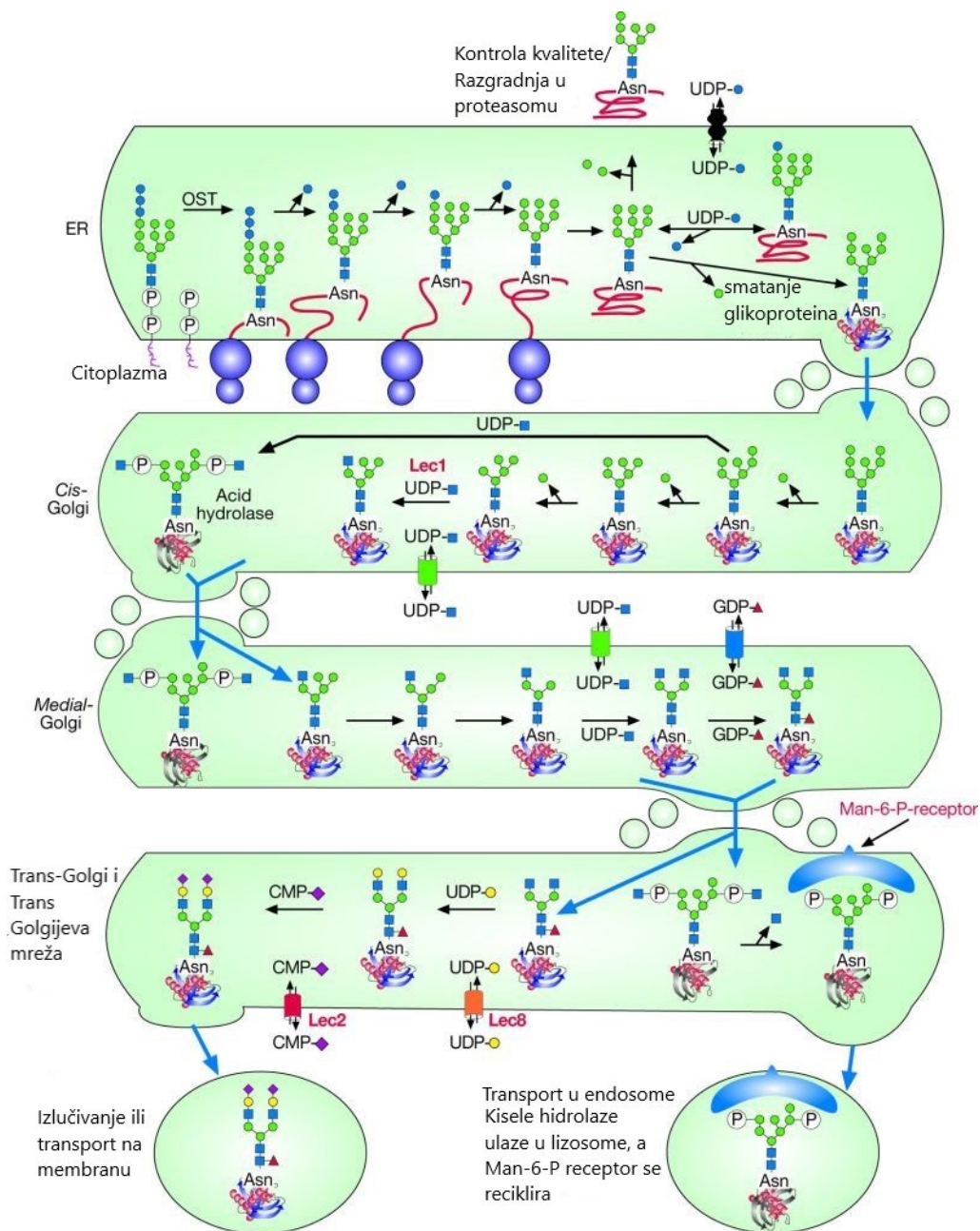
2.2.1.5. Sazrijevanje *N*-glikana u *trans*-Golgiju

Zreli, složeni *N*-glikani nastaju dodavanjem šećera u *trans*-Golgiju iz hibridnih i kompleksnih *N*-glikana. Sazrijevanje *N*-glikana može se podijeliti u tri procesa:

(1) dodavanje šećera na srž strukture – glavna modifikacija *N*-glikana kod kralješnjaka pri čemu dolazi do vezanja fukoze α 1–6-glikozidnom vezom na GlcNAc kojim je glikan povezan na asparagin proteina. Fukozilacija u glikoproteinima beskralješnjaka također se događa na ovom *N*-acetilglukozaminu, ali se fukoza može vezati α 1–3 i / ili α 1–6-glikozidnim vezama te oni mogu imati i do četiri vezane fukoze. Kod biljaka se fukoza može vezati samo α 1–3-glikozidnom vezom i to samo uz prethodno djelovanje GlcNAcT-I.

(2) vezanje šećera na terminalne *N*-acetilglukozamine odnosno produživanje antena – produžene antene nastaju vezanjem galaktoze čime nastaje gradivni blok $\text{Gal}\beta$ 1-4GlcNAc, a antene se dodatno mogu produžiti sekvencijalnim dodavanjem ostataka *N*-acetilglukozamina i galaktoze te nastaje slijed $(-3\text{Gal}\beta$ 1-4GlcNAc β 1-)_n, a galaktoza se može vezati i na C3 ugljikov atom *N*-acetilglukozamina kako bi se dobio $\text{Gal}\beta$ 1-3GlcNAc.

(3) vezanje šećera na produžene antene – Ove reakcije uključuju dodavanje sijalinske kiseline, fukoze, galaktoze, *N*-acetilgalaktozamina i sulfata na već postojeće antene. Ovi šećeri povezani su α -glikozidnim vezama što olakšava stvaranje interakcija krajnjih šećera sa lektinima i protutijelima.¹²



Slika 5. Shematski prikaz biosintetskog puta *N*-glikana od endoplazmatskog retikuluma do *trans*-Golgija.¹²

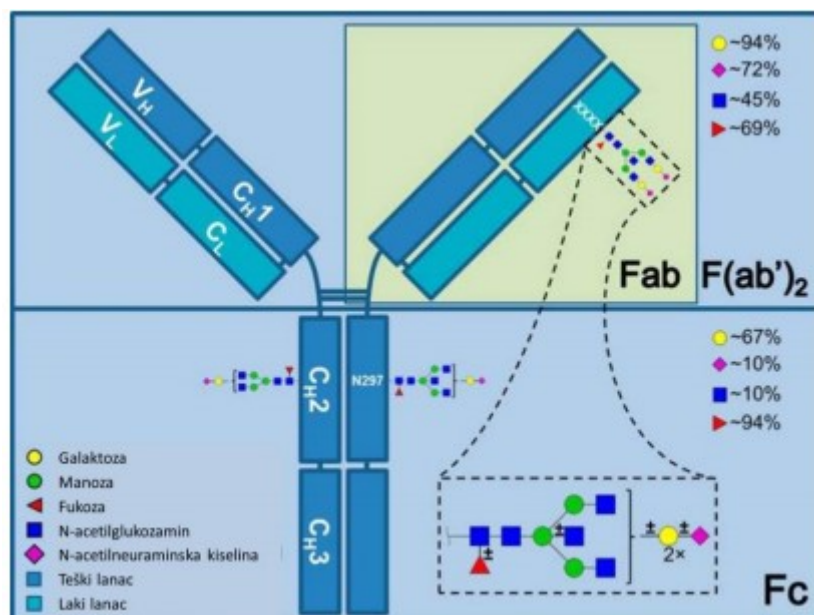
2.3. Imunoglobulini

Bjelančevine u krvnoj plazmi i serumu dijele se na albumine i globuline. Većina protutijela pripada skupini gama-globulina koji su najbrža skupina globulina i prema tome protutijela se drugim imenom zovu imunoglobulini (Ig), a tijelo kralježnjaka ih luči kao odgovor na prisutnost stranih molekula – antigena. Protutijela proizvode limfociti B i mogu biti u dva oblika, protutijela koja su vezana za membrane na površini limfocita B koji djeluju kao antigenski receptori i topiva protutijela koja neutraliziraju toksine, sprječavaju ulazak i širenje patogena te uklanjaju mikroorganizme. Humoralni imunski odgovor pokreće se onoga trenutka kada protutijela na membrani limfocita prepoznaju antigen, odnosno kada se stanice aktiviraju. Takve aktivirane stanice limfocita B postaju plazma stanice koje onda izlučuju protutijela specifična za određeni antigen. Protutijela imaju ista osnovna svojstva, ali postoji varijabilnost u onim dijelovima koji služe za vezanje antigena i upravo zbog te varijabilnosti veznih mjesta mogu vezati velik broj strukturno različitih antigena. Molekule protutijela imaju Y oblik, a sastoje od V regije koja je zaslužna za vezanje antigena i strukture te regije različite su kod različitih protutijela dok je C regija manje varijabilna i ona dolazi u interakciju sa efektorskim molekulama i stanicama. Razlikujemo pet vrsta imunoglobulina: IgM, IgD, IgG, IgA i IgE.²²

2.3.1. Imunoglobulin G

Imunoglobulin G najrasprostranjenije je protutijelo u ljudskom organizmu. Izlučuju ga plazma stanice, a njegova koncentracija u serumu kreće se od 7 do 18 mg/mL kod zdravih odraslih osoba. IgG je uključen u višestruke humoralne imunološke procese kao što su neutralizacija antigena, aktivacija komplementa i citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC, engl. *complement-dependent cytotoxicity*), ciljna opsonizacija za fagocitozu, stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (ADCC, engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) i reakcije preosjetljivosti.²³ IgG antitijela su velike molekule sa molekulskom masom od 150 kDa. Teški lanac (engl. *Heavy chain, H chain*) ima molekulsku masu od otprilike 50 kDa, dok laki (engl. *Light chain, L chain*) ima masu od oko 25 kDa. Svaka molekula

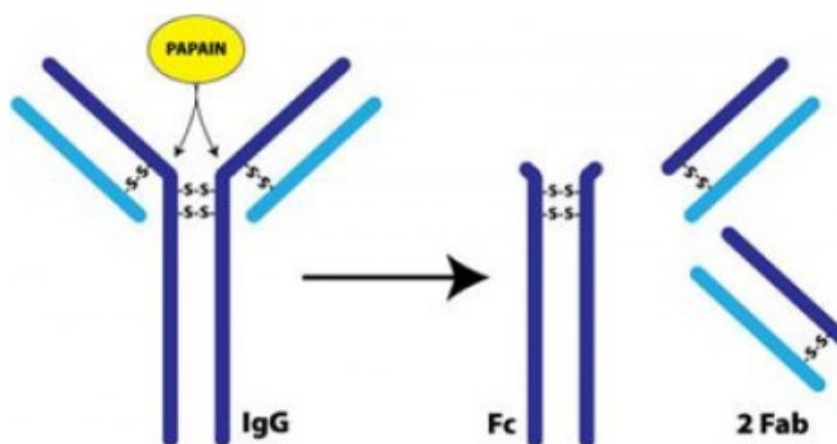
ima dva teška i dva laka lanca. Obje vrste lanaca imaju niz ponavljajućih jedinica od oko 110 aminokiselina koje se neovisno savijaju i čine imunoglobulinsku domenu. Teški i laki lanci sastoje se od amino (N)-terminalne varijabilne regije (V) koja sudjeluje u prepoznavanju antigena i karboksi (C)-terminalne konstantne regije (C); regije C teškog lanca imaju izvršne uloge. Varijabilne regije nazivaju se tako zato što se njihovi slijedovi aminokiselina razlikuju između protutijela koje proizvode različiti klonovi stanica B. Regija V jednog teškog lanca (V_H) i susjedna regija V lakog lanca (V_L) čine jedno vezno mjesto za antigen. Teški lanci međusobno su povezani disulfidnom vezom kao što je i svaki teški lanac povezan s lakim (Slika 6). Svako protutijelo ima dva identična teška i dva identična laka lanca te svaka molekula može vezati dva identična antigena na površini povećavajući tako jačinu interakcije što se naziva aviditet. Jačina interakcije između jednog veznog mjesta i antigena naziva se afinitet.²⁴



Slika 6. Shematski prikaz građe molekule imunoglobulina G (IgG) i pridajućih glikana N-glikana.²⁵

Molekula protutijela sastoji se od tri globularna dijela jednake veličine, dva kraka vezana su za trup na mjestu koje je fleksibilno i naziva se zglob (engl. *hinge*). Proteolitički enzimi (proteaze) bili su jako važan i koristan alat u ranim istraživanjima strukture protutijela te ukoliko IgG izložimo proteazi papainu molekula se cijepa na tri fragmenta. Papain je proteaza koja ima endopeptidaznu aktivnost i presijeca molekulu protutijela na N-terminalnoj strani disulfidnih veza koje povezuju dva teška lanca, oslobađajući tako dva kraka molekule

protutijela kao dva identična fragmenta koja sadrže aktivnost vezanja antigena (Slika 7). Oni se nazivaju Fab fragmenti (engl. *Fragment antigen binding*). Drugi fragment ne sadrži aktivnost vezanja antigena, ali budući da lako kristalizira, nazvan je Fc fragment (engl. *Fragment crystallizable*).^{22,26}



Slika 7. Prikaz cijepanja imunoglobulina G proteolitičkim enzimom papainom.²⁶

Na *N*-glikane otpada oko 15% mase IgG-a i oni predstavljaju integralni dio molekule. Kroz varijacije u svom sastavu utječu na strukturnu stabilnost, konformaciju i poluživot IgG-a kao i na njegove efektorske funkcije. Dokazano je da njihovo potpuno uklanjanje rezultira gubitkom pro- i anti-inflamatorne aktivnosti IgG-a i zbog toga je IgG jedan od najproučavanijih glikoproteina. Zbog nedostatka konzerviranih glikozilacijskih mjesta *N*-glikani koji su vezani na Fab regije IgG-a su manje proučeni, ali poznato je da utječu na stabilnost IgG-a, poluživot i vezanje antigena. Fab glikani imaju ulogu i u modulaciji imunološkog odgovora. Za razliku od Fab glikana koji su na IgG-u prisutni samo ponekad, glikani Fc regije su uvijek vezani na dušikov atom Asn-297 svakog teškog lanca. Fc glikani smješteni su u šupljini između dva teška lanca i njihova uloga je održavanje otvorene konformacije Fc teških lanaca kako bi oni mogli reagirati sa svojim receptorima (FcγR) zato što se IgG u deglikoliziranom stanju ne može vezati na receptore. Također, važna uloga Fc glikana jest što mogu biti pokazatelji raznih bolesti ili promjena u organizmu, primjerice utvrđena je promjena sastava Fc glikana odnosno promjene razina galaktozilacije i sijalinizacije kod osoba sa reumatoidnom artitritisom u odnosu na zdrave osobe. IgG glikom pojedinca označava sve *N*-glikane prisutne na molekuli IgG-a neke osobe.^{23,25}

2.3.1.2 Potklase imunoglobulina G

Od pet vrsta imunoglobulina u ljudskom organizmu IgG je najzastupljeniji, a možemo razlikovati četiri potklase, IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, koje su visoko očuvane i razlikuju se po svojim konstantnim regijama. Iako su potklase više od 90% identične na razini aminokiselina, svaka ima jedinstven profil s obzirom na vezanje antigena, stvaranje imunološkog kompleksa, aktivaciju komplementa, aktiviranje efektorskih stanica i vrijeme poluživota.²⁷ Najveće strukturne razlike između potklasa su u području zglobne regije. Zglobno područje IgG1 sadrži 15 aminokiselina i dosta je fleksibilno za razliku od ostalih. IgG2 ima zglob od 12 aminokiselina i četiri disulfidne veze u bazi Fab regije, dosta je kratak i zbog nedostatka glicina onemogućena je rotacija i ograničeno je bočno kretanje Fab regija. IgG3 je jedinstven po svom velikom zglobnom području od 62 aminokiseline te ima građu poliprolinske dvostruke zavojnice koja je nefleksibilna. IgG4 kao i prva dva ima kratak zglob sa 12 aminokiselina, a njegova fleksibilnost je između one za IgG1 i IgG2.²⁸

Ukupne razine IgG-a u serumu mogu se značajno razlikovati među zdravim odraslim osobama, ali se udio svake potklase zadržava u relativno uskom rasponu: IgG1: 60-65%; IgG2: 20-25%; IgG3: 5-10%; IgG4: 3-6%. Obzirom na razliku u građi između potklasa i njihovim razinama u serumu razumljivo je da oni imaju i različit odgovor na antigene. Put kojim antigen ulazi u naše tijelo i njegov kemijski sastav usmjeravaju imunološku reakciju i upravljaju promjenom klase imunoglobulina. Osim izravnog aktiviranja B-stanica od strane samog antigena, brojni sekundarni signali utjecat će na diferencijaciju B-stanica kao što su ligandi za TLR (*engl. Toll-like receptors*) i citokini koji proizvode limfociti. Primjerice, proteinski antigeni koji aktiviraju B stanice pomoću T limfocita potiču stvaranje IgG1 i IgG3, ali mogu se stvarati i IgG4 ili IgE. S druge strane, u nedostatku pomoći T-stanica, polisaharidni antigeni mogu potaknuti stvaranje IgG2 potklase.^{27,29}

2.3.1.3. Promjene u N-glikomu IgG-a

Mnoga istraživanja pokazala su da su promjene u N-glikomu IgG-a opažene kod starenja, raznih bolesti te različitih stanja organizma. Promjene se najviše opažaju kod razine galaktozilacije (glikani čije antene završavaju galaktozom) iako su kod zdravih pojedinaca galaktozilirane strukture relativno stabilne. Prilikom starenja, udio galaktoziliranih struktura postepeno opada dok se kod akutnih upala te promjene dešavaju naglo.²³ Tijekom života

promjene u sastavu N-glikoma mijenjaju se parabolično, a najviše galaktoziliranih struktura prisutno je u ranoj odrasloj dobi kada su najviše prisutne strukture s dvije galaktoze dok se starenjem povećava broj agalaktoziliranih struktura (bez galaktoze).³⁰

Neka istraživanja pokazala su i kako je galaktozilacija IgG-a djelomično povezana sa razinom estrogena kod žena. U trudnoći, razina galaktoziliranih struktura je povišena dok se u menopauzi smanjuje.³¹

Kada je riječ o sijalinizaciji, mono- i disijalizirane strukture čine 10-15% ukupne IgG glikanske strukture kod zdravih osoba, a sijalinske kiseline služe kao prekidač između proupalnog i protuupalnog djelovanja IgG-a u poremećajima homeostaze.²³

Glikozilacija ukupnog ili antigen-specifičnog IgG-a promijenjena je kod mnogih autoimunih bolesti koje su ovisne ili neovisne o protutijelima. Prvo istraživanje koje je pokazalo da je promjena N-glikozilacije IgG-a povezana s bolešću zabilježeno je 1985. godine i pokazalo je kako pacijenti oboljeli od reumatoidnog artritisa (RA) imaju višu razinu agalaktoziliranih vrsta IgG glikana od zdravih osoba što je kasnije i potvrđeno u drugim istraživanjima. Također, dokazano je i kako promjene nisu povezane samo sa kliničkim parametrima kao što je težina simptoma nego se mogu predvidjeti progresija bolesti i odgovor na terapiju.³²

IgG glikani se zbog svoje povezanosti s raznim bolestima i njihovim čimbenicima mogu koristiti za predviđanje ne samo kronološke nego i biološke dobi. Budući da se IgG glikani nalaze između genomskog slijeda i uvjeta okoliša oni su dobar pokazatelj zdravog starenja odnosno razlike između kronološke dobi i dobi predviđene pomoću IgG glikana. Razlika između dobi posljedica je utjecaja okoliša i načina života pojedinca.³³

Obrazac N-glikozilacije IgG-a ne može se samostalno koristiti kao biomarker specifičan za određenu bolest zbog toga što su promjene glikozilacije kod starenja i nekih autoimunih bolesti vrlo slične i kako bi se procijenila biološka dob neke osobe njihov obrazac promjene u glikozilaciji IgG-a potrebno je uvijek usporediti sa zdravim stanovništvom iste dobi, spola i etničke pripadnosti.²³

2.4. Metode obogaćivanja IgG-a

Dosad je brojnim istraživanjima utvrđena važnost poznavanja glikozilacije IgG-a, koja pokazuje veliku varijabilnost među populacijom, ali i izrazitu stabilnost unutar pojedinca. Konačan izgled oblikuje splet okolišnih i genetičkih čimbenika, a mijenja se u različitim patofiziološkim stanjima, ali i s godinama starosti čovjeka. Stoga je prvi korak u analizi *N*-glikana IgG-a jedan on najvažnijih, a to je upravo obogaćivanje odnosno izolacija IgG-a iz kompleksne smjese proteina ljudske plazme/seruma. Najčešće korištene metode pročišćavanja IgG-a su metode koje uključuju protein A i protein G kao ligande koji vežu imunoglobuline, a eksprimirani su u bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus sp.* Protein A veže Fc regije imunoglobulina G i s visokim afinitetom veže sve potklase IgG-a. Protein G se također veže na imunoglobuline preko Fc regije te u slučaju ljudskog IgG-a, s visokim afinitetom veže sve četiri potklase, a pokazuje i slab afinitet prema Fab regiji.

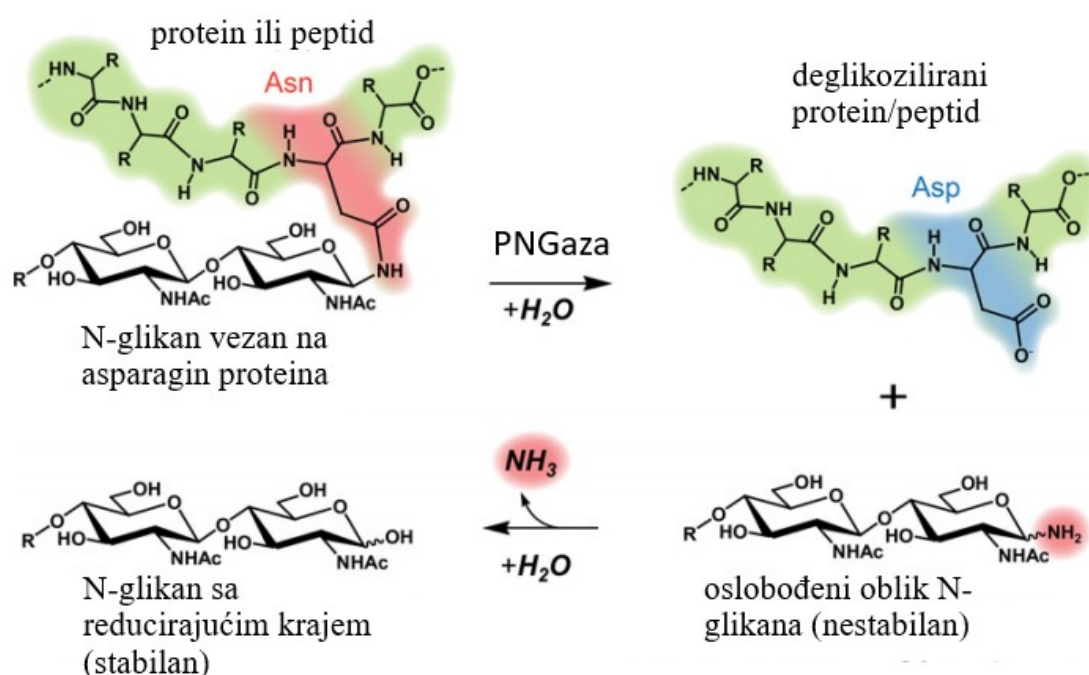
Stoga se danas u glikomici u svrhu pročišćavanja IgG-a najviše upotrebljava afinitetno pročišćavanje uz pomoć rekombinantnog proteina G koji specifično veže Fc regiju antitijela sisavaca, i to sve četiri potklase, a vezanje za Fab regiju i albumin je eliminirano genetičkim inženjerstvom.³⁴ Rekombinantni protein G pritom je vezan kao ligand za čvrstu fazu poput agaroznih zrnaca³⁴ ili monolita². Monolit je kontinuirana stacionarna faza isprepletenih kanala i pora koji se pokazao izuzetno pogodnim za obogaćivanje IgG-a u velikom broju uzoraka. Polimetakrilatni monoliti u ovom slučaju omogućuju jednostavno vezanje liganda, proteina G, za epoksi grupe, posjeduju rezistenciju na široki raspon pH vrijednosti, smanjuju nespecifična vezanja u odnosu na agarozna zrnca, omogućuju brzu obradu većeg volumena bioloških uzoraka, a najčešće se radi o volumenima od 50-100 μL .^{2,35} Protein G vezan za agarozna zrnca također se uvelike koristi, a pogotovo je pogodan kad se radi o dragocjenom i slabo dostupnom uzorku plazme/seruma jer je već nekoliko mikrolitara dovoljno za uspješnu izolaciju.³⁶ U oba slučaja, uzorci se razrjeđuju kako bi se umanjilo nespecifično vezanje drugih proteina, a uzorak se nanosi u uvjetima neutralnih pH vrijednosti, dok se eluira u uvjetima niskih pH vrijednosti.³⁶ Vrlo interesantna, ali u glikomici još nedovoljno istražena, jest i izolacija u pomoću Melon Gel-a, čiji je sastav zaštićen od strane proizvođača. Funkcionira na principu negativne selekcije odnosno veže sve proteine plazme koji nisu imunoglobulini, a propušta u najvećoj mjeri IgG i to u uvjetima neutralnog pH, a sama procedura je izuzetno jednostavna, zahtijeva malo

vremena, te omogućava izoliranje IgG visoke čistoće već iz 15 μ L krvne plazme prema literaturnim podacima.^{37,38}

2.5. Metode pripreme i analize *N*-glikana

Budući da su glikani neizostavne strukturne i funkcionalne komponente većine proteina važno ih je proučavati, ali zbog nedostatka genskog kalupa i njihove strukturne raznolikosti, znanje o glikanima i njihovoj ulozi u biološkim procesima zaostaje za znanjem o proteinima i DNA.³⁹ Tehnike za analizu glikana stalno se usavršavaju, a razvijeno je nekoliko visokoprotočnih metoda za analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom roku. Dobivanje glikanskog profila započinje oslobađanjem glikana s proteina od interesa, a zatim slijedi fluorescentno obilježavanje, pročišćavanje od viška boje i ostalih agenasa, te u konačnici i analiza. Glikani se mogu analizirati iz raznih tipova bioloških uzoraka poput već spomenute krvne plazme/seruma, i to promatrajući sve plazmatske proteine zajedno ili izolacijom proteina od interesa, poput IgG-a, kako je ranije opisano.

Kako bi se *N*-glikani mogli u potpunosti osloboditi sa željenog proteina, proteine je najprije potrebno denaturirati odnosno razmotati, kako bi se otklonile moguće steričke smetnje odnosno povećala dostupnost glikozilacijskih mjesta enzimu. Denaturacija se postiže natrijevim dodecil sulfatom (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*), redukcijskim sredstvom β -merkaptetanolom ili njihovom kombinacijom.³⁶ *N*-glikani se potom oslobađaju s proteina enzimskim cijepanjem pomoću enzima peptid *N*-glikozidaze F (PNGaza F) ili peptid *N*-glikozidaze A (PNGaza A). Rekombinantna PNGaza F se eksprimira pomoću bakterije *Escherichia coli* i koristi se za deglikozilaciju glikoproteina iz sisavaca tako što cijepa amidnu vezu između bočnog lanca asparagina i prvog GlcNAc na *N*-glikanu pri čemu se Asn prevodi u Asp i oslobađa se glikozilamin. Otpušteni glikozilamini su nestabilni te se prevode u reducirajuće oligosaharide i amonijak (Slika 8). Aktivnost PNGaze F je ometena kada je prisutna jezgra α 1,3-fukoze, no ona je prisutna najčešće u biljkama. U usporedbi s PNGazom F, PNGaza A ima širi spektar supstrata i ona omogućava oslobađanje *N*-glikana koji sadrže jezgru α -1,3-fukoze iz glikopeptida, ali ona pokazuje nižu učinkovitost.⁴⁰



Slika 8. Shematski prikaz reakcije oslobađanja *N*-glikana pomoću enzima PNGaze F.³⁶

S obzirom da glikani ne posjeduju kromofore niti fluorofore, prije analize potrebno ih je obilježiti, najčešće fluorescentnim bojama, kako bi se mogli detektirati.⁴¹ Glikani se označavaju na svojim reducirajućim krajevima u reakciji reduktivne aminacije. Fluorofor sadržava primarni amin koji se kondenzacijskom reakcijom povezuje s aldehidnom skupinom glikana pri čemu nastaje imin ili Schiffova baza koja se reducira redukcijom sredstvom dajući sekundarni amin. Za obilježavanje glikana koriste se različite fluorescentne boje, a najčešće su 2-aminobenzamid (2-AB, engl. *2-aminobenzamide*), antranilna kiselina (2-AA, engl. *anthranilic acid*), 2-aminopiridin (PA, engl. *2-aminopyridine*) i 1-aminopiren-3,6,8-trisulfonska kiselina (APTS, engl. *1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid*).⁴² Redukcijska sredstva koja se često koriste u reakcijama obilježavanja su 2-pikolin boran koji je netoksičan, zatim natrijev cijanoborhidrid (NaBH₃CN) koji je jak reducens, ali toksičan zbog hlapljivog spoja cijanovodika kojeg stvara nakon hidrolize, te natrijev triacetoksiborhidrid [NaBH(OAc)₃] koji se koristi kao alternativno redukcijno sredstvo.⁴³ Nakon obilježavanja, glikane je potrebno pročistiti od viška boje, reducensa, soli i proteinskih ostataka što se najčešće postiže metodom baziranoj na kromatografiji hidrofilnih interakcija i ekstrakciji čvrstom fazom (HILIC-SPE engl. *hydrophilic interaction chromatography - solid phase extraction*). Hidrofilna priroda glikana omogućava reakciju sa stacionarnom fazom dipol-dipol interakcijama pri čemu oni

ostaju vezani na gel, a hidrofobni peptidi i soli se ispiru organskim otapalima. Nakon pročišćavanja obilježeni glikani se eluiraju u vodi te su spremni za daljnju analizu.^{35,44,45}

Tehnike za analizu glikana stalno se usavršavaju, a razvijeno je nekoliko visokoprotočnih metoda za analizu velikog broja uzoraka. Dobivanje glikanskog profila započinje oslobađanjem glikana, a zatim slijedi deglikozilacija, fluorescentno obilježavanje, pročišćavanje te u konačnici i analiza. Za analizu glikana najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke ili vrlo visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography* - HPLC ili *ultra high performance liquid chromatography* - UHPLC) s fluorescencijskim detektorom, kapilarna elektroforeza (CE, engl. *capillary electrophoresis*) uz detekciju fluorescencije inducirane laserom, masena spektrofotometrija i rijetko, nuklearna magnetska rezonancija (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance*).⁴¹ Masena spektrometrijska analiza triptičkih IgG glikopeptida omogućava razlikovanje potklasa humanih IgG-a na temelju peptidnih razlika, a dodatno omogućava i Fc specifično glikoprofiliranje dok ostale analize oslobođenih IgG glikana ne daju informacije o mjestu glikozilacije i prema tome uključuju ukupne N-glikane iz Fc i Fab regija svih potklasa IgG-a.⁴⁶

CGE-LIF analiza moćna je analitička metoda koja omogućava vrlo osjetljivu, selektivnu i robusnu identifikaciju i kvantifikaciju oslobođenih N-glikana. Razdvajanje male količine glikana odvija se po veličini, naboju i obliku, a mogu se detektirati s visokom osjetljivošću, i to čak do 96 uzoraka istovremeno, ovisno o izvedbi instrumenta.⁴⁷ Kod CGE-LIF analize, najčešće se upotrebljava APTS boja zato što ima tri negativna naboja u širokom rasponu pH vrijednosti što omogućava kretanje analita u električnom polju, te veoma izraženo svojstvo fluorescencije. Reakcija glikana i APTS-a je također reakcija reduktivne aminacije koja zahtijeva prisutnost reducensa, kiselog katalizatora i veliki suvišak fluorofora. Iskorištenje reakcije je veće ukoliko se kao katalizatori koriste jače kiseline, poput limunske ili sukcinatne kiseline.⁴¹ Najveći nedostatak CGE-LIF metode u odnosu na UHPLC u analizi slobodnih glikana jesu još uvijek nedovoljno razvijene baze podataka te nemogućnost spajanja uređaja s masenim spektrometrom radi identifikacije samih struktura.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- mravlja kiselina (*Honeywell*)
- amonijev bikarbonat (*Sigma-Aldrich*)
- TRIS-hidroklorid (*PanReac AppliChem*)
- 2-pikolin boran (J&K)
- acetonitril (*VWR Chemicals*)
- anodni pufer za ABI3500 instrument (*Thermo Fisher Scientific*)
- POP-7 polimer za ABI3500 instrument (*Thermo Fisher Scientific*)
- natrijeva sol 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonske kiseline, APTS (*MiliporeSigma*)
- Bio-Gel P-10 (*Bio-Rad*)
- GelCode Blue Safe Protein Stain (*Thermo Fisher Scientific*)
- CIM® protein G pločica monolita (BIA Separation)
- dimetil-sulfoksid (*Sigma Aldrich*)
- Prestained Protein Ladder - Broad molecular weight (10-245 kDa) (*AbCam*),
- NuPAGE™ 4 to 12% Bis-Tris gelovi za SDS-PAGE (*Thermo Fisher Scientific*),
- etanol (*Carlo Erba*)
- HiDi formamid (*Thermo Fisher Scientific*,
- IgePal CA-630 (*Sigma-Aldrich*)
- kalijev dihidrogenfosfat (*Biochem*)
- kalijev klorid (*Gram Mol*)
- katodni pufer za ABI3500 instrument (*Thermo Fisher Scientific*)
- Melon Gel IgG Purification Kit (*Thermo Fisher Scientific*) koji sadrži: Melon Gel IgG Purification Support, 25mL gela koji se sastoji od 20% suspenzije ukupnog volumena 125 mL, Melon Gel Purification Buffer i Melon Gel Regenerant
- MES SDS Running buffer (*NuPAGE*),
- natrijev dodecilsulfat, SDS (*Roth*)

- natrijev hidrogenfosfat (*Biochem*)
- natrijev hidroksid (*Merck*)
- natrijev klorid (*Alkaloid Skopje*)
- PNGaza F (*Promega*)
- POP-7 polimer za ABI3500 instrument (*Thermo Fisher Scientific*)
- Protein G Agarose Fast-Flow Beads (*Merck*)
- trietilamin (*Sigma-Aldrich*)
- ultra-čista voda $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

3.1.2. Materijali

- 1 mL AcroPrep GHP 0,2 μm filtar pločica (*Pall*)
- 1 mL AcroPrep GHPwwPTFE, 0,45 μm pora, filtar pločica (*Pall*)
- 350 μL AcroPrep GHPwwPTFE, 0,2 μm pora, filtar pločica (*Pall*)
- adhezivne naljepnice (*Mettler Toledo*)
- 38 μm lakirana aluminijska termalna folija (*Porvair*)
- KimTech Science Delicate Task Wipes (*Kimberly Clark Professional*)
- mikropruvete (*Eppendorf*)
- nastavci za pipete (*Rainin*)
- nastavci za pipete s filterom (*Rainin*)
- Filtar pločica sa 96 jažica Oro-Flex I Polypropylene filter plate pločicaw/, 10 μm pora (*Orochem*)
- PCR pločice AB-1300 (*Thermo Scientific*)
- pločica monolita s proteinom G (*BIA Separations*)
- pločice za skupljanje uzoraka volumena 1 mL i 2 mL , (*Waters*)
- tubice različitih volumena (*Sarstedt*)

3.2. Instrumenti

- centrifuga Centrifuge 5804 (*Eppendorf*),
- Genetic Analyzer ABI3500 (*Applied Biosystems*)
- inkubator DNI 30 (37°C) (*MRC*),
- magnetska mješalica (*IKA RCT Basic*),
- MicroSealer uređaj za lijepljenje mikrofolije na pločice (*MicroSeal*),
- MiniSpin centrifuga CD 1008 (*Phoenix*),
- pećnica DNO 30 (65°C) (*MRC*),
- pH metar (*Mettler Toledo*),
- Pipet-Lite XLS automatske mikropipete jednokanalne i multikanalne raznih volumena (*Rainin*)
- spektrofotometar NanoDrop 8000 (*Thermo Fisher Scientific*),
- termomikser Thermomixer Comfort (*Eppendorf*),
- tresilica model 3023 (*GFL*),
- uređaj za vakuum filtraciju i vakuum pumpa (*Milipore*),
- uređaj za vorteksiranje Vortex-Genie2 (*Scientific Industries*),
- vakuum koncentrator SpeedVac SPD 210 (*Thermo Fisher Scientific*),
- Xcell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (*Thermo Fisher Scientific*),

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću Melon Gel-a

Postupak izolacije IgG-a pomoću Melon Gel-a proveden je pomoću *Melon Gel IgG Purification Kit*-a u kojemu se nalaze Melon Gel u obliku *slurry*-a, pufer za pročišćavanje te pufer za regeneraciju i u potpunosti je preuzet iz protokola proizvođača koji je dostupan na linku i opisan dalje u tekstu.⁴⁸ Za sve eksperimente korišten je *Spin Column* protokol. Kako bi se osigurala što veća čistoća izoliranog IgG-a, u eksperimentima su mijenjani početni volumeni plazme i to u rasponu od 2 do 100 μL te brzina centrifuge od $100\times g$ do $2000\times g$, a detalji su prikazani u poglavlju *Rezultati i rasprava*.

Prije izvođenja eksperimenta potrebno je pripremiti materijale, odnosno pufer za pročišćavanje otopiti u 950 mL ultra-čiste vode kako bi se dobila 100x razrijeđena otopina. Nakon pripreme pufer je potrebno čuvati u hladnjaku na temperaturi 4°C kao i Melon Gel. Prije svake upotrebe Melon Gel i pufer za pročišćavanje treba staviti na sobnu temperaturu te pripremiti 100 mL svježeg 1x pufera za pročišćavanje i prilagoditi pH otopine koji treba biti u rasponu 6,5-6,7 dodavanjem otopine 0.5M NaOH. Uzorke plazme u volumenu od 100 μL koji će se pročišćavati potrebno je razrijediti s 1x puferom za pročišćavanje u omjeru 1:10. Za potrebe eksperimenta korištene su pločice za skupljanje uzoraka od 2 mL i Orochem filter pločice. Pomoću širokih nastavaka za pipete u svaku jažicu Orochem filter pločice doda se 500 μL 20% suspenzije Melon Gel-a koju je prije upotrebe potrebno ručno miješati kružnim pokretima, kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela čestica. Nakon dodavanja Melon Gel-a pločica se centrifugira jednu minutu na $2000\times g$. Nakon centrifugiranja u svaku jažicu doda se 300 μL 1x pufera za pročišćavanje i kratko centrifugira. Postupak se ponovi ukupno dva puta i nakon toga filter pločica se stavi na novu pločicu za skupljanje uzoraka kako bi se u nju skupio eluat. Dodaju se razrijeđeni uzorci plazme, pločica se inkubira na tresilici pet minuta te centrifugira jednu minutu na $2000\times g$ kako bi se skupio eluat IgG-a. Izmjere se koncentracije IgG-a na spektrofotometru NanoDrop 8000 na valnoj duljini od 280 nm. Volumen od 15 μL IgG eluata prenosi se na čistu PCR pločicu, osuši se u vakuumskom koncentratoru i pohranjuje na -20°C do daljnje pripreme za analizu *N*-glikana CGE-LIF metodom.

3.3.2. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću protein G agaroznih zrnaca

Prvi korak ove izolacije je priprema suspenzije protein G agaroznih zrnaca koja se isporučuje kao 50% suspenzija dinamičkog kapaciteta vezanja od 20 µg IgG-a po 1 mL zrnaca. Ovisno o željenom konačnom volumenu samih zrnaca, u ovom slučaju 2, 5 i 10 µL, uzme se dvostruko veći volumen suspenzije po uzorku (4, 10 i 20 µL redom) za svaki uvjet, centrifugira se jednu minutu na 100×g te se odbaci supernatant. Potom se zrnca resuspendiraju u 1x PBS-u do konačnog volumena od 50 µL po uzorku i konačnog volumnog udjela od 0.02%, 0.1% i 0.2%, redom .

U svaku jažicu Orochem filter pločice doda se 50 µL pripremljene suspenzije protein G agaroznih zrnaca. Prije dodavanja suspenzije u jažice, potrebno je škarama odrezati vrh nastavka za pipetu i suspenziju resuspendirati prije svakog pipetiranja kako ne bi došlo do stvaranja taloga. Nakon nanošenja suspenzije u jažice, potrebno ih je isprati tri puta sa 200 µL 1xPBS-a na uređaju za vakuum filtraciju pomoću vakuum pumpe i zatim dobro obrisati dno pločice Kimwipes maramicama. Idući korak je dodavanje 100 µL 1xPBS-a i nanošenje tri standardna uzorka plazme u rasponu od 2 do 10 µL te inkubacija na tresilici jedan sat na otprilike 1000 okretaja/min.

Nakon inkubacije otopina se profiltrira na uređaju za vakuum filtraciju i uzorci se najprije isperu dodatkom 200 µL 1xPBS-a u tri navrata, a zatim još tri puta dodatkom 200 µL ultra-čiste vode. Filter pločica se nakon ispiranja obriše i postavi na 0,8 mL pločicu za skupljanje uzoraka u koju je prethodno dodano 17 µL 1 M amonijevog hidrogenkarbonata. U pločicu s uzorcima doda se 100 µL 100 mM mravlje kiseline i inkubira na tresilici pet minuta.

Nakon inkubacije IgG se eluira centrifugiranjem jednu minutu na 100×g i skupe se eluati te se izmjere koncentracije izoliranog IgG-a na NanoDrop 8000 uređaju. Volumen od 15 µL IgG eluata prenosi se na čistu PCR pločicu, osuši se u vakuumskom koncentratoru i pohranjuje na -20°C do daljnje pripreme za analizu N-glikana CGE-LIF metodom.

3.3.3. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću pločice monolita s proteinom G

Prvi korak je priprema uzoraka krvne plazme. Uzorci se vorteksiraju deset minuta na 3000 okretaja/min kako bi se odvojili lipidi od ostatka plazme. Tri standardna uzorka plazme u volumenu od 100 µL se razrijede dodatkom 700 µL 1xPBS i prenesu na čistu AcroPrep wwPTFE 0,45 µm filter pločicu volumena 1 mL pomoću nastavaka za pipete s filterom. Nakon

toga filtriraju se pomoću uređaja za vakuum filtraciju i vakuum pumpe, a filtrat se skuplja u pločice za skupljanje uzoraka volumena 2 mL te ostavi na tresilici sve do nanošenja na pločicu monolita s proteinom G.

Idući korak je priprema pločice monolita s proteinom G na uređaju za vakuum filtraciju pomoću vakuum pumpe. Najprije je potrebno odsisati pufer za skladištenje (20% EtOH u 20 mM TRIS + 0.1 M NaCl), a zatim isprati pločicu s 2 mL ultra-čiste vode i 2 mL 1x PBS-a kako bi se uklonile mehaničke nečistoće. Nakon toga pločica se ispiri sa 1 mL 0.1 M mravlje kiseline kako bi se uklonili zaostali vezani proteini od prethodnog korištenja pločice ukoliko ih ima. Pločica se zatim neutralizira sa 2 mL 10x PBS-a te dodatno ispere sa 4 mL 1x PBS-a i spremna je za nanošenje uzoraka.

Nakon pripreme uzoraka i pločice slijedi vezanje i ispiranje IgG-a. Uzorci se na pločicu monolita s proteinom G nanose pomoću nastavaka za pipete s filterom kako bi se spriječila kontaminacija pipete. Odsisana plazma se baci u infektivni otpad ili skuplja u pločice volumena 2 mL za daljnje analize preostalih proteina plazme. Uzorci se isperu tri puta dodatkom 2 mL 1x PBS-a kako bi se isprali oni proteini koji se nisu vezali za protein G na pločici.

Prije elucije IgG-a potrebno je dodati 170 μ L 1 M amonijevog hidrogenkarbonata u čistu pločicu za sakupljanje uzoraka volumena 2 mL. Pločica s puferom stavi se ispod pločice monolita s proteinom G na uređaju za vakuum filtraciju. Elucija IgG-a se provodi dodatkom 1 mL 0.1 M mravlje kiseline pri čemu u pločici za sakupljanje uzoraka dolazi do reakcije neutralizacije koju prati pojava mjehurića ugljikovog dioksida. Brza neutralizacija je neophodna kako bi se spriječila desijalinizacija glikana IgG-a radi niske pH vrijednosti mravlje kiseline.

Posljednji korak izolacije je regeneracija i skladištenje pločice monolita s proteinom G. Regeneracija se provodi na uređaju za vakuum filtraciju pri vakuumu od 17 inHg odsisavanjem pločice nakon dodatka svake otopine. Pločica se ispiri sa 2 mL 0.1 M mravlje kiseline kako bi se uklonio zaostali IgG vezan na protein G, neutralizira se dodatkom 2 mL 10xPBS-a i ispiri sa 4 mL 1xPBS-a. Kao posljednji korak pripreme za skladištenje pločica se ispiri dodatkom 1 mL pufera za skladištenje, a zatim se doda još jedan mililitar istog pufera koji se ostavi u jažici i pločica je spremna za čuvanje u hladnjaku na 4°C do sljedećeg korištenja.

Koncentracije IgG-a mjere se na spektrofotometru NanoDrop 8000. Volumen od 15 μ L IgG eluata prenosi se na čistu PCR pločicu, osuši se u vakuumskom koncentratoru i pohranjuje na -20°C do daljnje pripreme za analizu N-glikana CGE-LIF metodom.

3.3.4. SDS-PAGE

Elektroforeza je tehnika odijeljivanja proteina prema njihovoj veličini, a temelji se na činjenici da se nabijene molekule mogu kretati u električnom polju. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) je metoda u kojoj se proteini vrlo učinkovito i brzo odjeljuju na osnovu mase i omogućen je vrlo visoki stupanj razdvajanja. Smjesa proteina otopi se u otopini SDS-a koji služi kao anionski deterdžent te razara sve nekovalentne interakcije u proteinu i 2-merkaptetanola koji reducira disulfidne veze. Smjer kretanja proteina je odozgo prema dolje pri čemu mali proteini brzo prolaze kroz gel, a veliki ostaju na vrhu.⁴⁹

Za izvođenje ovog eksperimenta korišteni su NuPAGE Bis-Tris Mini gels, 4-12% sa devet ili dvanaest jažica, ovisno o broju uzoraka koji su nanošeni gel. Prvi korak je priprema uzoraka za gel koji se pripremaju u tubicama tako što se otpipetira potrebna određena količina uzorka, te ovisno o količini uzorka tako da količina IgG-a iznosi 5-10 µg i ovisno o volumenu uzorka dodaju se još reducirajući pufer i ultra-čista voda. Uzorci se kratko centrifugiraju te neposredno prije nanošenja na gel inkubiraju u termomikseru pet minuta na 95°C i ponovno centrifugiraju.

Instrument korišten za elektroforezu je Xcell SureLock Mini cell system. Prije postavljanja gelova u aparaturu potrebno je iz njih istresti organsko otapalo u kojemu se čuvaju, pažljivo izvaditi češljic iz jažica kako ne bi došlo do oštećenja i isprati ih ultra-čistom vodom. Nakon postavljanja gelova u aparaturu, u posudu s gelovima zatim se doda prethodno pripremljen separacijski pufer i njime se isperu jažice gelova.

Inkubirani uzorci se nakon ispiranja jažica na gel nanose pipetom pažljivo uz stijenku, a u prvu jažicu se nanosi marker molekulske mase. Kada su uzorci nanešeni, posuda sa gelovima se poklopi i priključi na električni napon od 200V. Elektroforeza se odvija 45 minuta.

Potom se gelovi ispiru ultra-čistom vodom na tresilici, tri puta po pet minuta. Poslije ispiranja vrpce se vizualiziraju Blue Safe Protein Stain bojom za gelove tako što se sat vremena ostave na tresilici, a zatim se odbojavaju ultra-čistom vodom tako što se ostave na tresilici preko noći.

3.3.5. *In solution deglikozilacija i APTS obilježavanje IgG-a za CGE-LIF analizu*

Denaturacija se provodi dodatkom 3 μL otopine 1.66x PBS-a uzorcima koji su prethodnim koracima bili osušeni te se resuspendiraju pipetiranjem kako bi se što bolje otopili. Nakon toga uzorcima se doda 4 μL 0.5% SDS-a i ponovno se dobro resuspendiraju. Na pločicu se zalijepi adhezivna naljepnica i uzorci se inkubiraju u pećnici 10 minuta na 65°C nakon čega se uzorcima doda 2 μL 4% Igepala. Otopina se resuspendira i pločica se ostavi na tresilici dok se pripremi otopina enzima. Dodatkom Igepala sprječava se denaturacija enzima u idućem koraku.

Sljedeći korak je priprema enzima i deglikozilacija. Enzimska smjesa priprema se u tubici miješanjem 1 μL 5xPBS-a i 0.12 μL enzima PNGaze F po uzorku, a prije upotrebe enzim je potrebno kratko centrifugirati. Svakom uzorku doda se 1 μL enzimske smjese i otopina se resuspendira pipetiranjem. Kada se svakom uzorku doda enzimska smjesa, pločica se termalno zatvori folijom i inkubira tri sata na 37°C. Nakon tri sata proces deglikozilacije je završen i uzorci se suše u vakuumskom koncentratoru sat vremena, a zatim se resuspendiraju u 2 μL ultra-čiste vode.

Otopina za obilježavanje pripremi se dodatkom 2 μL otopine 30 mM APTS (u 3,6 M limunskoj kiselini) i 2 μL otopine 1.2 M 2-pikolinborana (u DMSO) po uzorku. Nakon pripreme u svaki uzorak se otpipetiraju 4 μL APTS/PB otopine pažljivo uz stijenku bez dodirivanja uzorka. Dodirivanje dna jažica potrebno je izbjegavati kako bi se smanjilo taloženje IgG-a u prisutnosti limunske kiseline koja se nalazi u APTS-u i gubitka uzorka na vrhu pipete. Pločica se termalno zatvori folijom i vorteksira 10 sekundi nakon čega se inkubira točno 16 sati na 37°C.

3.3.6. HILIC-SPE čišćenje obilježenih *N*-glikana za CGE-LIF analizu

Nakon 16 sati inkubacije najprije je potrebno zaustaviti reakciju obilježavanja dodatkom 100 μL hladnog 80% ACN-a u svaku jažicu PCR pločice. PCR pločica može se čuvati maksimalno sat vremena na 4°C nakon dodatka ACN-a prije nego što se uzorci nanose na 0,2 μm AcroPrep wwPTFE filter pločicu volumena 350 μL koja sadržava Bio-Gel P-10.

Prije pripreme wwPTFE pločice potrebno je Bio-Gel P10 staviti na sobnu temperaturu i miješati ga na magnetnoj miješalici na niskoj brzini kako ne bi došlo do oštećenja čestica. Bio-Gel je hidrofilna stacionarna faza koja učinkovito veže hidrofilne *N*-glikane i omogućava uklanjanje hidrofobnih onečišćenja i soli. Na uređaj za vakuum filtraciju postavi se 0,2 μm AcroPrep wwPTFE filter pločicu volumena 350 μL i u svaku jažicu se otpipetira 200 μL Bio-Gel P-10 suspenzije automatskom pipetom i odsiše. Potom se svaka jažica ispere tri puta sa po 200 μL ultra-čiste vode i tri puta sa po 200 μL ACN-a.

Nakon pripreme filter pločice s Bio-Gelom P10, na pločicu se nanose uzorci u ukupnom volumenu od 106 μL (6 μL uzorka + 100 μL 80% ACN-a). Pločica se zatim inkubira pet minuta na tresilici na 450 okretaja/min i te se odsiše. Čišćenje glikana započinje dodatkom 200 μL otopine ACN/100 mM TEA (80/20/, v/v) u svaku jažicu filter pločice, inkubacijom od dvije minute na tresilici i odsisavanjem. Ovaj postupak ponovi se ukupno pet puta, a kod trećeg ispiranja uzorke je potrebno resuspendirati.

Sljedeći korak je dodatak 200 μL 80% ACN-a u svaku jažicu, inkubacija dvije minute i odsisavanje nakon svakog dodatka. Ovaj postupak ponovi se ukupno tri puta. Pločica se nakon ovoga kratko centrifugira, provjeri se ima li kapljica na dnu, po potrebi se obriše te se stavlja na pločicu za skupljanje uzoraka volumena od 1 mL u koju će se skupljati eluat.

Eluiranje *N*-glikana obilježenih APTS-om započinje dodatkom 100 μL ultra-čiste vode u svaku jažicu GHP pločice i inkubiranjem pet minuta na tresilici što omogućava bubrenje čestica gela kako bi mogao otpustiti vezane *N*-glikane. Nakon inkubacije slijedi odsisavanje kao i u svim sljedećim koracima. Ponovnim dodavanjem 200 μL ultra-čiste vode započinje eluiranje vezanih *N*-glikana, otopina se inkubira 5 minuta, odsiše i skuplja se prva frakcija eluata. Nakon toga, na isti način se skuplja i druga frakcija eluata. Ukupan volumen eluata trebao bi biti otprilike 450 μL i spreman je za CGE-LIF analizu, a pločica se može i termalno zatvoriti te pohraniti u zamrzivač za kasnije analize.

3.3.7. CGE-LIF analiza *N*-glikana i obrada podataka

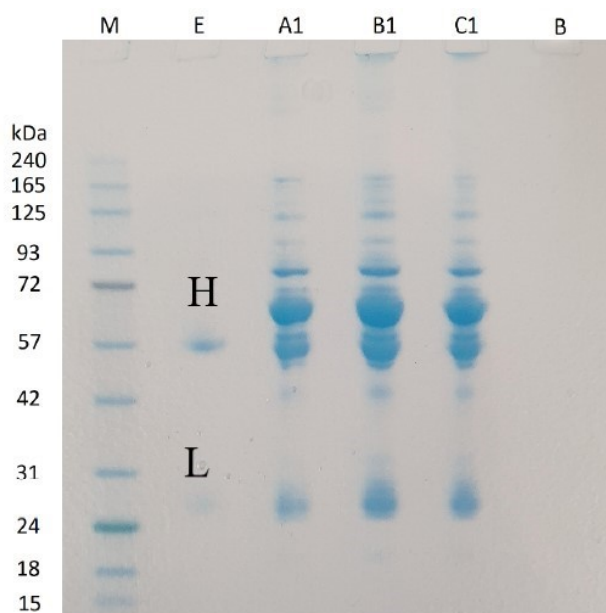
Analiza APTS-om obilježenih *N*-glikana IgG-a provodi se CGE-LIF metodom na DNA sekvenceru (ABI3500) opremljenim sa osam kapilara duljine 50 cm i punjenima POP-7 polimerom. Oba kraja kapilare umočena su u pufer i kapilare zatvaraju strujni krug, a razlika električnog potencijala iznosi 15kV. Vrijeme elektrokinetičkog injektiranja uzoraka iznosi devet sekundi, temperatura pećnice je 60°C, a vrijeme potrebno za analizu jednog uzorka je 1000 sekundi. Za analizu se uzima volumen od 2 µL APTS-om obilježenih *N*-glikana, te se otope u HiDi formamidu do ukupnog volumena 10 µL. Uređaj se kontrolira Data Collection 1 računalnim programom (Thermo-Fisher Scientific, SAD), dok se daljnja obrada dobivenih elektroferograma vrši u računalnom programu Empower 3 (Waters Corp., SAD). Osnovna statistička analiza rezultata napravljena je u Microsoft Office Excel programu.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću Melon Gel-a i protein G agaroznih zrnaca

4.1.1. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 01

Prva izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a provedena je prema svim uputama koje su navedene u protoklu dobivenom od proizvođača, kako bi se testirali navodi u kojima stoji da je 100 μL istaloženog gela dostatno za pročišćavanje IgG-a iz 100 μL plazme. Stoga je korišten volumen suspenzije Melon Gel-a od 500 μL (koji odgovara 100 μL istaloženog gela) i nanošeno je 100 μL standardnog uzoraka plazme u triplicatu, a eluiranje IgG-a centrifugiranjem trajalo je jednu minutu na $2000\times g$ (proizvođač sugerira brzinu centrifugiranja od 2000 do $6000\times g$). Nakon izolacije čistoća eluata ispitana je SDS-PAGE metodom u reducirajućim uvjetima, a nanosena količina uzorka po jažicama odgovara količini od 10 μg proteina (Slika 9).



Slika 9. SDS-PAGE gel (eksperiment 01); M - marker molekulske mase; E – standardni IgG eluat, teški lanac oko 50kDa (H) i laki lanac oko 25 kDa (L); A1, B1 i C1 – eluati dobiveni pročišćavanjem 100 μL plazme na 500 μL Melon Gel suspenzije; B – blank

Na slici gela u usporedbi sa standardnim IgG eluatom dobivenim izolacijom na protein G pločici monolita (nedovoljna količina nanijeta na gel) i uzorcima plazme A1, B1 i C1 korištenih za pročišćavanje IgG-a pomoću Melon Gel-a i po preporuci proizvođača, vidljivo je da iz uzoraka plazme nije pročišćen samo IgG nego su prisutni i drugi proteini, a moguće je da se radi o imunoglobulinu IgA koji u reduktivnim uvjetima daje dvije vrpce na otprilike 60 kDa i 25 kDa, IgM koji daje vrpce na 75 kDa i 23 kDa, albuminu čija očekivana molekulska masa iznosi 66 kDa, a moguće je da se pojavljuje i transferin čija je očekivana molekulska masa oko 80 kDa. Kontaminaciju prikupljenog IgG-a imunoglobulinima IgA i IgM zapazili su Lopez i sur., 2019.³ Stoga se može zaključiti da je 100 μ L krvne plazme, prema preporuci proizvođača, količina koja sadrži previše proteina plazme koji se pritom ne mogu uspješno vezati za gel te eluat osim IgG-a, sadrži i druge proteine plazme u velikom broju. Potrebno je pronaći adekvatni početni volumen krvne plazme.

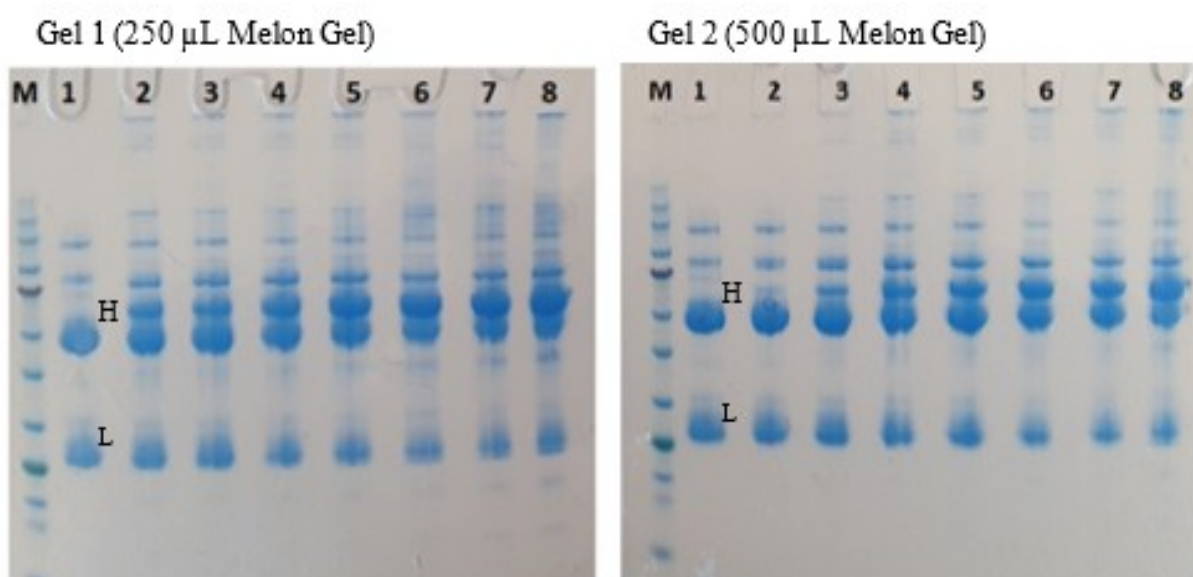
4.1.2. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 02

Druga izolacija pomoću Melon Gel-a provedena je s različitim volumenima plazme i različitim volumenima Melon Gel-a, kako bi se ispitao utjecaj početnog volumena plazme i volumena Melon Gel suspenzije koja daje što čišći eluat IgG-a. Volumeni Melon Gel suspenzije bili su 250 μ L i 500 μ L, a volumeni plazme 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L i 100 μ L, a svaki od uvjeta napravljen je u tehničkim duplikatima (Tablica 1) Osim navedene promjene volumena, i dalje je praćen protokol proizvođača.

Tablica 1. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici za izolaciju IgG-a pomoću Melon Gel-a, uzorci plazme nanoseni su u duplikatima i to u volumenima od 10, 25, 50 i 100 μL na 250 μL i 500 μL Melon Gel suspenzije.

A		10ul_plazma/250ul_MG_1	10ul_plazma/500ul_MG_1
B		10ul_plazma/250ul_MG_2	10ul_plazma/500ul_MG_2
C		25ul_plazma/250ul_MG_1	25ul_plazma/500ul_MG_1
D		25ul_plazma/250ul_MG_2	25ul_plazma/500ul_MG_2
E		50ul_plazma/250ul_MG_1	50ul_plazma/500ul_MG_1
F		50ul_plazma/250ul_MG_2	50ul_plazma/500ul_MG_2
G		100ul_plazma/250ul_MG_1	100ul_plazma/500ul_MG_1

Nakon izolacije proveden je SDS-PAGE na dva gela kako bi se ispitala čistoća eluata, a nanosena količina uzorka u jažicama odgovara količini od 10 μg proteina. Na jedan su stavljeni eluati uzoraka plazme nanosenih na 250 μL Melon Gel-a, a na drugi oni nanoseni na 500 μL Melon Gel-a. (Slika 10)



Slika 10. SDS-PAGE gelovi (eksperiment 02); M - marker molekulske mase; 1-standardni IgG eluat; 2,3 – 10 μL plazme; 4,5 -25 μL plazme; 6,7 – 50 μL plazme; 8 - 100 μL plazme

Iz Slike 10 promatrajući „Gel 1“ može se iščitati da u odnosu na standardni IgG eluat, niti jedan uvjet uz 250 μL Melon Gel suspenzije ne daje zadovoljavajuću čistoću eluata te da se s porastom početnog volumena krvne plazme smanjuje razina IgG-a u eluatu, a raste razina

kontaminacije drugim plazmatskim proteinima poput albumina. S druge strane, koristeći 500 μL Melon Gel-a, smanjila se razina kontaminacije drugim plazmatskim proteina iako se također povećava s povećanjem početnog volumena plazme što znači da količina Melon Gel suspenzije ima značajnu ulogu u pročišćavanju odnosno izolaciji IgG-a.

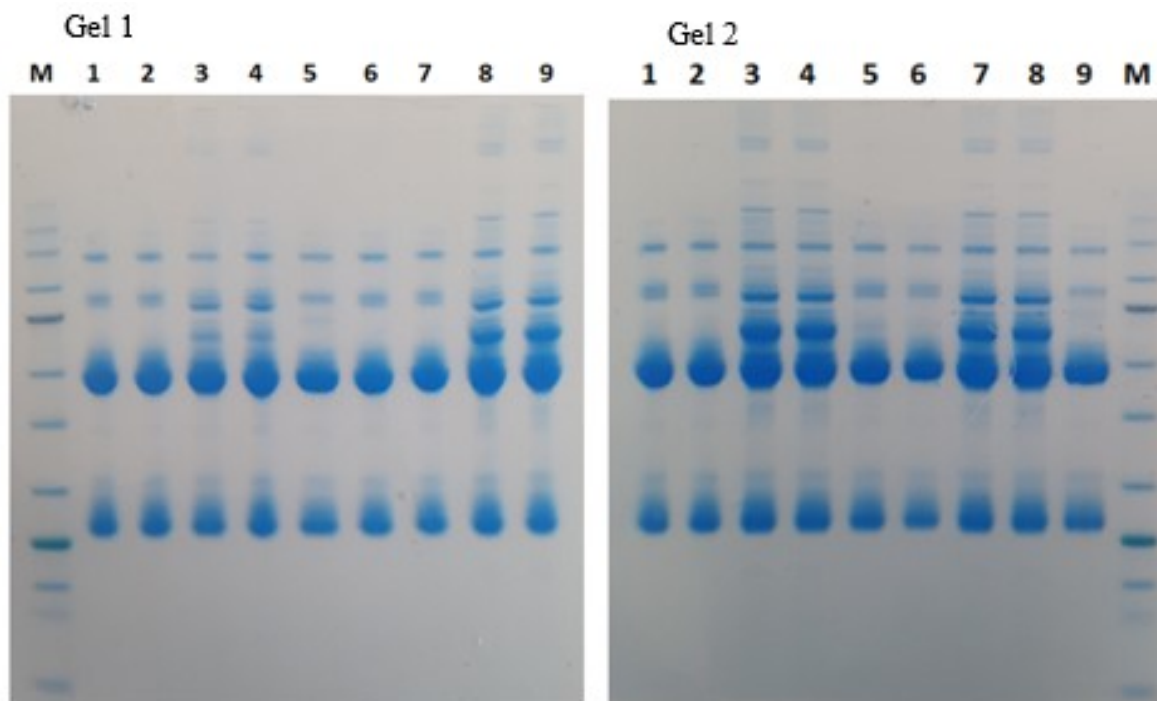
Najbolji rezultati pokazali su se koristeći 10 μL plazme pročišćene na 500 μL Melon Gel suspenzije (Gel 2, vrpca 2 i 3) odnosno čistoća eluata najbliža je onoj standardnog IgG eluata. Stoga je za daljnje eksperimente odlučeno koristiti 500 μL Melon Gel suspenzije, te testirati volumene plazme do 10 μL i različite brzine centrifugiranja.

4.1.3. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 03

U ovom eksperimentu ispitan je utjecaj brzine centrifuge na izolaciju IgG-a pomoću Melon Gel-a te je korišten početni volumen plazme od 10 μL koji je u prethodnom eksperimentu dao najbolje rezultate i volumen od 25 μL kako bi se ispitalo da li se s tim volumenom već počinju eluirati i ostali proteini plazme. Eluat je prikupljen centrifugiranjem 5 minuta na $150\times g$ ili po jednu minutu na 500, 1000 i $2000\times g$, a svaki uvjet testiran je je u duplikatu (Tablica 2). Čistoća je također ispitana SDS-PAGE metodom u reduktivnim uvjetima, a nanescena količina uzorka u jažicama odgovara količini od 9 do 15 μg proteina.

Tablica 2. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici za izolaciju IgG-a pomoću Melon Gel-a te brzine i trajanja centrifuge tijekom izolacije, uzorci plazme nanesceni su u duplikatima u volumenima od 10 i 25 μL na 500 μL Melon Gel suspenzije.

A	10ul_plazma/500ul_MG_1	10ul_plazma/500ul_MG_1	10ul_plazma/500ul_MG_1	10ul_plazma/500ul_MG_1
B	10ul_plazma/500ul_MG_2	10ul_plazma/500ul_MG_2	10ul_plazma/500ul_MG_2	10ul_plazma/500ul_MG_2
C	25ul_plazma/500ul_MG_1	25ul_plazma/500ul_MG_1	25ul_plazma/500ul_MG_1	25ul_plazma/500ul_MG_1
D	25ul_plazma/500ul_MG_2	25ul_plazma/500ul_MG_2	25ul_plazma/500ul_MG_2	25ul_plazma/500ul_MG_2
E				
F				
G				
H				
	Elucija 150×g, 5 min	Elucija 500×g, 1 min	Elucija 1000×g, 1 min	Elucija 2000×g, 1 min



Slika 11. SDS-PAGE gelovi (eksperiment 03); M - marker molekulske mase; jažice redom: **GEL 1:** 1, 2 – 10 μL plazme; 3,4 – 25 μL , sve eluirano na $150\times\text{g}$ 5min; 5 – standardni IgG eluat; 6,7 – 10 μL plazme; 8,9 – 25 μL plazme, eluirano na $500\times\text{g}$ 1min; **GEL 2:** 1,2 – 10 μL plazme; 3,4 – 25 μL , sve eluirano na $1000\times\text{g}$ 1min; 5,6 – 10 μL plazme; 7,8 – 25 μL plazme, eluirano na $2000\times\text{g}$ 1min; 9 – standardni IgG eluat.

Na Slici 11 na oba gela može se primijetiti da svi uzorci u kojima je korišteno 10 μL plazme izgledaju usporedivo sa standardnim IgG eluatom (Gel 1, vrpca 5 i Gel 2, vrpca 9), a najbolje rezultate daje uvjet u kojima se eluiranje odvija centrifugiranjem 5 min na $150\times\text{g}$ i 1 min na $500\times\text{g}$ (Gel 1, vrpce 1, 2, 6 i 7; Gel 2, vrpce 1, 2, 5 i 6). Pri tim uvjetima 25 μL plazme ne daje zadovoljavajuće rezultate kao ni povećanje brzine centrifugiranja na 1000 i $2000\times\text{g}$, gdje su najizraženije vrpce koje najvjerojatnije pripadaju imunoglobulinima IgA, IgM ili albuminu. Na većoj brzini centrifuge izmjerena koncentracija IgG-a na UV-VIS spektrofotometru pokazuje veće vrijednosti, no one vjerojatno proizlaze zbog povećane kontaminacije drugim plazmatskim proteinima. Stoga je dalje odlučeno testirati početne volumene plazme do 10 μL i to na tri biološka standarda plazme kako bi se utvrdilo je li pročišćavanje IgG-a učinkovito bez obzira na različite koncentracije IgG-a unutar svakog s obzirom da znamo da se u krvnoj plazmi zdravog čovjeka one kreću od 7-18 g/L ²³.

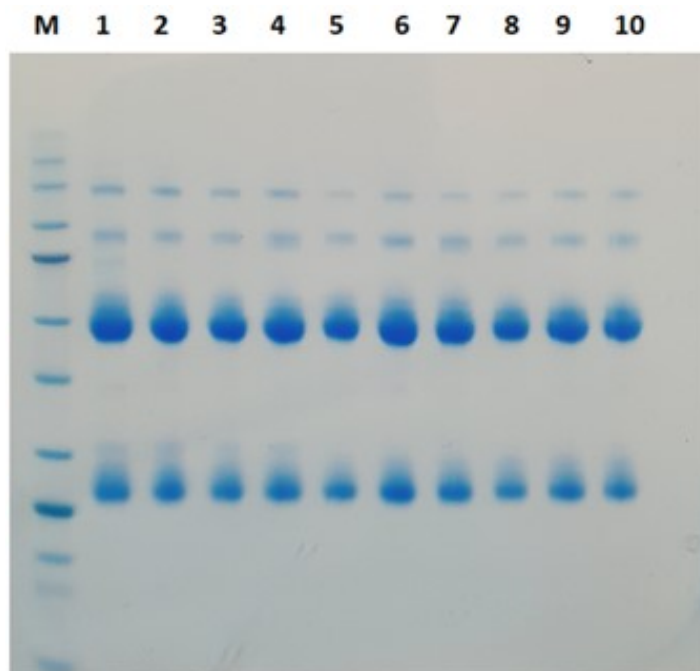
4.1.4. Izolacija IgG-a pomoću Melon Gel-a – eksperiment 04

Sljedeći test uključivao je izolaciju IgG-a koristeći 500 μ L Melon Gel suspenzije i tri različita biološka uzorka odnosno standarda, pri čemu su korišteni volumeni od 2, 5 i 10 μ L u duplikatima (Tablica 3). Sakupljanje IgG-a odradilo se centrifugiranjem 5 minuta na 150 \times g, no pokazalo se da to nije dovoljno da „iscijedi“ Melon gel u potpunosti pa su uzorci centrifugirani još dodatno minutu na 500 \times g kako bi se skupio sav pročišćeni IgG.

Tablica 3. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici za izolaciju IgG-a pomoću Melon gela, uzorci plazme nanošeni su u duplikatima u volumenima od 2, 5 i 10 μ L plazme na 500 μ L Melon Gel suspenzije

A	2ul_stand_1	2ul_stand_2	2ul_stand_3
B	2ul_stand_1	2ul_stand_2	2ul_stand_3
C	5ul_stand_1	5ul_stand_2	5ul_stand_3
D	5ul_stand_1	5ul_stand_2	5ul_stand_3
E	10ul_stand_1	10ul_stand_2	10ul_stand_3
F	10ul_stand_1	10ul_stand_2	10ul_stand_3

Čistoća izoliranog IgG-a ispitana je SDS-PAGE metodom, a nanesena količina uzorka u jažicama odgovara količini od 5 μ g proteina (Slika 12).



Slika 12. SDS-PAGE gel (eksperiment 04); M - marker molekulske mase; jažice redom: 1 – standardni IgG eluat; 2, 3, 4 – 2, 5 i 10 μL standarda 1; 5, 6, 7 – 2, 5 i 10 μL standarda 2; 8, 9, 10 – 2, 5 i 10 μL standarda 3

Na slici 12 može se iščitati da su svi uvjeti dali pročišćeni IgG usporediv sa standardnim IgG eluatom (vrpca 1), te da nemaju slabo vidljivu vrpca koja se nalazi u standardu IgG eluata na poziciji od 72 kDa, što bi moglo ukazivati na veću čistoću IgG-a izoliranog Melon Gel metodom u odnosu na standardni IgG izoliran Proteinom G vezanim na pločicu monolita. Ovi uvjeti predstavljaju temelj za daljnju glikansku analizu te će se koristiti za daljnju usporedbu *N*-glikanskih profila IgG-a pripremljenih u više tehničkih replikata.

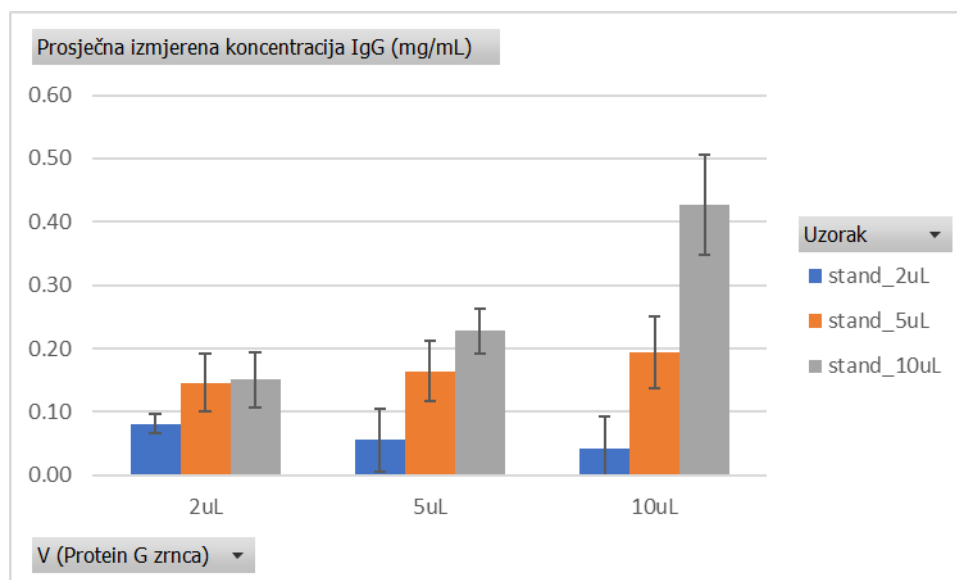
4.1.5. Izolacija IgG-a pomoću protein G agaroznih zrnaca

Za potrebe ovog eksperimenta ispitan je odnos početnog volumena jednog standardnog uzorka plazme koji je iznosio 2, 5 i 10 μL i volumena istaloženih protein G agaroznih zrnaca koji je također bio 2, 5 i 10 μL , sve kako bi se odredili optimalni uvjeti koji omogućuju pročišćavanje IgG-a zadovoljavajuće čistoće i što veće konačne koncentracije. Svaki uvjet pripremljen je u triplikatu. (Tablica 4)

Tablica 4. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici za izolaciju IgG-a pomoću protein G agaroznih zrnaca.

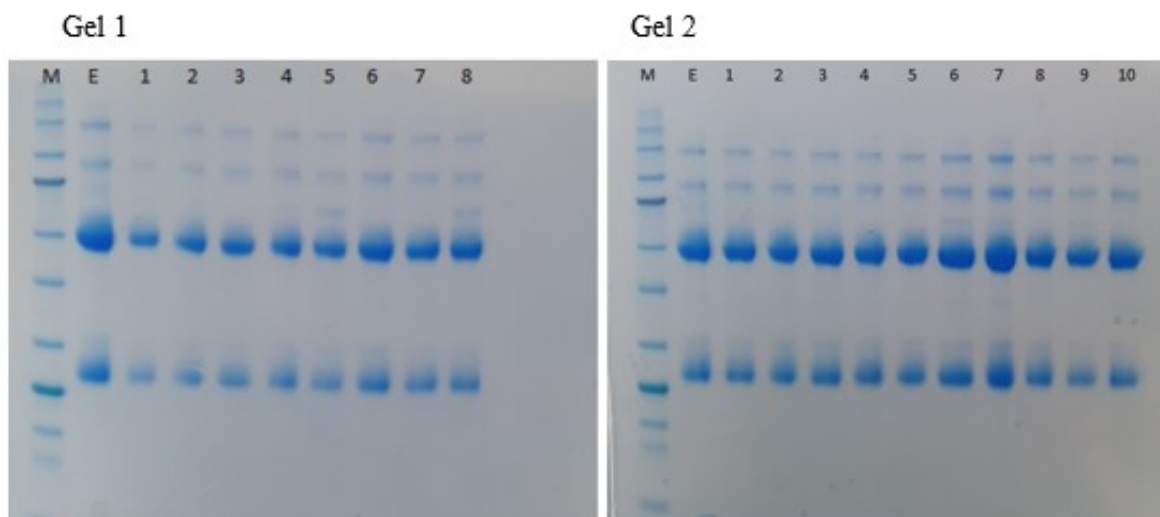
A	2ul_PG_2ul_stand_1_1	2ul_PG_2ul_stand_1_2	2ul_PG_2ul_stand_1_3
B	5ul_PG_2ul_stand_1_1	5ul_PG_2ul_stand_1_2	5ul_PG_2ul_stand_1_3
C	10ul_PG_2ul_stand_1_1	10ul_PG_2ul_stand_1_2	10ul_PG_2ul_stand_1_3
D	2ul_PG_5ul_stand_1_1	2ul_PG_5ul_stand_1_2	2ul_PG_5ul_stand_1_3
E	5ul_PG_5ul_stand_1_1	5ul_PG_5ul_stand_1_2	5ul_PG_5ul_stand_1_3
F	10ul_PG_5ul_stand_1_1	10ul_PG_5ul_stand_1_2	10ul_PG_5ul_stand_1_3
G	2ul_PG_10ul_stand_1_1	2ul_PG_10ul_stand_1_2	2ul_PG_10ul_stand_1_3
H	5ul_PG_10ul_stand_1_1	5ul_PG_10ul_stand_1_2	5ul_PG_10ul_stand_1_3
I	10ul_PG_10ul_stand_1_1	10ul_PG_10ul_stand_1_2	10ul_PG_10ul_stand_1_3

Nakon pročišćavanja analiziranim uzorcima izmjerena je koncentracija (Slika 13) te je pripremljen SDS-PAGE, gdje se količina proteina kretala od 1 do 5 μg proteina zbog neujednačenih koncentracija nakon izolacije.



Slika 13. Prikaz odnosa konačne koncentracije izoliranog IgG-a protein G agaroznim zrcima u odnosu na početni volumen standardnog uzorka plazme i volumena istaloženih zrnaca. Vrh stupca označava srednju vrijednost izmjerene koncentracije, a okomite linije pripadajuću standardnu devijaciju.

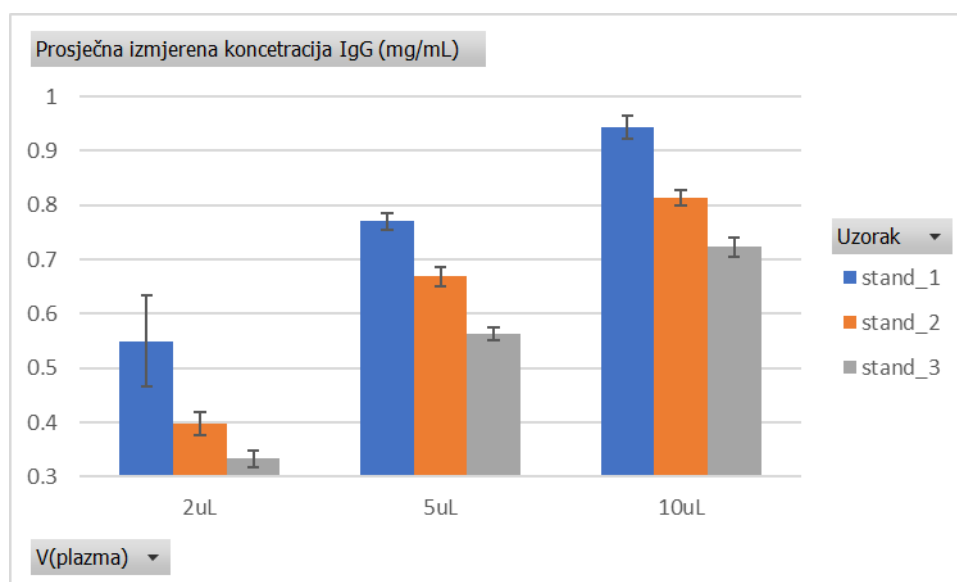
Promatrajući sliku 13 možemo iščitati da 2 μ L istaloženih protein G agaroznih zrnaca nije prikladno za izolaciju IgG-a iz plazme za sva tri početna volumena, odnosno možemo vidjeti da se povećanjem volumena plazme ne povećava koncentracija izoliranog IgG-a što ukazuje na zasićenje zrnaca. Pokazalo se da je količina od 10 μ L istaloženih zrnaca prikladna za izolaciju IgG-a na što ukazuje činjenica da je vidljiv gotov linearan porast koncentracije IgG-a s povećanjem početnog volumena plazme te da je na slici 14 čistoća usporediva s čistoćom standardnog IgG eluata (Gel 2, vrpce 5-10). Stoga će 10 μ L istaloženih zrnaca biti korišteno za potrebe *N*-glikanske analize IgG-a.



Slika 14. Slike gelova nakon provedene elektroforeze; M-marker molekulske mase, E-standardni IgG eluat; jažice redom: **Gel 1:** 1,2 – 2 μ L standarda 1 i 2 na 2 μ L zrnaca; 3,4 – 5 μ L standarda 2 i 3 na 2 μ L zrnaca; 5,6 – 10 μ L standarda 2 i 3 na 2 μ L zrnaca; 7,8 – 2 μ L standarda 1 i 2 na 5 μ L zrnaca; **Gel 2:** 1,2 - 5 μ L standarda 1 i 3 na 5 μ L zrnaca; 3,4 - 10 μ L standarda 1 i 3 na 5 μ L zrnaca; 5,6 - 2 μ L standarda 1 i 2 na 10 μ L zrnaca; 7,8 - 5 μ L standarda 1 i 3 na 10 μ L zrnaca; 9,10 – 10 μ L standarda 1 i 2 na 10 μ L zrnaca.

4.2. Izolacija IgG-a za potrebe CGE-LIF analize i rezultati analize

Nakon što su utvrđeni optimalni uvjeti izolacije IgG-a iz krvne plazme pomoću Melon Gel-a, za potrebe CGE-LIF analize korištena su tri ista biološka standarda u volumenima od 2, 5 i 10 μL (Tablica 5) uz 500 μL Melon Gel suspenzije, a IgG je u konačnici izoliran centrifugiranjem jednu minutu na $500\times g$ kako bi se istisnuo sav gel. Izmjerene su koncentracije izoliranog IgG-a (Slika 15). Porast srednjih vrijednosti koncentracija izoliranog IgG-a gotovo linearno ovisi o početnom volumenu uzorka plazme. Početni volumen od 5 i 10 μL plazme daju gotovo u potpunosti podudarne koncentracije izoliranog IgG-a između replikata što ukazuje na nisku varijabilnost ove metode izolacije IgG-a

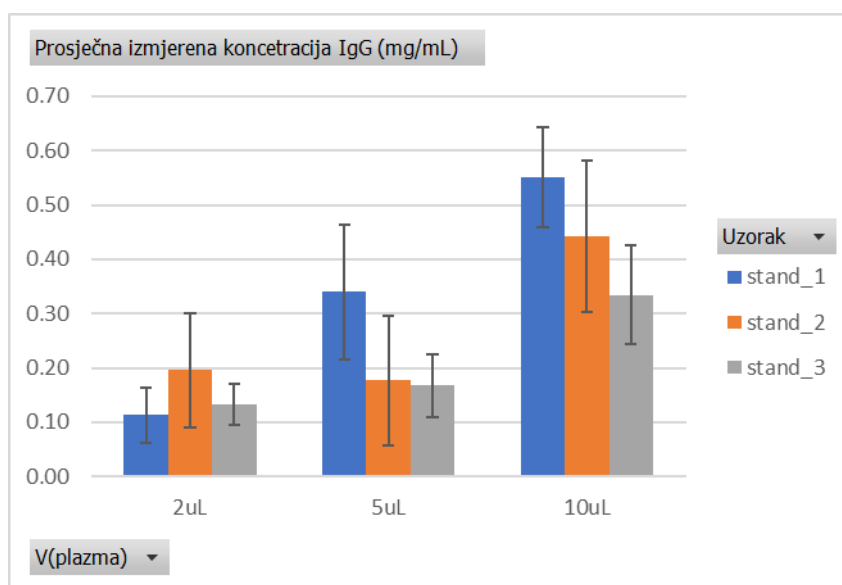


Slika 15. Prikaz odnosa konačne koncentracije izoliranog IgG-a pomoću Melon Gel-a u odnosu na početni volumen standardnog uzorka plazme i volumena Melon Gel suspenzije. Vrh stupca označava srednju vrijednost izmjerene koncentracije, a okomite linije pripadajuću standardnu devijaciju.

Tablica 5. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici za izolaciju IgG-a pomoću Melon gela i protein G agaroznih zrnaca

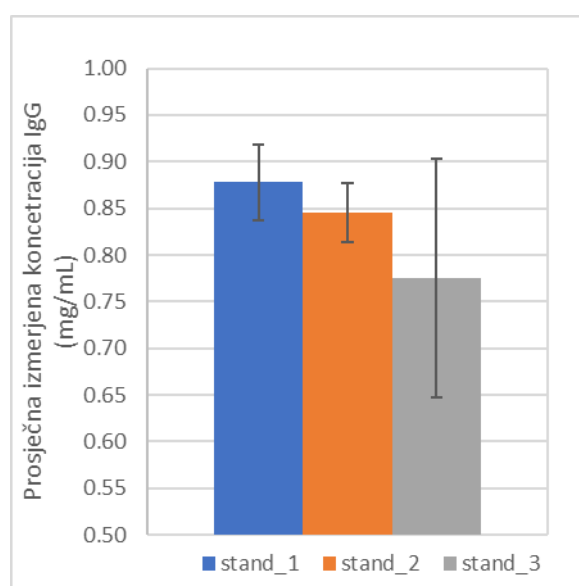
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	stand_1_2ul_1	stand_1_5ul_1	stand_1_10ul_1	stand_2_2ul_1	stand_2_5ul_1	stand_2_10ul_1	stand_3_2ul_1	stand_3_5ul_1	stand_3_10ul_1
B	stand_1_2ul_2	stand_1_5ul_2	stand_1_10ul_2	stand_2_2ul_2	stand_2_5ul_2	stand_2_10ul_2	stand_3_2ul_2	stand_3_5ul_2	stand_3_10ul_2
C	stand_1_2ul_3	stand_1_5ul_3	stand_1_10ul_3	stand_2_2ul_3	stand_2_5ul_3	stand_2_10ul_3	stand_3_2ul_3	stand_3_5ul_3	stand_3_10ul_3
D	stand_1_2ul_4	stand_1_5ul_4	stand_1_10ul_4	stand_2_2ul_4	stand_2_5ul_4	stand_2_10ul_4	stand_3_2ul_4	stand_3_5ul_4	stand_3_10ul_4
E	stand_1_2ul_5	stand_1_5ul_5	stand_1_10ul_5	stand_2_2ul_5	stand_2_5ul_5	stand_2_10ul_5	stand_3_2ul_5	stand_3_5ul_5	stand_3_10ul_5
F	stand_1_2ul_6	stand_1_5ul_6	stand_1_10ul_6	stand_2_2ul_6	stand_2_5ul_6	stand_2_10ul_6	stand_3_2ul_6	stand_3_5ul_6	stand_3_10ul_6
G	stand_1_2ul_7	stand_1_5ul_7	stand_1_10ul_7	stand_2_2ul_7	stand_2_5ul_7	stand_2_10ul_7	stand_3_2ul_7	stand_3_5ul_7	stand_3_10ul_7
H	stand_1_2ul_8	stand_1_5ul_8	stand_1_10ul_8	stand_2_2ul_8	stand_2_5ul_8	stand_2_10ul_8	stand_3_2ul_8	stand_3_5ul_8	stand_3_10ul_8

Za usporedbu rezultata identični su uzorci, također u osam replikata po uvjetu, korišteni i za izolaciju IgG-a na 10 μ L istaloženih protein G agaroznih zrnaca, a korišteni su isti volumeni plazme kao u prethodnom slučaju (Tablica 5). Izmjerena koncentracija IgG prikazana je na slici 16 te se može primijetiti da porast konačne koncentracije IgG-a ne prati linearno u svim slučajevima i porast početnog volumena uzorka, te da je varijabilnost izmjerene koncentracije veća u odnosu na Melon Gel. Nadalje, uz korištenje istih početnih volumena krvne plazme radi izolacije IgG-a, uz Melon Gel moguće je postići gotovo dvostruko veću konačnu koncentraciju pročišćenog IgG-a.



Slika 16. Prikaz odnosa konačne koncentracije izoliranog IgG-a pomoću protein G agaroznih zrnaca u odnosu na početni volumen standardnog uzorka plazme i volumena istaloženih zrnaca. Vrh stupca označava srednju vrijednost izmjerene koncentracije, a okomite linije pripadajuću standardnu devijaciju.

Također, provedena je i izolacija na pločici monolita s vezanim proteinom G koja se u ovom slučaju smatra standardnom metodom izolacije s kojom se uspoređuju prethodne dvije, a široko je rasprostranjena za ispitivanje glikozilacije IgG-a u području glikomike.^{50,51} Također su korištena tri standardna biološka uzorka, svaki u osam replikata i u volumenu od 100 μ L. Prosječna koncentracija izoliranog IgG-a svakog od tri standarda prikazana je na slici 17. Važno je napomenuti da iako se zbog veće standardne devijacije varijabilnost čini većom nego kod ostalih metoda, radi se o pločicama monolita koje se za izolaciju IgG-a različitih uzoraka mogu opetovano koristiti više od 50 puta bez utjecaja na konačnu čistoću proteina.

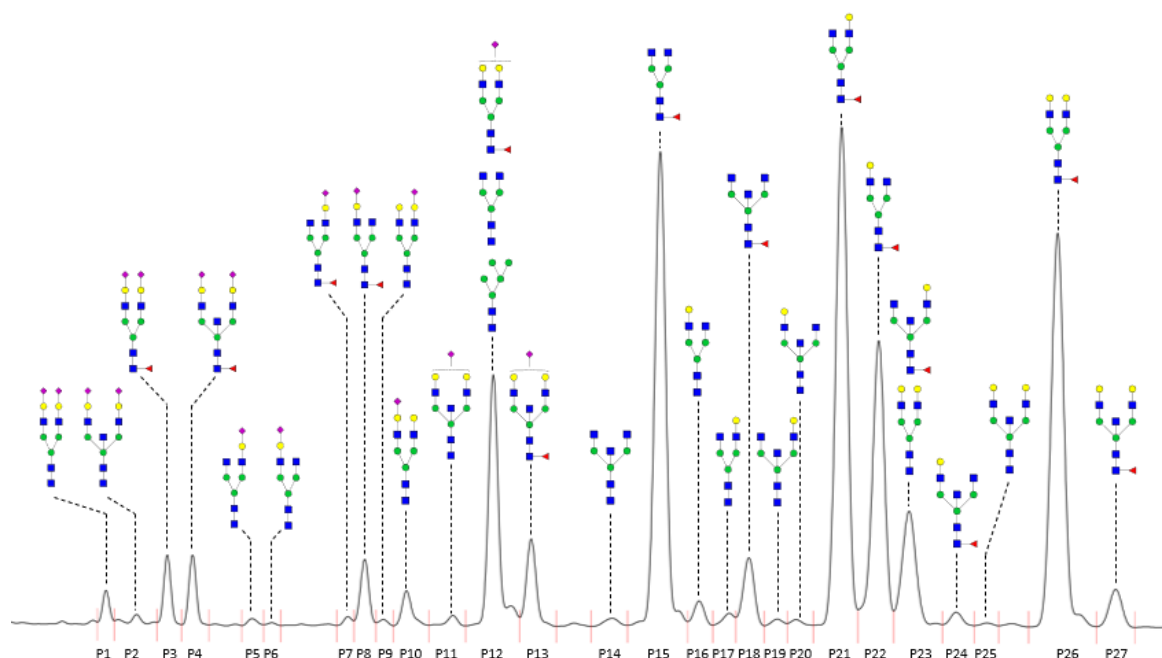


Slika 17. Prikaz izmjerene koncentracije IgG nakon izolacije pomoću protein G pločice monolita za tri biološka standarda. Točke označavaju srednju vrijednost izmjerene koncentracije, a okomite linije pripadajuću standardnu devijaciju.

Dobivene koncentracije gotovo su istovjetne onima dobivenima izolacijom iz 10 μ l plazme pomoću Melon Gela iako je tada korišteno deset puta manje početnog materijala (Slika 15).

Uzorci su analizirani CGE-LIF analizom i dobiveni elektroferogrami su podijeljeni su na 27 vršaka (od P1 do P27, Slika 18.), a relativni udio pojedine glikanske strukture izražen je kao postotak površine izračunat dijeljenjem površine pojedinog vrška sa zbrojem površina svih integriranih vršaka. Pojedinom vršku pridružene su strukture prema Huffman i sur., 2014.³⁹ Prosječna masa IgG-a osušena za CGE-LIF analizu u 15 μ L uzoraka, kako bi se osigurala ista količina soli u svakom uzorku nakon izolacije, za Melon Gel iznosila je od 5 do 14,2 μ g, za protein G agarozna zrnca od 1,7 do 8,3 μ g, a za pločicu monolita s proteinom G od 11,6 do 13,2

µg. Radi međusobne usporedbe, za svaki uvjet i pripadajuće replikate izračunata je srednja vrijednost postotka površine vrška (A), standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije izražen u postocima (CV, engl. *Coefficient of variation*).



Slika 18. Reprezentativan elektroferogram N-glikoma IgG-a dobiven CGE-LIF metodom podijeljen na 27 vršaka, a svakom vršku pridružena je najzastupljenija glikanska struktura.

Svi pripremljeni uzorci uspješno su analizirani CGE-LIF metodom što ponovno govori u prilog njezinoj izrazitoj osjetljivosti s obzirom da je i najmanja osušena količina IgG-a od 1,7 µg bila dostatna za dobivanje zadovoljavajućeg elektroferograma. U ovom diplomskom radu izolaciju IgG-a na protein G pločici monolita za potrebe glikomske analize smatra se „zlatnim standardom“ zbog svoje široke rasprostranjenosti u području glikomike. Na slikama 19, 20 i 21 možemo vidjeti da su srednje vrijednosti postotka površine usporedive između svih metoda izolacije, iako se početni volumen plazme uvelike razlikovao u odnosu na protein G pločicu monolita. Kada se uspoređuju postoci površine gledajući pojedinu metodu izolacije, Melon Gel i protein G agarozna zrnca pokazuju suprotan trend s porastom početnog volumena plazme. Na primjeru vrška P21 (struktura FA2G1[6]), kod protein G zrnca postotak površine raste s povećanjem početnog volumena plazme, a opada kod Melon Gela. Važno je primijetiti vršak P1 odnosno strukturu A2G2S2, koja je najzastupljenija struktura glikoma krvne plazme, da se postotak površine izrazito smanjio kod izolacije Melon Gel metodom ukoliko je početni

volumen plazme 2 ili 5 μg u usporedbi sa protein G pločicom monolita i protein G agaroznim zrcima. Na primjeru Standarda 1 zastupljenost te strukture nakon izolacije protein G pločicom monolita iznosi 0,62%, a nakon Melon Gel-a 0,17% kod početnog volumena plazme od 2 μL te 0,23% kod volumena plazme od 5 μL što može ukazivati na smanjeno onečišćenje drugim plazmatskim proteinima.⁵² Detaljan pregled dan je u Tablicama 6, 7 i 8, a što se tiče ponovljivosti (izražene kroz koeficijent varijacije) cjelokupne metode pripreme koje su uključivale pojedinu metodu izolacije, srednji koeficijent varijacije (CV_{av}) za tri standarda kretao se od 3,7-5,4%, a za vrške čija je zastupljenost veća od 1% u N-glikomu IgG-a, taj je broj iznosio oko 2%. Za vrške manje od 1% taj je broj bio nešto veći i iznosio je do 7,9%. Melon Gel pokazao se podjednako uspješnim te je za sve početne volumene plazme koji su ulazili u izolaciju i bez obzira na samu prirodu bioloških uzoraka odnosno standarda, srednji koeficijent varijacije iznosio oko 5%. Za vrške relativne zastupljenosti više od 1% CV_{av} iznosio je oko 2%.

Uz sve navedeno, ukoliko se pristupa izolaciji IgG-a Melon Gel metodom, optimalno je osigurati 5 μL krvne plazme (u nedostatku može i manje), 500 μL Melon Gel suspenzije i brzinu centrifugiranja od 500 \times g jednu minutu kako bi se pročistio IgG zadovoljavajuće koncentracije, visoke čistoće i smanjene zastupljenosti glikoformi s A2G2S2 strukturom bez obzira na prirodu biološkog uzorka te u konačnici dobili vjerodostojni rezultati N-glikanske analize.

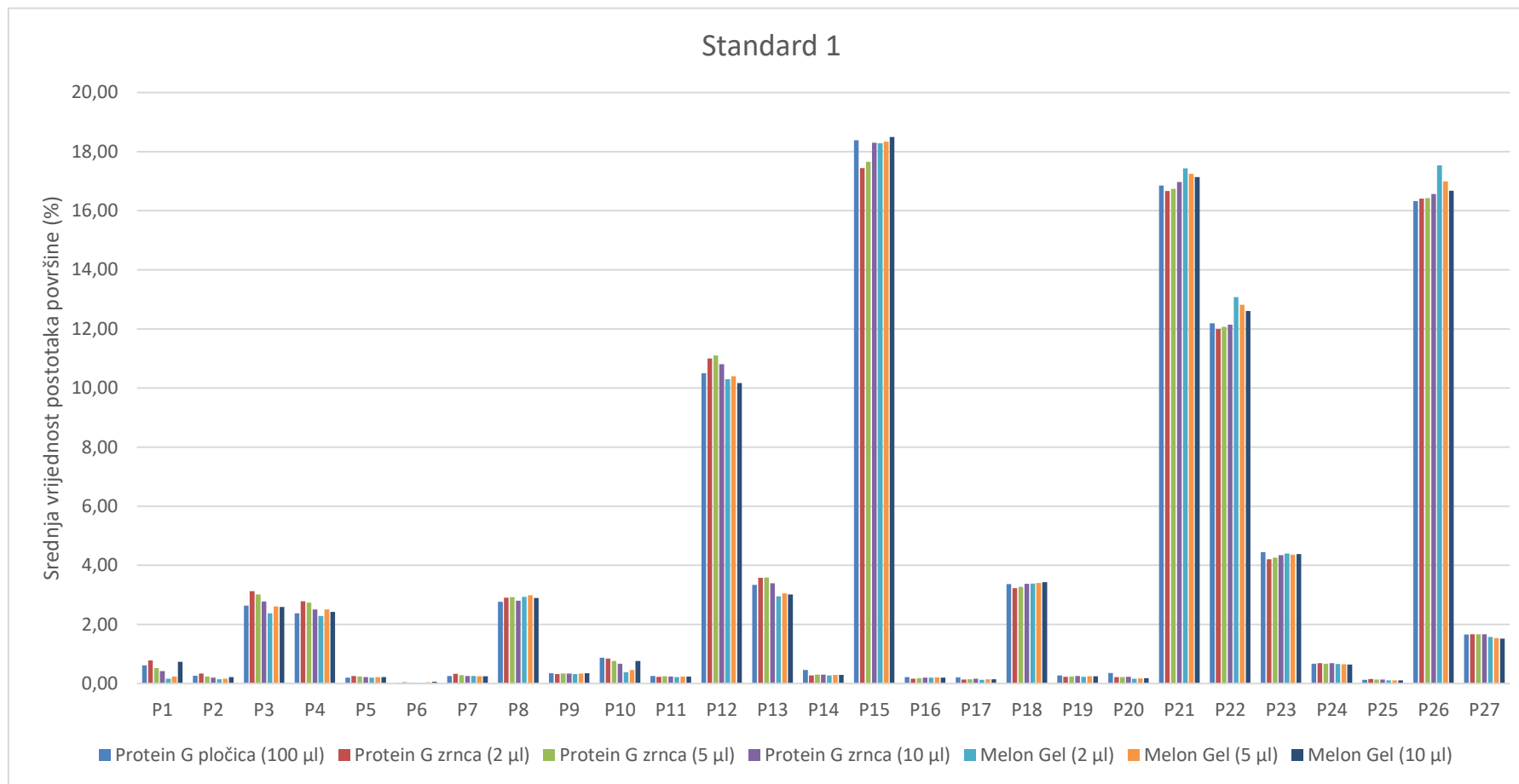
Kod izolacije IgG-a protein G agaroznim zrcima, situacija nije bila jednoznačna, a CV_{av} se kretao od 4% (10 μL Standard 1) do čak 19,8% (5 μL , Standard 3), a CV_{av} za vrške relativne zastupljenosti veće od 1% kretao se do 7,9%. Navedeno bi moglo sugerirati da sam biološki uzorak unosi dodatnu varijaciju u metodu izolacije protein G agaroznim zrcima, što se ne čini uočljivim kod Melon Gel-a. Stoga, ukoliko se pristupa izolaciji IgG-a uz pomoć protein G agaroznih zrnca, 10 μL krvne plazme i 10 μL istaloženih zrnca trebalo bi osigurati IgG zadovoljavajuće koncentracije, visoke čistoće i vjerodostojnih rezultata analize.

Uz pretpostavku da je moguć gubitak labilnih sijalinskih kiselina u kiselom mediju tijekom eluiranja IgG-a s proteina G izračunata je i razina sijalinizacije (zbroj površina vršaka od P1 do P13) IgG-a svakog od tri standarda u odnosu na volumen plazme i metodu izolacije (Tablica 6, 7, 8). Kod izolacije IgG-a na protein G pločici monolita, iako se eluiranje odvija u kiselim uvjetima mravljom kiselinom ($\text{pH} = 2,5$), slijedi brza neutralizacija amonijevim hidrogenkarbonatom. Kod protein G agaroznih zrnca neutralizacija slijedi tek nakon 10 minuta, dok se u slučaju Melon Gel-a prolazak IgG kroz samu stacionarnu fazu odvija u

neutralnom puferu (pH 6.8-7.2). Na slici 22 prikazana je razina sijalinizacije za Standard 1 u obliku histograma radi bolje vizualizacije. Iako je povećana sijalinizacija glikana očekivana u slučaju Melon Gel izolacije ipak se može zaključiti da je ona posljedica povećane kontaminacije drugim plazmatskim proteinima, što se prvenstveno vidi na vršku P1 i strukturi A2G2S2, a ne očuvanja glikoformi sa sijalinskim kiselinama tijekom izolacije. Također, razina sijalinizacije opet pokazuje suprotan smjer kod Melon Gel-a i protein G agaroznih zrnaca, što i dalje ide prilog tome da je efekt povećane sijalinizacije zapravo posljedica kontaminacije drugim plazmatskim proteinima i to radi kemijskog mehanizma samog pročišćavanja IgG-a i specifičnosti vezanja za stacionarnu fazu.

Tablica 6. Prikaz rezultata CGE-LIF analize *N*-glikana IgG-a izoliranog pomoću tri metode izolacije za uzorak Standard 1, uz naznačene početne volumene krvne plazme. Oznake: A - srednja vrijednost relativne zastupljenosti pojedinog glikana izražena u postocima; SD - standardna devijacija; CV - koeficijent varijacije., označen crvenom bojom ukoliko je iznad 15%, žutom između 7% i 15% te zelenom ispod 7%; CVav <1% - prosječni koeficijent varijacije srednjih vrijednosti postotaka površine vršaka čija je relativna zastupljenost manja od 1%; CVav >1% - prosječni koeficijent varijacije srednjih vrijednosti postotaka površine vršaka čija je relativna zastupljenost veća od 1%; S – postotak sijalinizacije.

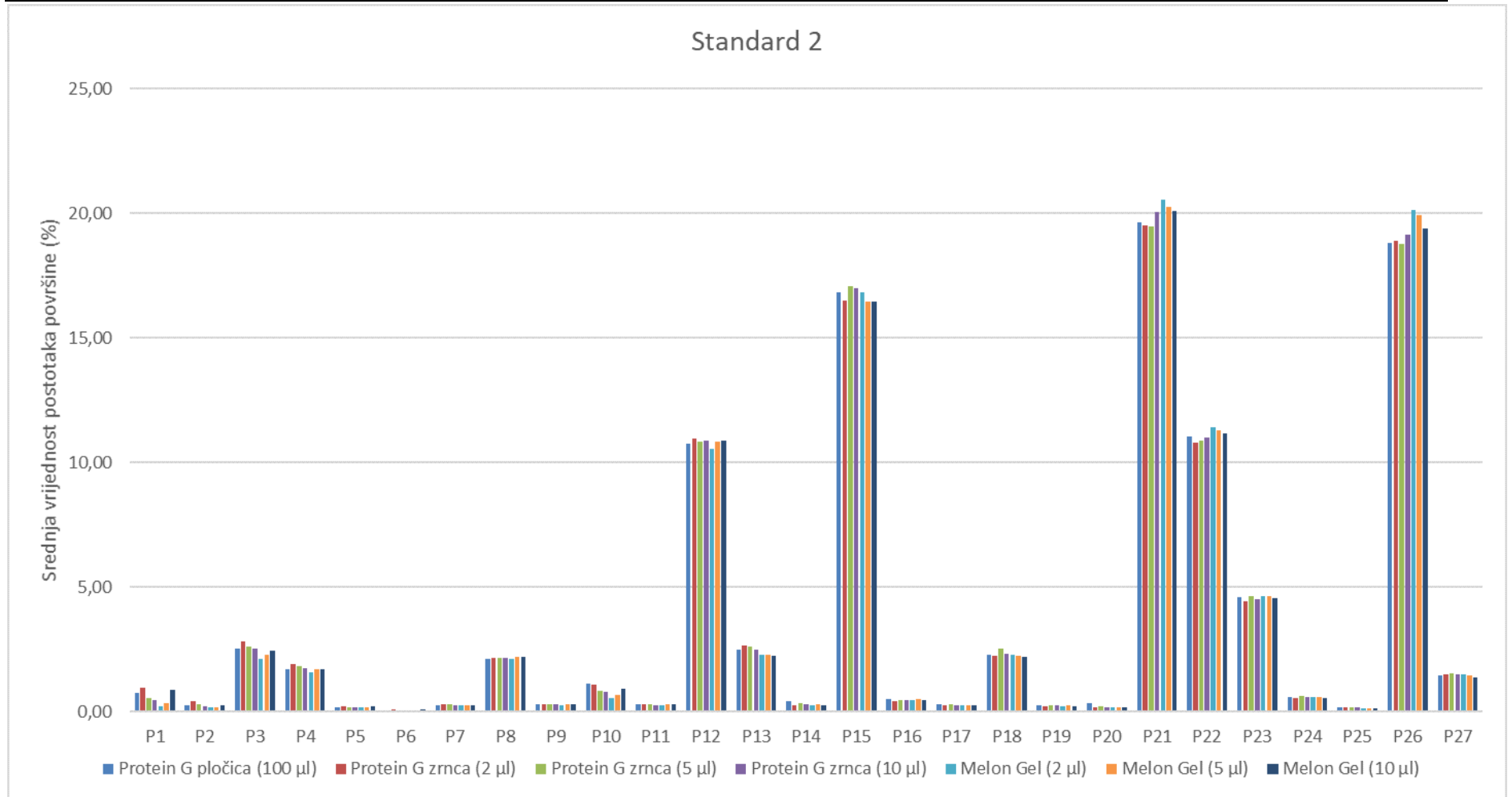
	Standard 1																				
	Protein G pločica monolita			Protein G zrnca									Melon gel								
	100 µL			2 µL			5 µL			10 µL			2 µL			5 µL			10 µL		
	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV
P1	0.61502	0.04647	7.6	0.78539	0.52786	67.21	0.52514	0.09385	17.9	0.41820	0.02986	7.1	0.16579	0.01621	9.8	0.23210	0.01988	8.6	0.73575	0.16833	22.88
P2	0.26040	0.03726	14.3	0.33998	0.12980	38.18	0.23573	0.04453	18.9	0.19838	0.01937	9.8	0.14400	0.03857	26.8	0.16192	0.02039	12.6	0.22190	0.02979	13.43
P3	2.63277	0.12252	4.7	3.12308	0.12832	4.11	3.01563	0.14089	4.7	2.77812	0.09773	3.5	2.38028	0.09819	4.1	2.60498	0.12955	5.0	2.59293	0.12812	4.94
P4	2.37496	0.10869	4.6	2.78045	0.08373	3.01	2.73954	0.12336	4.5	2.51037	0.08773	3.5	2.28348	0.09697	4.2	2.50429	0.13591	5.4	2.42570	0.12335	5.09
P5	0.20379	0.01206	5.9	0.25816	0.03879	15.03	0.23902	0.02158	9.0	0.22133	0.00936	4.2	0.19641	0.00958	4.9	0.21549	0.01502	7.0	0.21950	0.01362	6.21
P6	0.02879	0.00661	23.0	0.03855	0.02244	58.21	0.03252	0.00608	18.7	0.02454	0.00236	9.6	0.02852	0.00404	14.2	0.04674	0.00612	13.1	0.06575	0.00911	13.85
P7	0.25804	0.00927	3.6	0.32854	0.03181	9.68	0.28512	0.01614	5.7	0.25909	0.01043	4.0	0.25196	0.01306	5.2	0.24945	0.00977	3.9	0.24632	0.00831	3.37
P8	2.76585	0.07189	2.6	2.89998	0.04573	1.58	2.92147	0.08048	2.8	2.80392	0.08332	3.0	2.93536	0.04454	1.5	2.98507	0.05925	2.0	2.89647	0.04784	1.65
P9	0.34804	0.01753	5.0	0.32064	0.02348	7.32	0.33938	0.01638	4.8	0.33620	0.00859	2.6	0.31921	0.01174	3.7	0.33840	0.02029	6.0	0.34714	0.02203	6.35
P10	0.87660	0.08414	9.6	0.84833	0.33900	39.96	0.75868	0.07063	9.3	0.67227	0.01648	2.5	0.38534	0.01769	4.6	0.45818	0.03392	7.4	0.76476	0.11966	15.65
P11	0.25743	0.02922	11.4	0.22595	0.03946	17.46	0.24419	0.03719	15.2	0.23457	0.01819	7.8	0.21480	0.01978	9.2	0.23345	0.03512	15.0	0.24091	0.04001	16.61
P12	10.50070	0.19073	1.8	10.99834	0.10120	0.92	11.10484	0.15925	1.4	10.80775	0.17833	1.7	10.30019	0.21521	2.1	10.40148	0.22798	2.2	10.17082	0.15974	1.57
P13	3.33823	0.05129	1.5	3.57923	0.07441	2.08	3.58605	0.04248	1.2	3.39312	0.03338	1.0	2.94757	0.06508	2.2	3.05082	0.07651	2.5	3.01368	0.09711	3.22
P14	0.46125	0.03572	7.7	0.27273	0.03200	11.73	0.29781	0.01805	6.1	0.30255	0.01448	4.8	0.27258	0.01724	6.3	0.29575	0.02431	8.2	0.29313	0.03405	11.61
P15	18.38680	0.41567	2.3	17.43989	0.35549	2.04	17.65158	0.43426	2.5	18.30290	0.41978	2.3	18.28423	0.55656	3.0	18.33705	0.47625	2.6	18.49489	0.32420	1.75
P16	0.21901	0.00837	3.8	0.16590	0.01484	8.95	0.17835	0.00849	4.8	0.19532	0.01069	5.5	0.19727	0.00723	3.7	0.20725	0.01181	5.7	0.20337	0.01540	7.57
P17	0.21181	0.01044	4.9	0.13961	0.02172	15.56	0.14624	0.01698	11.6	0.16375	0.00846	5.2	0.13013	0.00522	4.0	0.14182	0.01020	7.2	0.14540	0.01354	9.31
P18	3.37029	0.05450	1.6	3.22840	0.05713	1.77	3.27553	0.05187	1.6	3.37775	0.03890	1.2	3.38598	0.07120	2.1	3.40359	0.06566	1.9	3.43464	0.05117	1.49
P19	0.27082	0.00965	3.6	0.22284	0.02541	11.40	0.23644	0.00786	3.3	0.25165	0.00775	3.1	0.22848	0.01175	5.1	0.24222	0.01212	5.0	0.24171	0.01664	6.88
P20	0.35411	0.04326	12.2	0.21617	0.03142	14.54	0.21672	0.01469	6.8	0.23126	0.01613	7.0	0.15824	0.00563	3.6	0.17206	0.01030	6.0	0.17786	0.01272	7.15
P21	16.84997	0.09736	0.6	16.66904	0.29869	1.79	16.74288	0.15147	0.9	16.97402	0.06480	0.4	17.43158	0.11382	0.7	17.24525	0.15812	0.9	17.13695	0.22108	1.29
P22	12.19202	0.06280	0.5	11.99317	0.21880	1.82	12.06746	0.13544	1.1	12.14620	0.06044	0.5	13.07547	0.07548	0.6	12.81914	0.08043	0.6	12.60405	0.14509	1.15
P23	4.44320	0.06514	1.5	4.20996	0.09058	2.15	4.26309	0.05842	1.4	4.34035	0.04496	1.0	4.40424	0.03319	0.8	4.36169	0.03567	0.8	4.38043	0.05944	1.36
P24	0.66679	0.00943	1.4	0.68745	0.03611	5.25	0.66933	0.03020	4.5	0.68524	0.01208	1.8	0.66020	0.00680	1.0	0.65571	0.00782	1.2	0.64265	0.01138	1.77
P25	0.12846	0.00665	5.2	0.15431	0.03370	21.84	0.13139	0.01222	9.3	0.13137	0.01240	9.4	0.11063	0.00708	6.4	0.11146	0.00743	6.7	0.10682	0.00925	8.65
P26	16.32419	0.18720	1.1	16.40961	0.32451	1.98	16.43160	0.41386	2.5	16.56893	0.24349	1.5	17.53709	0.35088	2.0	16.98968	0.26148	1.5	16.67312	0.26790	1.61
P27	1.66066	0.04446	2.7	1.66430	0.04016	2.41	1.66426	0.05711	3.4	1.67085	0.05295	3.2	1.57098	0.03980	2.5	1.53496	0.03763	2.5	1.52337	0.03222	2.11
		CVav	5.4		CVav	13.6		CVav	6.4		CVav	4.0		CVav	5.0		CVav	5.2		CVav	6.6
		CVav(<1%)	7.9		CVav(<1%)	22.8		CVav(<1%)	9.7		CVav(<1%)	5.6		CVav(<1%)	7.2		CVav(<1%)	7.6		CVav(<1%)	10.1
		CVav(>1%)	2.1		CVav(>1%)	2.1		CVav(>1%)	2.3		CVav(>1%)	1.9		CVav(>1%)	2.2		CVav(>1%)	2.3		CVav(>1%)	2.3
		S	24.46		S	26.53		S	26.03		S	24.66		S	22.55		S	23.48		S	23.94



Slika 19. Histogramski prikaz srednjih vrijednosti postotaka površine svakog od 27 glikanskih vršaka prema metodi izolacije i početnom volumenu krvne plazme za Standard 1.

Tablica 7. Prikaz rezultata CGE-LIF analize *N*-glikana IgG-a izoliranog pomoću tri metode izolacije za uzorak Standard 2, uz naznačene početne volumene krvne plazme. Oznake: A - srednja vrijednost relativne zastupljenosti pojedinog glikana izražena u postocima; SD - standardna devijacija; CV - koeficijent varijacije., označen crvenom bojom ukoliko je iznad 15%, žutom između 7% i 15% te zelenom ispod 7%; CVav <1% - prosječni koeficijent varijacije srednjih vrijednosti postotaka površine vršaka čija je relativna zastupljenost manja od 1%; CVav >1% - prosječni koeficijent varijacije srednjih vrijednosti postotaka površine vršaka čija je relativna zastupljenost veća od 1%; S – postotak sijalinizacije.

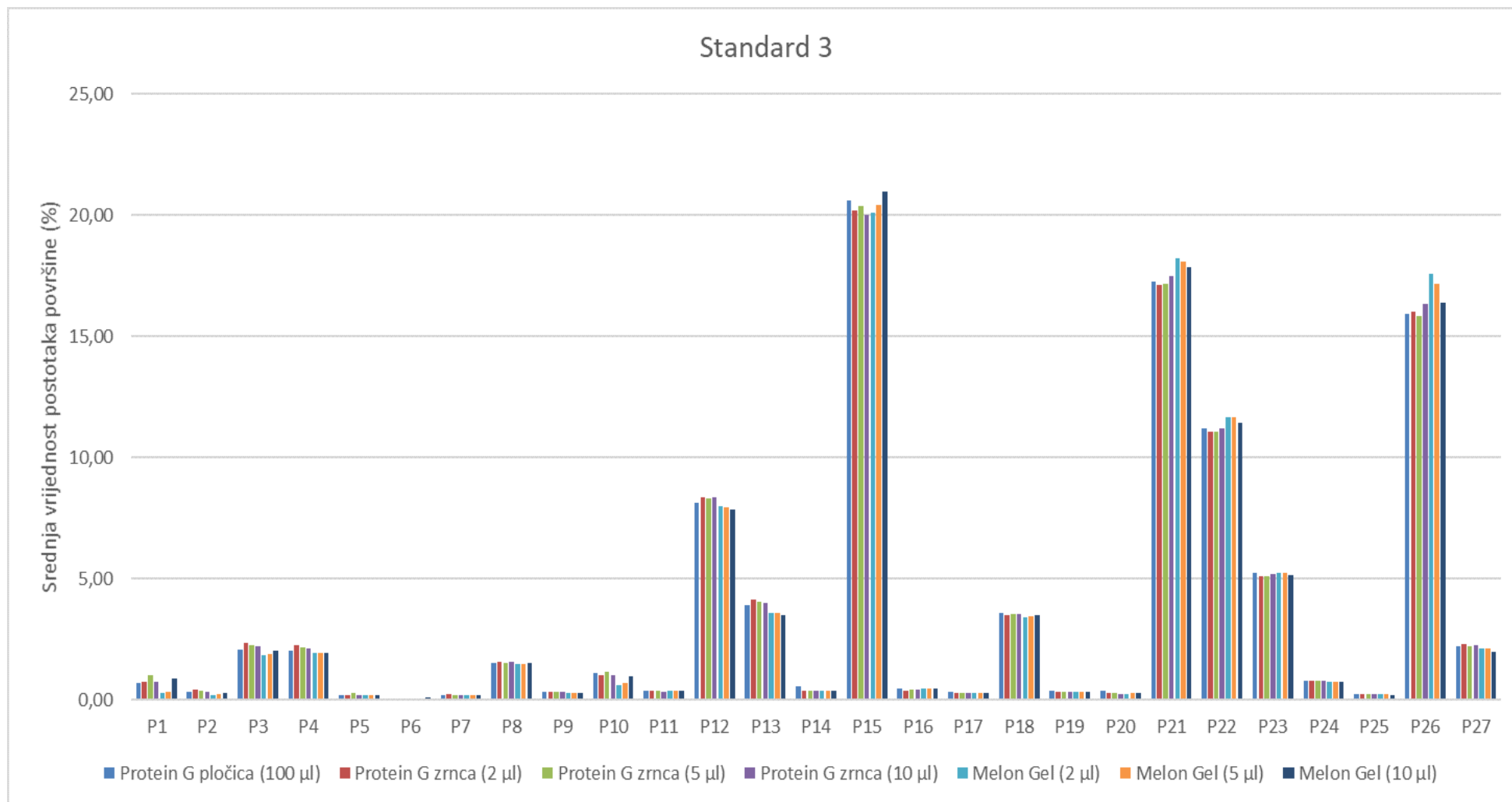
	Standard 2																				
	Protein G pločica monolita			Protein G zrnca									Melon gel								
	100 µL			2 µL			5 µL			10 µL			2 µL			5 µL			10 µL		
	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV
P1	0.74595	0.04639	6.2	0.93933	0.58888	62.69	0.53491	0.03108	5.8	0.47275	0.02631	5.6	0.23123	0.01841	8.0	0.35254	0.02835	8.0	0.86550	0.11309	13.07
P2	0.27322	0.02276	8.3	0.40989	0.14689	35.84	0.28169	0.03307	11.7	0.21665	0.02454	11.3	0.17855	0.03505	19.6	0.18790	0.01921	10.2	0.26405	0.04428	16.77
P3	2.51048	0.06113	2.4	2.79821	0.12234	4.37	2.59415	0.29712	11.5	2.52577	0.09617	3.8	2.11447	0.11219	5.3	2.29394	0.10346	4.5	2.43147	0.13090	5.38
P4	1.70783	0.04622	2.7	1.91576	0.07163	3.74	1.82457	0.14081	7.7	1.76253	0.07952	4.5	1.59639	0.08737	5.5	1.68163	0.09501	5.7	1.70154	0.10745	6.31
P5	0.16081	0.00636	4.0	0.20691	0.02943	14.22	0.18248	0.02395	13.1	0.15451	0.00721	4.7	0.17203	0.02186	12.7	0.18558	0.00987	5.3	0.19617	0.01474	7.51
P6	0.05145	0.00401	7.8	0.07007	0.02592	37.00	0.04641	0.00856	18.5	0.04221	0.00351	8.3	0.04678	0.00937	20.0	0.06308	0.00354	5.6	0.07767	0.00362	4.66
P7	0.24906	0.00609	2.4	0.31366	0.03575	11.40	0.28170	0.02447	8.7	0.25577	0.00833	3.3	0.26315	0.02908	11.1	0.25396	0.00412	1.6	0.25590	0.00766	2.99
P8	2.11987	0.03128	1.5	2.16192	0.04057	1.88	2.15310	0.08509	4.0	2.14278	0.04327	2.0	2.11518	0.03448	1.6	2.17840	0.02816	1.3	2.20605	0.03755	1.70
P9	0.29165	0.01876	6.4	0.28670	0.00845	2.95	0.28320	0.01175	4.1	0.28100	0.01184	4.2	0.27003	0.00752	2.8	0.28365	0.01650	5.8	0.29067	0.01574	5.42
P10	1.11624	0.06508	5.8	1.07300	0.35519	33.10	0.83454	0.01896	2.3	0.80423	0.03353	4.2	0.54214	0.02309	4.3	0.65910	0.04014	6.1	0.91600	0.07254	7.92
P11	0.28669	0.03195	11.1	0.29385	0.02121	7.22	0.29130	0.03148	10.8	0.27361	0.03509	12.8	0.26743	0.03043	11.4	0.28835	0.03333	11.6	0.29478	0.03343	11.34
P12	10.76554	0.11241	1.0	10.96946	0.18669	1.70	10.82050	0.73997	6.8	10.85880	0.23194	2.1	10.53399	0.32372	3.1	10.85126	0.25678	2.4	10.87975	0.19777	1.82
P13	2.50670	0.03540	1.4	2.64819	0.05891	2.22	2.59005	0.07068	2.7	2.50027	0.04523	1.8	2.27778	0.09471	4.2	2.29320	0.09520	4.2	2.24704	0.09487	4.22
P14	0.42432	0.03421	8.1	0.24346	0.03588	14.74	0.33288	0.09095	27.3	0.27990	0.01568	5.6	0.26803	0.01355	5.1	0.27793	0.02042	7.3	0.26930	0.02634	9.78
P15	16.83280	0.41160	2.4	16.50667	0.31283	1.90	17.05919	1.32523	7.8	16.98164	0.46074	2.7	16.83814	0.81599	4.8	16.46228	0.76714	4.7	16.47109	0.30337	1.84
P16	0.49132	0.01274	2.6	0.41603	0.01446	3.48	0.48175	0.08545	17.7	0.46557	0.01417	3.0	0.46723	0.01329	2.8	0.48549	0.01263	2.6	0.47449	0.01903	4.01
P17	0.31289	0.00917	2.9	0.24282	0.01635	6.73	0.30365	0.10641	35.0	0.26987	0.01843	6.8	0.23657	0.00427	1.8	0.25455	0.00983	3.9	0.25278	0.01194	4.72
P18	2.26457	0.03831	1.7	2.22078	0.04248	1.91	2.50971	0.59928	23.9	2.31555	0.03704	1.6	2.27656	0.07310	3.2	2.23317	0.06259	2.8	2.21385	0.03627	1.64
P19	0.26244	0.01015	3.9	0.22688	0.01658	7.31	0.25482	0.06156	24.2	0.24386	0.00875	3.6	0.22375	0.00928	4.1	0.23596	0.01265	5.4	0.23216	0.01499	6.46
P20	0.35723	0.02988	8.4	0.18865	0.01318	6.99	0.21512	0.05248	24.4	0.18646	0.01817	9.7	0.16010	0.00789	4.9	0.18969	0.02968	15.6	0.16963	0.01215	7.16
P21	19.63428	0.12661	0.6	19.52562	0.28974	1.48	19.48457	0.52374	2.7	20.07123	0.16450	0.8	20.54302	0.21714	1.1	20.25097	0.23469	1.2	20.10124	0.19525	0.97
P22	11.02812	0.09085	0.8	10.81380	0.20131	1.86	10.89148	0.11063	1.0	11.02083	0.10481	1.0	11.40111	0.05510	0.5	11.30702	0.06369	0.6	11.14876	0.10266	0.92
P23	4.60218	0.03980	0.9	4.41799	0.03574	0.81	4.64418	0.43368	9.3	4.52331	0.04615	1.0	4.64697	0.02656	0.6	4.63088	0.03267	0.7	4.56367	0.04122	0.90
P24	0.57733	0.00585	1.0	0.55764	0.01386	2.49	0.60944	0.09135	15.0	0.56765	0.01899	3.3	0.57233	0.01310	2.3	0.56860	0.01022	1.8	0.55281	0.01170	2.12
P25	0.15252	0.00381	2.5	0.16307	0.03406	20.88	0.18667	0.06172	33.1	0.16186	0.02906	18.0	0.14399	0.01071	7.4	0.14995	0.01004	6.7	0.14655	0.01096	7.48
P26	18.79890	0.37359	2.0	18.88124	0.49507	2.62	18.78120	1.00603	5.4	19.13316	0.23877	1.2	20.11969	0.46554	2.3	19.92976	0.51732	2.6	19.38878	0.24215	1.25
P27	1.47288	0.02527	1.7	1.50841	0.04403	2.92	1.52675	0.08552	5.6	1.48825	0.02167	1.5	1.49336	0.03365	2.3	1.45116	0.04628	3.2	1.38828	0.03086	2.22
		CVav	3.7		CVav	10.9		CVav	12.6		CVav	4.8		CVav	5.7		CVav	4.9		CVav	5.2
		CVav(<1%)	5.4		CVav(<1%)	16.7		CVav(<1%)	16.8		CVav(<1%)	7.0		CVav(<1%)	7.9		CVav(<1%)	6.5		CVav(<1%)	7.4
		CVav(>1%)	1.9		CVav(>1%)	4.7		CVav(>1%)	7.4		CVav(>1%)	2.0		CVav(>1%)	2.9		CVav(>1%)	2.8		CVav(>1%)	2.4
		S	22.79		S	24.09		S	22.72		S	22.29		S	20.61		S	21.57		S	22.63



Slika 20. Histogramski prikaz srednjih vrijednosti postotaka površine svakog od 27 glikanskih vršaka prema metodi izolacije i početnom volumenu krvne plazme za Standard 2.

Tablica 8. Prikaz rezultata CGE-LIF analize *N*-glikana IgG-a izoliranog pomoću tri metode izolacije za uzorak Standard 3, uz naznačene početne volumene krvne plazme. Oznake: A - srednja vrijednost relativne zastupljenosti pojedinog glikana izražena u postocima; SD - standardna devijacija; CV - koeficijent varijacije., označen crvenom bojom ukoliko je iznad 15%, žutom između 7% i 15% te zelenom ispod 7%; CVav <1% - prosječni koeficijent varijacije srednjih vrijednosti postotaka površine vršaka čija je relativna zastupljenost manja od 1%; CVav >1% - prosječni koeficijent varijacije srednjih vrijednosti postotaka površine vršaka čija je relativna zastupljenost veća od 1%; S – postotak sijalinizacije.

	Standard 3																				
	Protein G pločica monolita			Protein G zrnca									Melon gel								
	100 µl			2 µl			5 µl			10 µl			2 µl			5 µl			10 µl		
	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV	A	SD	CV
P1	0.68817	0.07269	10.6	0.75627	0.26403	34.91	1.00924	0.68987	68.4	0.74279	0.50337	67.8	0.25998	0.02425	9.3	0.33928	0.02999	8.8	0.88167	0.13943	15.81
P2	0.32914	0.03773	11.5	0.42761	0.15951	37.30	0.37287	0.19450	52.2	0.31801	0.13243	41.6	0.20752	0.05454	26.3	0.21721	0.04764	21.9	0.28611	0.04914	17.18
P3	2.04873	0.07091	3.5	2.33448	0.11573	4.96	2.23171	0.17121	7.7	2.20123	0.06731	3.1	1.86421	0.10499	5.6	1.89091	0.08033	4.2	2.00539	0.12161	6.06
P4	2.00459	0.06686	3.3	2.26597	0.10361	4.57	2.17245	0.08484	3.9	2.13512	0.07806	3.7	1.92005	0.09929	5.2	1.93904	0.09495	4.9	1.93916	0.11628	6.00
P5	0.16822	0.00679	4.0	0.19772	0.01506	7.62	0.25874	0.19714	76.2	0.18007	0.02075	11.5	0.19591	0.02057	10.5	0.18766	0.00729	3.9	0.18916	0.00908	4.80
P6	0.03033	0.00202	6.7	0.03418	0.00533	15.59	0.05506	0.05485	99.6	0.02682	0.00708	26.4	0.04944	0.01136	23.0	0.07182	0.00460	6.4	0.08741	0.00273	3.12
P7	0.17758	0.00864	4.9	0.24555	0.03702	15.08	0.20971	0.01626	7.8	0.19185	0.01450	7.6	0.18892	0.02743	14.5	0.17332	0.00384	2.2	0.17241	0.00395	2.29
P8	1.50590	0.02781	1.8	1.54361	0.05229	3.39	1.53859	0.05739	3.7	1.55712	0.02590	1.7	1.48749	0.02656	1.8	1.49248	0.03083	2.1	1.50711	0.03129	2.08
P9	0.31849	0.01968	6.2	0.32488	0.03505	10.79	0.34685	0.07059	20.4	0.31702	0.01513	4.8	0.26578	0.01283	4.8	0.28332	0.01287	4.5	0.30075	0.01567	5.21
P10	1.11520	0.07710	6.9	1.00488	0.14351	14.28	1.13321	0.40007	35.3	1.02212	0.34211	33.5	0.60315	0.04904	8.1	0.67970	0.03569	5.3	0.95616	0.06982	7.30
P11	0.38275	0.04028	10.5	0.38485	0.04772	12.40	0.36406	0.05087	14.0	0.34778	0.02686	7.7	0.39213	0.05526	14.1	0.37667	0.03277	8.7	0.36938	0.02466	6.68
P12	8.12012	0.10852	1.3	8.33556	0.15310	1.84	8.29115	0.18053	2.2	8.34296	0.13044	1.6	8.00063	0.17250	2.2	7.94360	0.13665	1.7	7.84666	0.18842	2.40
P13	3.92758	0.08636	2.2	4.14213	0.06732	1.63	4.04580	0.09975	2.5	3.99638	0.07358	1.8	3.56820	0.14085	3.9	3.59278	0.14163	3.9	3.49548	0.14729	4.21
P14	0.56296	0.03151	5.6	0.37448	0.03288	8.78	0.38665	0.08328	21.5	0.36703	0.02577	7.0	0.36092	0.01823	5.1	0.37316	0.02010	5.4	0.37281	0.01776	4.76
P15	20.62030	0.51719	2.5	20.18761	0.40978	2.03	20.37375	0.62316	3.1	20.01146	0.41187	2.1	20.11182	0.46700	2.3	20.42976	0.43752	2.1	20.99117	0.61374	2.92
P16	0.45968	0.00988	2.1	0.39419	0.01512	3.84	0.41793	0.02947	7.1	0.40913	0.02834	6.9	0.45216	0.01426	3.2	0.45560	0.01398	3.1	0.45519	0.01020	2.24
P17	0.35028	0.01110	3.2	0.28137	0.03074	10.93	0.29185	0.04644	15.9	0.27721	0.01714	6.2	0.27458	0.01562	5.7	0.27716	0.01038	3.7	0.28030	0.00457	1.63
P18	3.57958	0.05602	1.6	3.50301	0.04964	1.42	3.54714	0.08456	2.4	3.52871	0.05124	1.5	3.40083	0.07969	2.3	3.45242	0.06740	2.0	3.50995	0.07742	2.21
P19	0.36356	0.01016	2.8	0.32612	0.02168	6.65	0.32265	0.01796	5.6	0.32678	0.01385	4.2	0.31910	0.01149	3.6	0.32998	0.00954	2.9	0.33186	0.00773	2.33
P20	0.36199	0.04455	12.3	0.26419	0.02850	10.79	0.27812	0.09157	32.9	0.24383	0.02791	11.4	0.25843	0.01898	7.3	0.26512	0.01427	5.4	0.26058	0.01051	4.03
P21	17.26741	0.13506	0.8	17.11914	0.17091	1.00	17.16205	0.48788	2.8	17.47218	0.29348	1.7	18.21736	0.23083	1.3	18.07237	0.21681	1.2	17.86160	0.19948	1.12
P22	11.18905	0.05026	0.4	11.08558	0.13971	1.26	11.05518	0.27034	2.4	11.20497	0.15968	1.4	11.67468	0.04032	0.3	11.64959	0.05114	0.4	11.42236	0.07315	0.64
P23	5.25888	0.05283	1.0	5.08904	0.05260	1.03	5.10214	0.09793	1.9	5.18924	0.03108	0.6	5.25493	0.04421	0.8	5.25741	0.03505	0.7	5.16451	0.04039	0.78
P24	0.78885	0.01636	2.1	0.80568	0.03545	4.40	0.77861	0.01885	2.4	0.78611	0.01294	1.6	0.75023	0.01434	1.9	0.76128	0.01000	1.3	0.74135	0.01123	1.51
P25	0.23193	0.00861	3.7	0.25215	0.04050	16.06	0.23753	0.08980	37.8	0.23262	0.03505	15.1	0.22982	0.02629	11.4	0.21612	0.01382	6.4	0.20182	0.01266	6.27
P26	15.92494	0.19112	1.2	16.02046	0.28145	1.76	15.81357	0.43235	2.7	16.32119	0.23583	1.4	17.59215	0.14409	0.8	17.17625	0.20206	1.2	16.38270	0.21455	1.31
P27	2.22380	0.03224	1.4	2.29929	0.07171	3.12	2.20338	0.06913	3.1	2.25028	0.03337	1.5	2.09956	0.04332	2.1	2.09598	0.03510	1.7	1.98695	0.05337	2.69
		CVav	4.2		CVav	8.8		CVav	19.8		CVav	10.2		CVav	6.6		CVav	4.3		CVav	4.4
		CVav(<1%)	6.2		CVav(<1%)	13.9		CVav(<1%)	30.3		CVav(<1%)	15.7		CVav(<1%)	9.9		CVav(<1%)	6.0		CVav(<1%)	5.7
		CVav(>1%)	2.2		CVav(>1%)	3.3		CVav(>1%)	5.7		CVav(>1%)	4.3		CVav(>1%)	2.4		CVav(>1%)	2.2		CVav(>1%)	2.7
		S	20.82		S	22.00		S	22.03		S	21.38		S	19.00		S	19.19		S	20.04



Slika 21. Histogramski prikaz srednjih vrijednosti postotaka površine svakog od 27 glikanskih vršaka prema metodi izolacije i početnom volumenu krvne plazme za Standard 3



Slika 22. Histogramski prikaz razine sijalinizacije (%) *N*-glikana IgG-a u Standardu 1.

ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti metode izolacije IgG-a u svrhu *N*-glikanske analize. Izolacija IgG-a uz pomoć protein G pločice monolita već se dugi niz godina koristi u visoko-protočnoj glikomici, a rezultati takve analize *N*-glikoma IgG-a vrlo su reproducibilni i robusni, što je potvrđeno i ovim radom. No, takva analiza ima i svoje mane, zahtijeva veću količinu dragocjenog biološkog uzorka (50 - 100 μ L krvne plazme/seruma), višesatni boravak u laboratoriju te velike količine organskih i anorganskih otapala. Protein G agarozna zrnca kemijskim mehanizmom najviše nalikuju prethodno navedenoj metodi te se također često upotrebljavaju, pogotovo iz razloga što zahtijevaju znatno manju količinu biološkog materijala (10 μ L krvne plazme/seruma) kao i utrošenog vremena (oko dva sata), ali učinkovitost takve izolacije ovisi o prirodi biološkog materijala te rezultati glikanske analize uspoređujući tehničke replikate pokazuju veću varijabilnost. Melon Gel se pokazao kao najbolja alternativa standardnoj proceduri s protein G pločicom monolita, zahtijeva izuzetno malu količinu početnog uzorka (do 5 μ L krvne plazme/seruma), a cijelu proceduru za 96 uzoraka moguće je obaviti unutar 30 min. Konačne koncentracije izoliranog IgG-a gotovo su istovjetne onima dobivenim protein G pločicom monolita, rezultati glikanske analize precizni su i izuzetno podudarni među replikatima bez obzira na prirodu biološkog uzorka. Sijalinizacija *N*-glikana IgG-a ne ovisi o primijenjenoj metodi izolacije. Daljnji koraci optimizacije Melon Gel metode i metode s protein G agaroznim zncima potrebne su kako bi se osigurali još podudarniji rezultati, ispitala učinkovitost na drugim biološkim materijalima (npr. mišji krvni serum), odredila razina i sastav kontaminacija spektrometrijom masa te utvrdila ovisnost koncentracije IgG-a u krvnoj plazmi/serumu (određena ELISA metodom) s učinkovitosti izolacije i mogućeg učinka na *N*-glikanski profil IgG-a.

§ 5. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)

2-AA – antranilna kiselina (engl. *anthranilic acid*)

2-AB – 2-aminobenzamid (engl. *2-aminobenzamide*)

ACN – acetonitril

APTS – 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina (engl. *8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid*)

Asn – Asparagin

CE – kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*)

CGE–LIF - kapilarna gel-elektroforeza uz detekciju fluorescencije inducirane laserom (engl. *Capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*)

Cys – Cistein

Dol-P – dolikol fosfat

Dol-P-P – dolikol pirofosfat

EDEM – engl. *ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase I-like protein*

ER – Endoplazmatski retikulum

Fab – fragment koji veže antigen (engl. *fragment antigen binding*)

Fc – fragment koji kristalizira (engl. *fragment crystallizable*)

Glc – glukoza

GlcNAc – *N*-acetilglukozamin

HILIC-SPE – kromatografija hidrofilnih interakcija-ekstrakcije na čvrstu fazu (engl. *hydrophilic interaction chromatography - solid phase extraction*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

Ig – imunoglobulin

IgA – imunoglobulin A

IgD – imunoglobulin D

IgE – imunoglobulin E

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

Man – Manoza

MS – masena spektrometrija (engl. *Mass spectrometry*)

NMR - nuklearna magnetska rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*)

OST – oligosaharil-transferaza

PB – 2-pikolin boran

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PNGaza A – peptid-N-glikozidaza A

PNGaza F – peptid-N-glikozidaza F

RA – reumatoidni artritis

SDS – natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*

Ser – Serin

TLR – engl. *Toll-like receptor*

Thr – Treonin

UHPLC – tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (engl. *ultra high performance liquid chromatography*)

V_H - varijabilna regija teškog lanca imunoglobulina

V_L – varijabilna regija lakog lanca imunoglobulina

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. G. Lauc, J. Krišić, V. Zoldoš, *Front. Genet.* **5** (2014) 1-7.
2. M. Pučić, A. Knežević, J. Vidić, B. Adamczyk, M. Novokmet, O. Polašek, O. Gornik, S. Šupraha-Goreta, M. R. Wormald, I. Redžić, H. Campbell, A. Wright, N. D. Hastie, J. F. Wilson, I. Rudan, M. Wuhrer, P. M. Rudd, Đ. Josić, G. Lauc, *Mol. Cell. Proteomics.* **10** (2011).
3. E. Lopez, N. E. Scott, B. D. Wines, P. M. Hogarth, A. K. Wheatley, S. J. Kent, A. W. Chung, *Front. Immunol.* **10** (2019) 2415.
4. M. Hanić, G. Lauc, I. Trbojević-Akmačić, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **97** (2019).
5. R. Apweiler, *Biochim. Biophys. Acta.* **1473(1)** (1999) 4-8.
6. K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell.* **126(5)** (2006) 855–867.
7. S. Wang, Q. He, J. Ye, Z. Kang, Q. Zheng, *Health Sci J.* **14 (5)** (2020) 743.
8. H. J. An, J. W. Froehlich, C. B. Lebrilla, *Curr Opin Chem Biol.* **13(4)** (2009) 421–426.
9. P. A. Haynes, *Glycobiology*, **8** (1998) 1–5.
10. P. Fisher, J. Thomas - Oates, A. J. Wood, D. Ungar, *Front. Cell Dev. Biol.*, **7** (2019) 157.
11. O. Gornik, G. Lauc, *Dis Markers*, **25** (4-5) (2008) 267-278.
12. 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., 2009.
13. F. Clerc, K. R. Reiding, B. C. Jansen, G. S. M. Kammeijer, A. Bondt, M. Wuhrer, *Glycoconj. J.*, **33** (2016) 309-343.
14. I. Martínez Duncker, C. Asteggiano and H. H. Freeze, *Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications*, Nova Science, 2014, 59-82.
15. C. W. von der Lieth, T. Lütke, M. Frank, *Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd, 2009, 143-162.
16. Y. Harada, K. Nakajima, Y. Masahara - Negishi, H. Freeze, T. Angata, N. Taniguchi, T. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110(48)** (2013) 19366–19371.
17. M. Aebi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833(11)** (2013) 2430-2437.
18. S. Sanyal, C. G. Frank, A. K. Menon, *Biochemistry* **47**(2008) 7937-7946.
19. E. Bieberich, *Adv Neurobiol.*, **9** (2014) 47-70.

20. S. Pfeffer, J. Dudek, M. Gogala, S. Schorr, J. Linxweiler, S. Lang, T. Becker, R. Beckmann, R. Zimmermann, F. Förster, *Nat. Commun.* **5** (2014).
21. J. Roth, *Chem. Rev.* **102(2)** (2002) 285-304.
22. A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai, *Stanična i molekularna imunologija*, Medicinska Naklada, Zagreb, 1998.
23. I. Gudelj, G. Lauc, M. Pezer, *Cell Imm* **333** (2018) 65-79.
24. K. Murphy, C. Weaver, *Janeway's Immunology*. 9th edition, Garland Science, New York and London, 2017, str. 139-146
25. A. Bondt, M. Wuhrer, T.M. Kuijper, J.M.V. Hazes, R.J.E.M. Dolhain, *Arthritis Res. Ther.* **18** (2016), 274.
26. <https://www.gbiosciences.com/Protein-Research/Protease-Protease-Inhibitor-Systems/Proteases/Immobilized-Papain> (datum pristupa 14. kolovoza 2021.).
27. G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispens, *Front. Immunol.*, **5** (2014).
28. R. G. Hamilton, *Clin. Chem.* **33(10)** (1987) 1707-1725.
29. R. Jefferis, D. Kumararatne, *Clin. Exp. Immunol.* **81(3)** (2008) 357-367.
30. R. B. Parekh, I. Roit, D. Isenberg, R. Dwek, T. Rademacher, *J Exp Med* **167(5)** (1988) 1731-1736.
31. J. Krištić, F. Vučković, C. Menni, L. Klarić, T. Keser, I. Beceheli, M. Pučić-Baković, M. Novokmet, M. Mangino, K. Thaqi, P. Rudan, N. Novokmet, J. Šarac, S. Missoni, I. Kolčić, O. Polašek, I. Rudan, H. Campbell, C. Hayward, Y. Aulchenko, A. Valdes, J.F. Wilson, O. Gornik, D. Primorac, V. Zoldos, T. Spector, G. Lauc, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **69(7)** (2014) 779-789.
32. R.B. Parekh, R.A. Dwek, B.J. Sutton, D.L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T.W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, *Nature* **316** (6027) (1985) 452-457.
33. S. E. de Jong, M. H. Selman, A. A. Adegnik, A. S. Amoah, E. van Riet, Y.C. Kruize, J. G. Raynes, A. Rodriguez, D. Boakye, E. von Mutius, A. C. Knulst, J. Genuneit, P. J. Cooper, C.H. Hokke, M. Wuhrer, M. Yazdanbakhsh, *Sci. Rep.* **6** (2016).
34. R. M. Hnasko, J. A. McGarvey, *Methods Mol Biol* **1318** (2015) 29-41.
35. I. Trbojević-Akmačić, I. Ugrina, G. Lauc, *Methods Enzymol.* **586** (2017) 37-55.
36. C. Huhn, M. H. J. Selman, L. R. Ruhaak, A. M. Deelder, M. Wuhrer, *Proteomics* **9** (2009)
37. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1601975-Antibody-Production-Purification-Guide.pdf> (datum pristupa 08. rujna 2021.).

38. P. Hettegger, J. Huber, K. Paßecker, R. Soldo, U. Kegler, *PLoS ONE* **14**(6) (2019)
39. 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. Polaš, 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. Wuhner, G. Lauc, *Mol. Cell. Proteom.* **13** (2014) 1598-1610.
40. T. Wang, Z. P. Cai, X. Q. Gu, H. Y. Ma, Y. M. Du, K. Huang, J. Voglmeir, L. Liu, *Biosci. Rep.* **34** (2014).
41. Z. Szabo, A. Guttman, T. Rejtar, B. L. Karger, *Electrophoresis*, **31** (2010), 1389-1395.
42. L.R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, M. Wuhner. *Anal. Bioanal.* **397**(8) (2010) 3457–3481.
43. L. R. Ruhaak, E. Steenvoorden, C. A. M. Koeleman, A. M. Deelder, M. Wuhner, *Proteomics*, **10** (2010) 2330-2336.
44. S. Suzuki, *Anal Sci.* **29** (2013) 1117-1128.
45. L. R. Ruhaak, R. Hennig, C. Huhn, M. Borowiak, R. J. E. M. Dolhain, A. M. Deelder, E. Rapp, M. Wuhner, *J. Proteome Res.* **9** (2010) 6655–6664.
46. G. Lauc, M. Wuhner, *High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1503, Springer Science, New York 2017, str. 21-30.
47. <https://www.mpi-magdeburg.mpg.de/47385/method-development-for-glycan-analysis> (datum pristupa 17.kolovoza 2021.).
48. https://assets.fishersci.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011519_Melon_Gel_IgG_Purifi_UG.pdf (datum pristupa 23. srpnja 2021.).
49. J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2011.
50. I. Trbojević-Akmačić, N. T. Ventham, E. Theodoratou, Frano Vučković, N. A. Kennedy, Jasminka Krštić, E. R. Nimmo, R. Kalla, H. Drummond, J. Štambuk, M. G. Dunlop, M. Novokmet, Y. Aulchenko, O. Gornik, H. Campbell, M. Pučić Baković, J. Satsangi, G. Lauc, *Inflamm Bowel Dis* (2015).
51. A. C. Russell, A. Kepka, Irena Trbojević-Akmačić, I. Ugrina, M. Song, J. Hui, M. Hunter, S. M. Laws, G. Lauc, W. Wang, *Immunobiology* (2018).
52. G. Lauc, F. Vučković, A. Bondt, M. Pezer, M. Wuhner *Nat Commun* **9**(1) (2018).

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivona Dabić

Datum rođenja: 07.05.1997.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2004. – 2012. Osnovna škola Orašje, Orašje

2012. – 2016. Školski centar fra Martina Nedića, smjer: Opća gimnazija, Orašje

2016. – 2019. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera, Osijek

2019. – danas Diplomski studij kemije, smjer: Biokemija i organska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018. Otvoreni dani Odjela za kemiju