Optimizacija visokoprotočnih metoda za analizu N-glikozilacije mišjeg imunoglobulina G

Mrčela, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:727906

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Mia Mrčela

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

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Mia Mrčela

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

Diplomski rad

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

Zagreb, 2017.

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

Zahvale

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

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

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

Hvala Josipu i Ivanu što čine moj život ljepšim.

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

Aneli i Zokiju…

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

Le Bon

Sadržaj

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

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

Sažetak

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

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

Mia Mrčela

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

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

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

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

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

Mentor: dr. sc. Gordan Lauc, prof.
Neposredni voditelj: dr. sc. Olga Zaytseva
Nastavnik: dr. sc. Marko Močibob, doc.

Ocjenjivači: dr. sc. Marko Močibob, doc.
dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.
dr. sc. Biserka Prugovečki, izv. prof.
Zamjena: dr. sc. Mirta Rubčić, izv.prof.
Rad je prihvaćen: 31. svibnja 2017.

Abstract

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

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

Mia Mrčela

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

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

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

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

Key words: *N*-glycosylation, immunoglobulin G, Fcγ receptors, liquid chromatography coupled with mass spectromety, capillary gel electrophoresis

Mentor: dr. sc. Gordan Lauc, Prof.
Supervisor: dr. sc. Olga Zaytseva
Instructor: dr. sc. Marko Močibob, Assist. Prof.

Reviewers: dr. sc. Marko Močibob, Assist. Prof.
dr. sc. Sanda Rončević, Assoc. Prof.
dr. sc. Biserka Prugovečki, Assoc. Prof.
Replacement: dr. sc. Mirta Rubčić, Assoc. Prof.
Thesis accepted: 31st May 2017.

Popis kratica

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

Asn - asparagin

C_L - laki lanac imunoglobulina (eng. *light chain*)

C_H - teški lanac imunoglobulina (eng. *heavy chain*)

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

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

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

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

Dol-P - dolikol fosfat

Dol-P-P - dolikol pirofosfat

ER - endoplazmatski retikulum

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

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

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

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

FcγR - receptor specifičan za fragment Fc (eng. *fragment crystallizable γ receptor*)

GlcNAc - *N*-acetilglukozamin

GlcNAc-P - *N*-acetilglukozamin fosfat

GlcNAcT-I - *N*-acetilglukozaminiltransferaza I

GlcNAcT-II - *N*-acetilglukozaminiltransferaza II

GlcNAcT-III - *N*-acetilglukozaminiltransferaza III

GlcNAcT-IV - *N*-acetilglukozaminiltransferaza IV

GlcNAcT-V - *N*-acetilglukozaminiltransferaza V

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

Ig - imunoglobulin

IgG - imunoglobulin G

LacNAc - 2-*N*-acetillaktozamin

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

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

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

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

OST - oligosaharil-transferaza

PNGaza F - peptidil-*N*-glikozidaza F

SD - standardna devijacija

Ser - serin

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

Thr - treonin

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

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

1. Uvod

N-glikozilacija je ko-translacijska i post-translacijska modifikacija koja osim strukturne ima i funkcijsku ulogu glikoproteina. Jedan od najzastupljenijih i dobro proučavanih antitijela u ljudskoj krvi je imunoglobulin G (IgG). Glikozilacijsko mjesto na položaju Asn297 polipeptidnog lanca domene C_H2 fragmenta koji kristalizira (eng. *Fragment crystallizable*, Fc) može vezati stotine različitih glikovarijanti kompleksnog bi-antenarnog *N*-glikana, a promjene u *N*-glikozilaciji IgG-a povezane su s kompleksnim bolestima kao što su autoimune, upalne i bolesti raka.[1,2] Također, *N*-glikozilacija utječe na afinitet vezanja fragmenta Fc IgG-a na receptore specifične za fragment Fc (eng. *Fragment crystallizable γ Receptor*, FcγR), čime stimulira staničnu citotoksičnost ovisnu o antitijelima koja je važan mehanizam djelovanja imunološkog sustava.[3] Miševi s uklonjenim genima (eng. *knockout*) koji kodiraju za FcγR mogu dati informacije o ulozi Fc *N*-glikozilacije IgG-a tijekom interakcije Fc-FcγR. Poznate su četiri podklase mišjeg IgG-a: IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3 koje imaju različit afinitet vezanja FcγR-a za IgG te imunološki odgovor u kojem sudjeluju (aktivirajući ili inhibirajući). Osim fragmenta Fc, IgG-a se sastoji i od fragmenta koji veže antigen (eng. *Fragment antigen binding*, Fab) koji je glikoziliran u 15-20 % molekula IgG-a, a nekovalentnim interakcijama veže se na antigene.[3]

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

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

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

2. Literaturni pregled

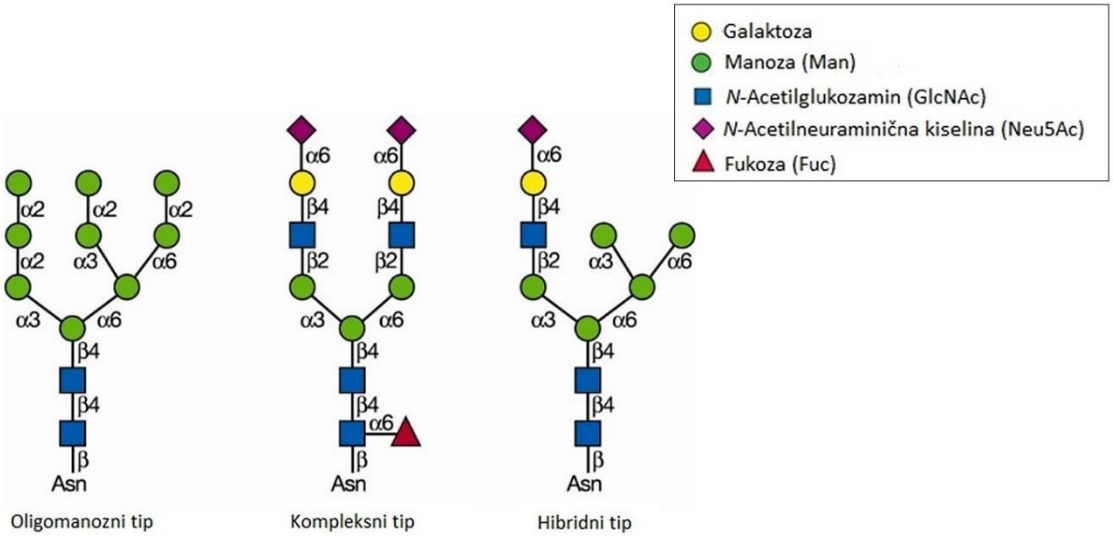
2.1. Glikozilacija

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

2.1.1. N-glikozilacija

N-glikani se kovalentno vežu preko *N*-acetilglukozamina (GlcNAcβ1) na dušikov atom asparaginskog bočnog ogranka polipeptida na konsenzusnoj sekvenci Asn-X-Ser/Thr, gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu koja nije prolin. Strukturno se dijele na oligomanozni, kompleksni i hibridni tip kojima je zajednički „sržni“ motiv Manα1-6(Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn-X-Ser/Thr (slika 1). Kod oligomanoznog tipa *N*-glikana, manozni ostaci vežu se za sržnu strukturu, dok kompleksni tip ima dvije takozvane „antene“ koje počinju *N*-acetilglukozaminom. Karakteristična struktura hibridnog tipa su manozni ostaci na Manα1-6 ruci te dvije antene na Manα1-3 ruci.[5] Biosinteza eukariotskih *N*-glikana odvija se u ER-u, Golgijevom aparatu te plazmatskoj membrani, a ovisi o vrsti i fiziologiji stanice, konformaciji proteina i dostupnosti slijeda Asn-X-Ser/Thr kao i vrsti aminokiseline X. *N*-glikozilacija među ostalim, mijenja fizikalna svojstva te omogućuje pravilno smatanje proteina prije izlaska iz ER-a.[1,5,6] Započinje vezanjem GlcNAc-P na prekursor dolikol fosfat (Dol-P) te nastankom dolikol-pirofosfata *N*-acetilglukozamina (Dol-P-P-GlcNAc) na citoplazmatskoj strani ER-a.

Prekursor Dol-P sastoji se od pet povezanih izoprenskih jedinica te fosfata koji se nalazi na kraju lipidne molekule. Tijekom translokacije glikanskog prekursora po ER-u, četrnaest šećernih jedinica dodaje se na Dol-P djelovanjem specifičnih glikotransferaza te nastaje $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol čiji se glikanski dio djelovanjem oligosahariltransferaze (OST) prenosi do slijeda Asn-X-Ser/Thr novosintetiziranog polipeptidnog lanca. Slijedi uzastopno odcjepljivanje monomera hidrolazama α-glukozidazom I i II, a prije izlaska glikoproteina iz ER-a, ER α-manozidaza I odcjepljuje manozu s centralne ruke $Man_9GlcNAc_2$ te se u *cis*-Golgijev aparat prenosi *N*-glikan s osam manoznih jedinica. Nadalje, α1-2 manozidaze IA, IB i IC odcjepljuju α1-2Man ostatke do nastanka $Man_5GlcNAc_2$, intermedijera u sintetskom putu hibridnih i kompleksnih glikana.[5] Ukratko će biti objašnjena sinteza kompleksnog tipa *N*-glikana koji započinje u središnjem dijelu Golgijeva aparata, a čiji je put sinteze prikazan na slici 2. *N*-acetilglukozaminiltransferaza I (GlcNAcT-I) dodaje GlcNAc na monomer α1-3Man sržnog dijela intermedijera $Man_5GlcNAc_2$ nakon čega slijedi odcjepljenje α1-3Man i α1-6Man ostataka α-manozidazom II i dodatak drugog GlcNAc-a djelovanjem *N*-acetilglukozamintransferaze II (GlcNAcT-II). Vezanje drugog GlcNAc-a omogućuje stvaranje dvije „antene“ ili „grane“ kompleksnog *N*-glikana, a djelovanjem enzima *N*-acetilglukozaminiltransferaze IV i V (GlcNAc-IV i GlcNAc-V) nastaju *N*-glikani s tri i četiri „antene“. Također, moguća je i sinteza „račvajućeg“ (eng. *bisecting*) GlcNAc-a koji nastaje dodatkom GlcNAc-a *N*-acetilglukozaminiltransferazom III (GlcNAcT-III) na β-manozu sržne strukture bi-antenarnih, a i višerazgranatih kompleksnih *N*-glikana.[6]



Slika 1. Klasifikacija *N*-glikana. Redom su prikazani oligomanozni, komplesni i hibridni tip [6]

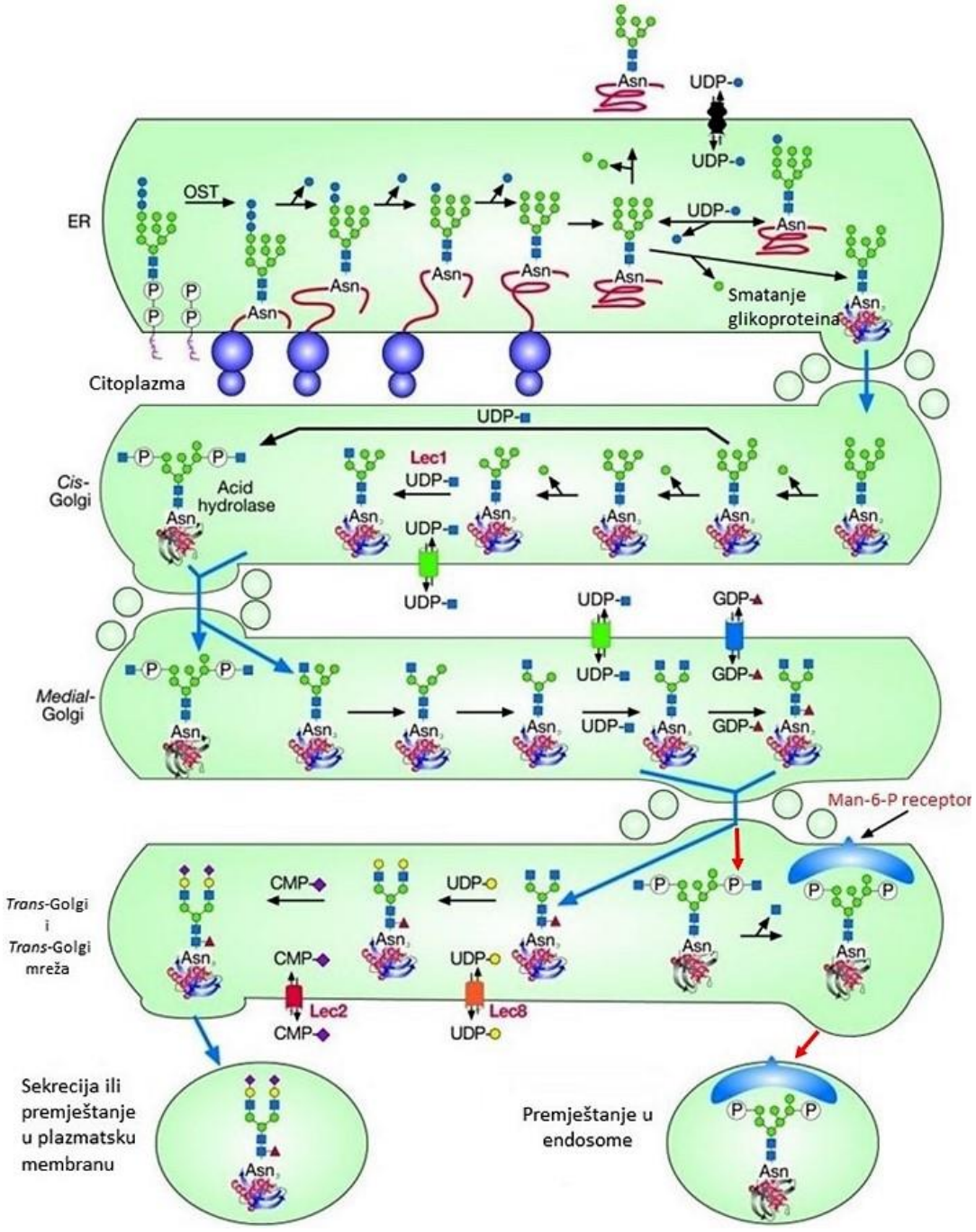
GlcNAcT-III katalizira vezanje GlcNAc-a netom nakon djelovanja α-manozidaze II, GlcNAcT-II te GlcNAcT-IV i GlcNAcT-V ukoliko se sintetiziraju kompleksni glikani s više grana, a daljnje vezanje monosaharida na premoščujući GlcNAc izostaje, osim u slučaju ako je GlcNAcT-II neaktivna.[1,6] Daljnja biosinteza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

Kod kralježnjaka, na sržni dio kompleksnog *N*-glikana najčešće se na α1-6 mjesto sržne strukture dodaje fukoza djelovanjem α(1,3) fukoziltransferaze (FucT-VIII).[6] Takva struktura kompleksnog *N*-glikana prikazana je na slici 1. Osim dostupnosti šećernih supstrata, elongacija i krajnje dodavanje šećera (eng. *capping*) ovisi o prisutnosti i aktivnosti enzima koji sudjeluju u transportu i vezanju šećernih jedinica.[1,6] Zreli glikoprotein se izlučuje putem sekrecijskih vezikula ili se transportira u plazmatsku membranu. Glikozilacijsko mjesto Asn-X-Ser/Thr može sadržavati različite strukture *N*-glikana na istoj molekuli glikoproteina što podrazumijeva pojam mjesno-specifične heterogenosti ili mikroheterogenosti, a glikoforma (glikovarijanta) obuhvaća homogene glikoproteine obzirom na strukturu *N*-glikana vezanih na polipeptidni slijed.

2.2. Imunoglobulini

Imunoglobulini (Ig) ili antitijela su glikoproteini koje sintetiziraju plazma stanice tijekom humoralnog imunološkog odgovora. Njihova uloga je identifikacija i neutralizacija antigena, stranih tijela u organizmu kao što su npr. bakterije i virusi.[7] Građeni su od dva laka lanca (C_L, eng. *light chain*) i dva teška lanca (C_H, eng. *heavy chain*) povezana disulfidnim mostovima. Svaki lanac sastoji se od jednog amino-terminalnog varijabilnog kraja (V) i jednog ili više karboksi-terminalnih konstantnih regija (C) koji imaju 110-130 aminokiselina. Laki lanci, koje dijelimo na lance κ i λ, imaju po jednu domenu C koja zajedno s domenom V ima 25 kDa, a svaki od teških lanaca može imati od 3-4 C domene. Kod Ig-a s 3 C domene kakav je prikazan na slici 3, C_H1 i C_H2 su međusobno povezane disulfidnim vezama u takozvanoj „zglobnoj“ regiji, a njihova masa je otprilike 55 kDa.[7,8] Imunoglobulini se strukturno dijele na fragmente Fc i Fab.

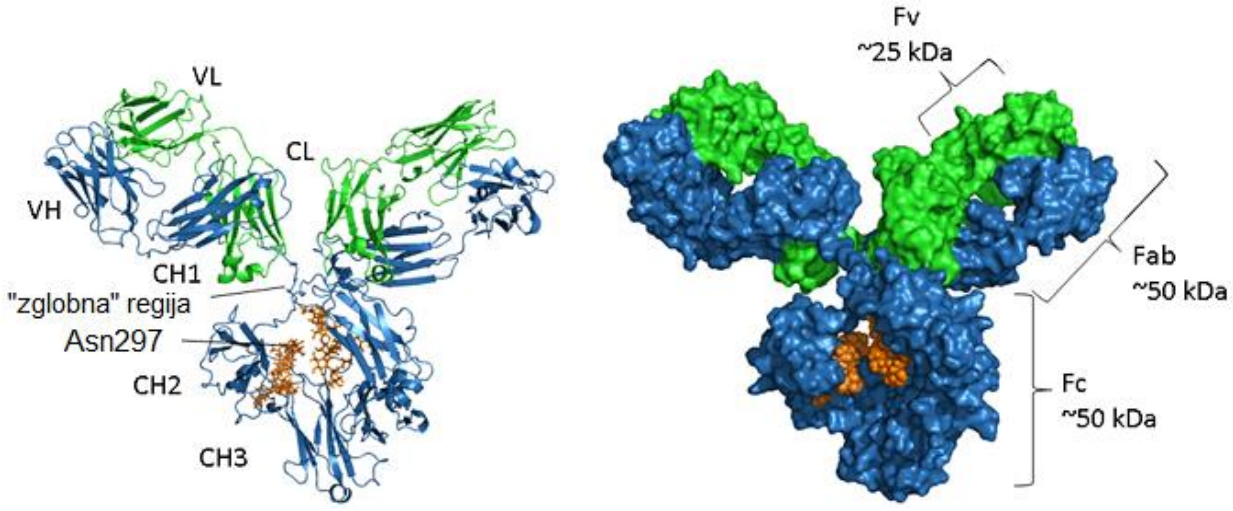
Fragment Fab obuhvaća područje cijelog lakog lanca s domenama V_H i C_H1 teškog lanca, a 6-10 aminokiselina Fab-a koje stupaju u nekovalentne interakcije s antigenom nazivaju se paratop. Fragment Fc sastoji se od domena C_H2 i C_H3, a ima regulatornu i funkcijsku ulogu imunološkog sustava te se prema lancu Fc-a određuju izotipovi i podklase Ig-a. Izotip podrazumijeva istovjetne aminokiselinske slijedove teškog lanca fragmenta Fc koji se označavaju grčkim slovima γ,μ,α,ε i δ, a prema toj podjeli kod sisavaca razlikujemo pet klasa Ig-a: IgG, IgM, IgA, IgE i IgD.[7]



Slika 2. Biosintetski put kompleksnih *N*-glikana (plave strelice) [6]

2.2.1. Biološka uloga N-glikozilacije imunoglobulina G

Imunoglobulini su glikoproteini, a glikozilacijska mjesta, ovisno o klasi Ig-a nalaze se na različitim aminokiselinskim ostacima polipeptida te imaju različite strukturne i funkcionalne uloge.[6] IgG je najzastupljeniji izotip Ig-a u krvi na kojem je provedeno najviše studija među svim klasama Ig-a. Ljudski IgG dijeli se na četiri podklase: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 koje sudjeluju u sekundarnom imunološkom odgovoru te neutralizaciji toksina i virusa, a strukturno se razlikuju u primarnom aminokiselinskom slijedu i broju disulfidnih veza između dva teška lanca. *N*-glikozilacijsko mjesto IgG-a nalazi se na položaju Asn297 polipeptidnog lanca domene C_H2 što je prikazano na slici 3. Najčešće su to kompleksni bi-antenarni *N*-glikani od kojih su najviše zastupljene strukture bez galaktoze (H3N4F), s jednom galaktozom (H4N4F) ili dvije galaktoze (H5N4F). U manjoj mjeri zastupljeni su *N*-glikani s tzv. „račvajućim“ GlcNAc-om (H3N5F1), te krajnjim sijalinskim kiselinama (H5N4F1G1 i H5N4F1G2).[9] Spomenute glikoforme označene su prema nomenklaturi *N*-glikana preuzetih iz komercijalnog softwera *LaCy tools*.[10] Interakcijom sa hidrofobnim „džepom“ fragmenta Fc, glikani stabiliziraju strukturu IgG-a pa tako glikovarijante bez dva GlcNAc-a destabiliziraju, dok glikoforme bez galaktoze na obje antene ne utječu na stabilnost glikoproteina.[11,12]



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

Prijašnje studije pokazale su kako *N*-glikani fragmenta Fc, osim stabiliziranja IgG-a, interakcijom s receptorima Fcγ mijenjaju afinitet vezanja za fragment Fc čime utječu na efektorske funkcije IgG-a. Receptori Fcγ pripadaju obitelji imunoglobulinskih proteina, a nalaze se na stanicama koje sudjeluju u obrani imunološkog sustava kao što su makrofagi, stanice ubojice (eng. *killer cells*), neutrofili i bazofili. Kod čovjeka postoje tri klase FcγR, I, II i III, a razlikuju se prema afinitetu vezanja za fragment Fc i prema signalnom putu kojeg stimuliraju. FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA i FcγRIIIB su aktivirajući receptori, a FcγRIIB ima ulogu inhibitora od kojih jedino FcγRI pokazuje veliki afinitet vezanja za fragment Fc.[3] Osim što prepoznaju antigene, imunoglobulini G interakcijom s FcγR utječu na mehanizme razaranja ciljnih stanica kao što su stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (ADCC, eng. *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*), a vezanjem na komplement C1q na citotoksičnost ovisnu o komplementu (CDC, eng. *Complement Dependent Cytotoxicity*).[7] U današnje vrijeme, monoklonska antitijela koriste se kao terapeutici u liječenju raznih bolesti, a njihove funkcije ovise o sastavu *N*-glikana vezanih na Fc.[2,3,14] Oko 85 % *N*-glikana vezanih na Asn279 fragmenta Fc fukozilirano je na α1-6 poziciji sržne strukture, a potvrđeno je da nefukozilirani *N*-glikani povećavaju afinitet vezanja antitijela na FcγRIIIa, čime pospješuju aktivnost ADCC u *in vivo* i *in vitro* studijama.[15,16] Suprotno tomu, povećan udio krajnjih ostataka sijalinske kiseline smanjuje afinitet vezanja Fc-FcγRIIIa zbog čega slabi aktivnost ADCC. Također, sijalinizacija fragmenta Fc pospješuje protupalni odgovor, a smanjena razina sijaliniziranih i galaktoziliranih IgG-a uočena je kod ljudi oboljelih od reumatoidnog artritisa.[17-19] Povećan udio galaktoziliranih *N*-glikanskih struktura pojačava afinitet za komplement C1q čime pospješuje aktivnost CDC te lizira ciljne stanice.[20] IgG je nefunkcionalan ukoliko se odcijepe Fc *N*-glikani, zbog čega ne dolazi do vezanja Fc-a i receptora.[11] Kako bi se razjasnila uloga *N*-glikozilacije i način interakcije fragmenta Fc i FcγR-a tijekom imunološkog odgovora, proučavaju se modelni organizmi.

2.3. Miševi s uklonjenim genima za receptore Fcγ i γ lanac

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

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

N-glikozilacijsko mjesto Asn295 konzervirano je kod svih kralježnjaka, međutim postoje razlike u glikozilaciji Fc-a mišjeg i ljudskog IgG. Tako se na primjer kod miševa sintetizira citidin-monofosfo-*N*-glikolineuraminična kiselina (CMP-Neu5Gc) koja se sialil-transferazama prenosi do novosintetizirajućeg *N*-glikana u *trans*-Golgijevom kompleksu, dok je kod ljudi supstrat sialil-transferaze *N*-acetilneuraminična kiselina (CMP-Neu5Ac).[6] Udio fukoziranih *N*-glikana IgG-a (95 %) veći je u usporedbi s ljudskim IgG kod kojeg otprilike 85 % *N*-glikana ima vezanu fukozu na sržnom dijelu strukture. Prema dosadašnjim istraživanjima, mišji IgG nema „račvajući“ GlcNAc, dok su glikoforme većinom monogalaktozilirane na α1-3 ruci.[24] Prijašnjim studijima na miševima s uklonjenim genima koji kodiraju za γ teški lanac istražena je i pokazana važnost interakcija Fc-Fcγ u humoralnom imunološkom odgovoru.[25,26]

2.4. Visokoprotočne metode za analizu *N*-glikozilacije

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

Tablica 1. Usporedba visokoprotočnih metoda za analizu *N*-glikozilacije [4]

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

2.5. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

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

$$t_R = t_M + t_N.$$

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

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

MS je tehnika kojom se detektiraju prethodno ionizirane molekule razdvojene u vremenu ili prostoru prema omjeru mase i naboja. Analit se najprije ionizira, a zatim se pri stalnom protoku pokretne faze, preko međuspoja ESI prihvaća protok do 1 mL min^{-1} te eliminira otapalo prije uvođenja u komoru za prijenos iona pri tlaku do $3x10^{-4}$ mbara.[30,31] ESI se temelji na raspršivanju tekućine u sitne nabijene kapljice primjenom jakog električnog polja. Isparavanjem otapala smanjuje se veličina kapljica uz nakupljanje naboja na površini pa se pod utjecajem Coulombovih sila kapljica neprestano dijeli do nastanka iona. Ioni se potom usmjeravaju na kvadrupol te se sustavom leća ubrzavaju prema TOF-u.[29] TOF koji se koristio za analizu glikopeptida sastoji se od ortogonalnog akceleratora, reflektrona (ionsko zrcalo) i detektora. Mjeri se vrijeme *t* za koje ion prijeđe udaljenost *l* od izvora do detektora, a proporcionalno je omjeru mase *m* i naboja iona *z* prema izrazu:

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

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

2.6. Kapilarna gel-elektroforeza s laserom induciranom fluorescencijom

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

$$v = \mu_e \times E$$

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

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

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

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

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

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

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

2.6.1. Metoda HILIC

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

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1. Kemikalije

Acetonitril, UV-HPLC čistoće (ACN) (*Scharlab*), acetonitril, LC-MS čistoće (*J.T.Baker*), amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (*Acros Organics*), citratna kiselina (*Sigma-Aldrich)*, formamid (*Applied biosystems*), dimetil sulfoksid (DMSO), etanol (*Carlo Erba*), formijatna kiselina (FA) (*Merck*), Igepal CA-630 (*Sigma-Aldrich*), izopropanol (*Sigma-Aldrich*) kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (*Sigma-Aldrich*), kalijev klorid (KCl) (*EMD Milipore*), natrijev dodecil-sulfat (SDS) (*Sigma-Aldrich*), natrijev klorid (NaCl) (*Carlo Erba*), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (*Acros Organics*), natrijev hidroksid (NaOH) (*Kemika*), trietilamin (TEA) (*Sigma-Aldrich*), trifluoroctena kiselina (TFA) (*Chromasolv*), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (*Acros Organics*), 2-pikolin boran (PB) (*Sigma-Aldrich*), (*Sigma-Aldrich*), propionska kiselina (*Sigma-Aldrich*)

3.1.2. Enzimi, boje i standardi za veličinu

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

Peptidil-*N*-glikozidaza-F (*PNGaza* F, *Promega*) - 10 U μL^{-1} (1 U - količina PNGaze F koja katalizira oslobađanje *N*-vezanih oligosaharida s 10 μg denaturirane ribonukleaze B pri pH 7,5 i temperaturi od 37 °C u 10 μL tijekom jednog sata).[39] Koristi se za deglikozilaciju *N*-glikana tijekom pripreme uzoraka za metodu CGE-LIF.

APTS (*Sigma-Aldrich*) - fluorofor koji se koristi za označavanje glikana reakcijom reduktivne aminacije za analizu metodom CGE-LIF .[40]

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

3.1.3. Puferske otopine

10 x PBS - 1,370 mol dm^{-1} otopine NaCl, 0,097 mol dm^{-1} otopine Na_2HPO_4, 0,022 mol dm^{-1} otopine KH_2PO_4, 0,027 mol dm^{-1} otopine KCl (pH = 6,6).

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

Pufer za eluaciju IgG-a - 0,1 mol dm^{-3} otopine formijatne kiseline (pH = 2.5).

Pufer za neutralizaciju IgG-a - 1 mol dm^{-3} otopine $NaHCO_3$.

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

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

3.1.4. Pločice

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

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

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

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

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

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

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

3.1.5. Čvrste faze za pročišćavanje

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

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

3.1.6. Uređaji

Centrifuge 5804 (*Eppendorf*) - višenamjenska centrifuga

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

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

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

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

3.2. Korišteni uzorci

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

Standardni i biološki uzorci mišjeg IgG-a izolirani su iz 250-300 μL krvnog seruma divljeg tipa soja C57BL/6 i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju receptore FcγI, FcγIIB, FcγIII i FcγIV te teški γ lanac IgG-a. Standardni uzorci ljudskog IgG-a izolirani su iz 100 μL krvne plazme.

3.3. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme

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

3.3.1. Pripremanje pločice s Proteinom G

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

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

3.3.2. Vezanje imunoglobulina G i eluacija

Filtrirana plazma prebaci se na pločicu s Proteinom G te se primijeni vakuum uređaj za pločice pri tlaku koji ne prelazi 250 mm Hg. Otpipetira se po 2 mL 1x koncentriranog PBS-a koji veže IgG za čvrstu fazu pločice te se filtrira uz vakuum koji ne prelazi 430 mmHg. IgG se eluira s 1 mL otopine formijatne kiseline koncentracije 0,1 mol dm^{-3} u 2 mL pločicu za skladištenje. Primijeni se vakuum uz tlak od 250 mm Hg. IgG se neutralizira dodatkom 170 μL otopine NH_4HCO_3 koncentracije 1 mol dm^{-3}. Nakon korištenja, pločicu potrebno je regenerirati ispiranjem s po 2 mL otopine formijatne kiseline koncentracije 0,1 mol dm^{-3}, 2 mL 10x koncentriranog PBS-a i 2 mL 1x koncentriranog PBS-a. Iza svakog dodavanja navedenih otopina primijeni se vakuum od 430 mm Hg. Pločica s Proteinom G stavi se u pufer za skladištenje i čuva na temperaturi od 4 °C.

3.3.3. Određivanje koncentracije imunoglobulina G

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

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

3.4. Analiza metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa

3.4.1. Razgradnja imunoglobulina G tripsinom

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

3.4.2. Pročišćavanje glikopeptida

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

3.4.3. Analiza glikopeptida fragmenta Fc metodom LC-MS

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

3.4.4. Procesiranje i analiza podataka

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

3.5. Analiza metodom kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranom fluorescencijom

3.5.1. Deglikozilacija

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

3.5.2. Fluorescentno obilježavanje N-glikana

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

3.5.3. Pročišćavanje N-glikana obilježenih APTS-om

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

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

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

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

3.5.5. Procesiranje i analiza podataka

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

4. Rezultati i rasprava

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

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

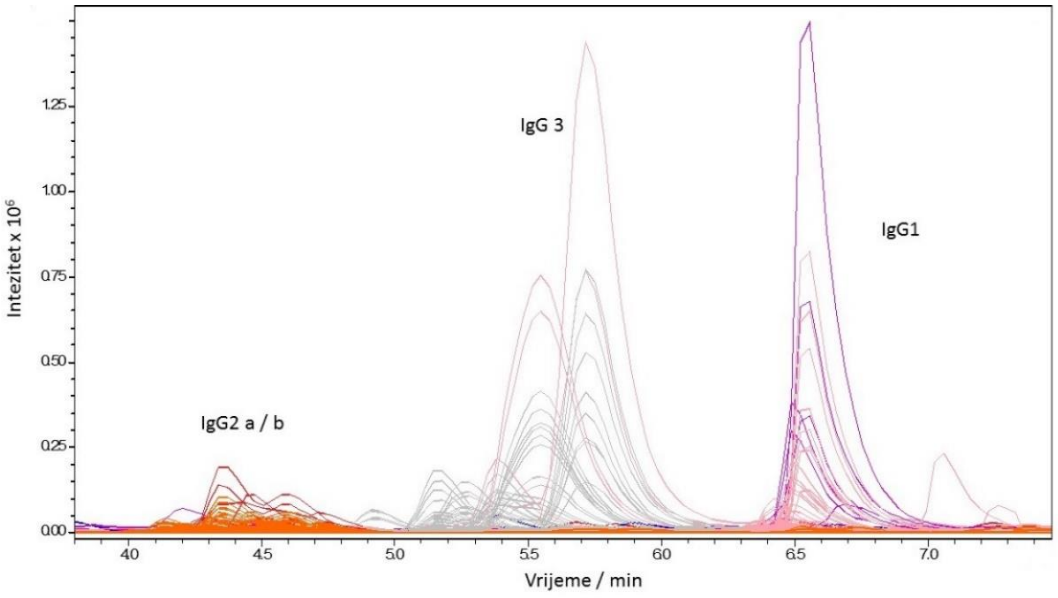
4.1.1. Analiza N-glikozilacije standardnih uzoraka mišjeg imunoglobulina G

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

Pročišćenim, standardnim uzorcima IgG-a koji su izolirani iz seruma miševa divljeg tipa i miševa s uklonjenim genima za FcγR i γ lanac mjerena je koncentracija. Prosječna koncentracija svih uzoraka nakon sušenja u uređaju za otparavanje uz centrifugiranje te resuspendiranja u 40 μL otopine amonijeva formijata, iznosila je 0,68 mg mL^{-1}.

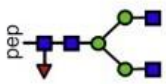
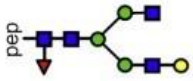
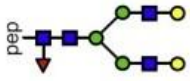
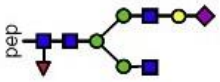
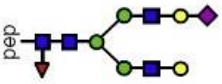
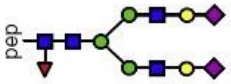
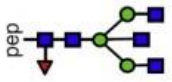
Uzorci IgG-a razgrađeni su tripsinom, nakon čega slijedi pročišćavanje na čvrstoj fazi C-18 i eluacija glikopeptida prema detaljno opisanoj metodologiji u Poglavlju 3.4. Osušeni uzorci pročišćenih glikopeptida resuspendirani su u 20 μL ultra čiste vode prije injektiranja i analiziranja metodom LC-MS.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

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



Slika 4. Kromatogram podklasa mišjeg IgG-a

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

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

a - polipeptidni slijedovi preuzeti su iz baze podataka UniProt [45]

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

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

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

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

4.1.2. Analiza N-glikozilacije bioloških uzoraka mišjeg imunoglobulina G

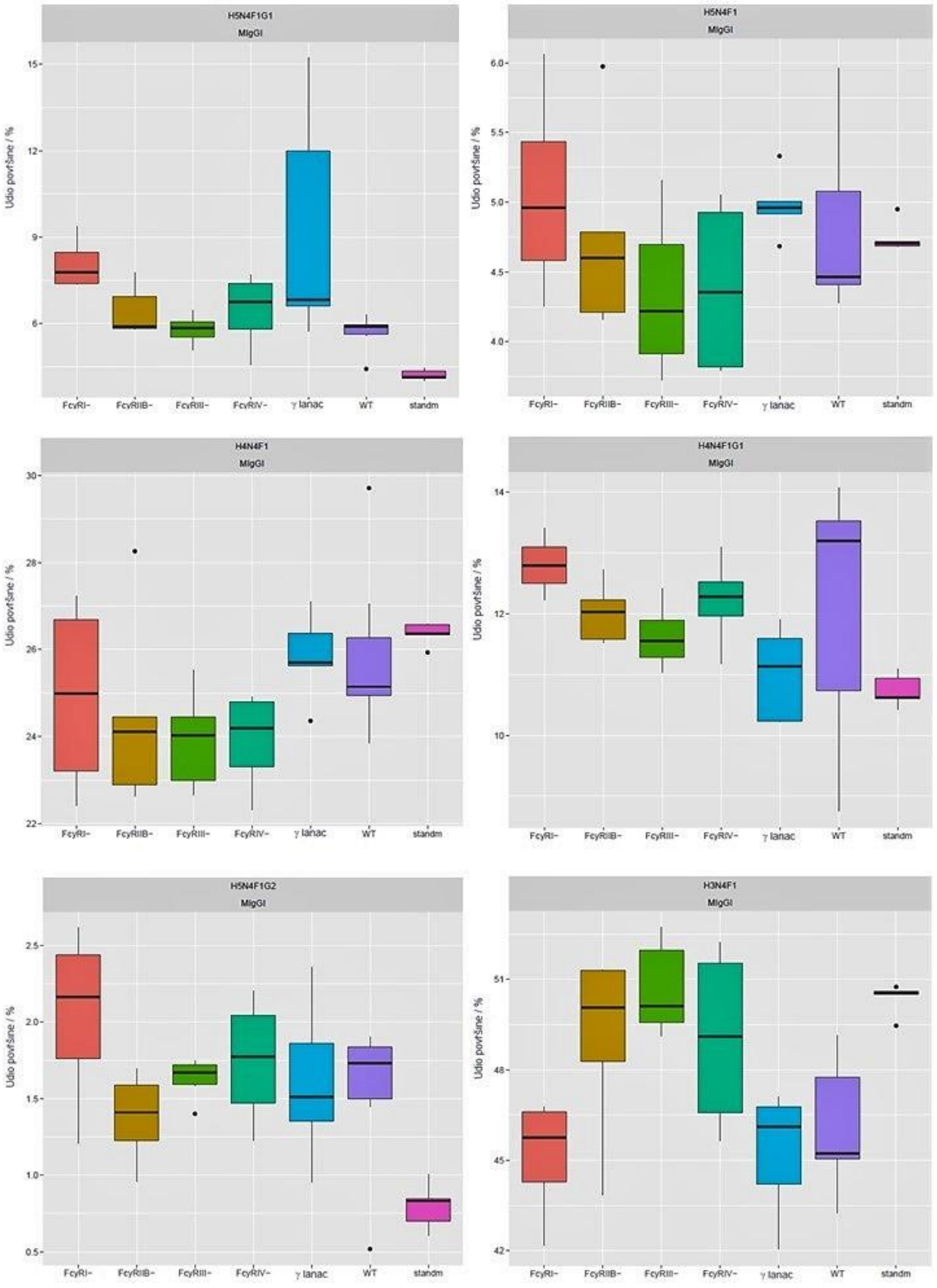
Optimizirana metoda LC-MS za analizu ljudskog IgG-a pokazala se prihvatljivom za daljnju analizu bioloških uzoraka IgG-a izoliranih iz mišjeg seruma divljeg tipa soja C57BL/6 te miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII, FcγRIV i γ teški lanac. Uzorci seruma prije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

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

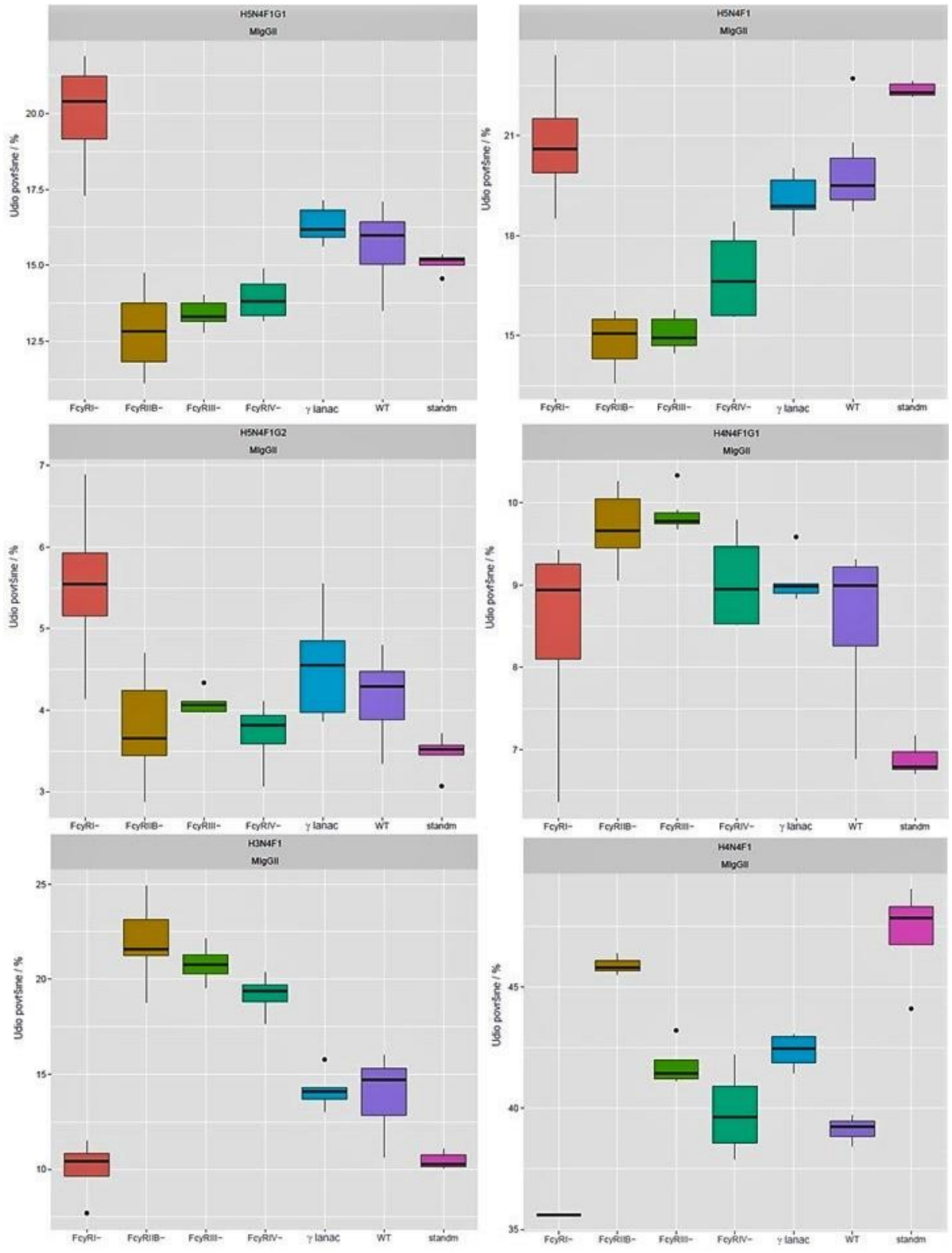
Nadalje, glikoforme H3N4F1, H4N4F1, H5N4F1 podklase IgG3 imaju varijaciju od 5 do 15 %, dok ostale strukture imaju varijaciju > 15 %. Analizirane su 4 tehničke replike uzoraka IgG-a iz jedinke miša starosti 9 tjedana kojem su uklonjeni geni za receptore FcγRI. Glikoforme H3N4F1 i H4N4F1G1 podklase IgG1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

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

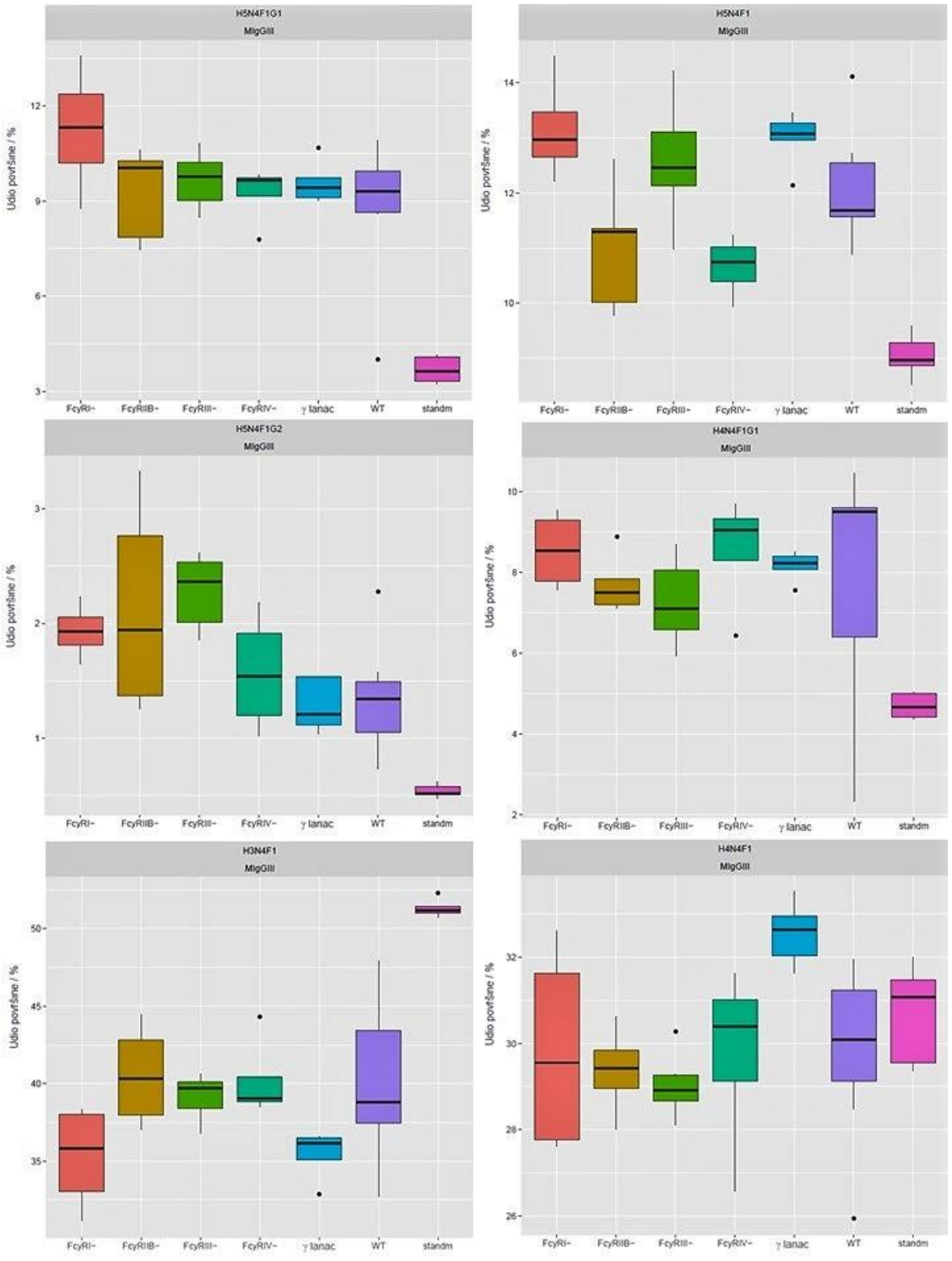
Kao i u prethodnom eksperimentu, premoščujući GlcNAc ne može se identificirati na podklasama IgG2 i IgG3 izoliranog IgG-a iz divljeg tipa i miševa kojima su uklonjeni geni za receptore Fcγ i γ lanac pri uvjetima analize koji su navedeni u *Poglavlju 3.4.3*. Budući da testirani uzorci IgG-a nisu izolirani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



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



Slika 6. Usporedba medijana za udjele normaliziranih površina glikoformi podklase IgG2 izolirane iz seruma C57BL/6 miševa divljeg tipa (n = 7) i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju FcγRI (n = 4), FcγRIIB (n = 5), FcγRIII (n = 6), FcγRIV (n = 4) te γ teški lanac (n = 5) analiziranih metodom LC-MS gdje je n broj tehničkih replika. Standardni uzorak IgG-a izoliran je iz soja C57BL/6 (n = 5). *Box-plot* prikazuje podatke od prvog do trećeg kvartila.



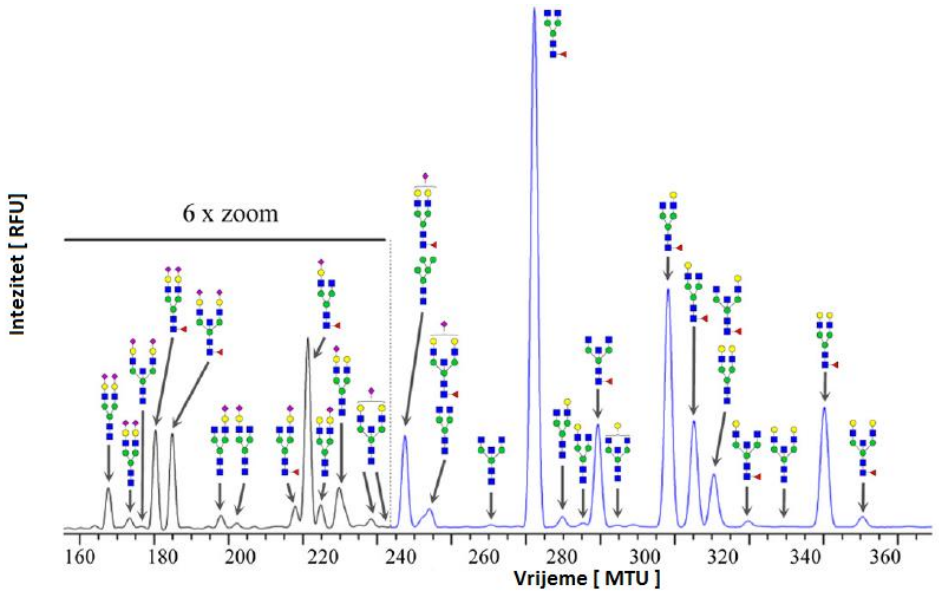
Slika 7. Usporedba medijana za udjele normaliziranih površina glikoformi podklase IgG3 izolirane iz seruma C57BL/6 miševa divljeg tipa (n = 7) i miševa istog soja kojima su uklonjeni geni koji kodiraju FcγRI (n = 4), FcγRIIB (n = 5), FcγRIII (n = 6), FcγRIV (n = 4) te γ teški lanac (n = 5) analiziranih metodom LC-MS gdje je n broj tehničkih replika. Standardni uzorak IgG-a izoliran je iz soja C57BL/6 (n = 5). *Box-plot* prikazuje podatke od prvog do trećeg kvartila.

Tablica 4. Korigirane vrijednosti vjerojatnosti (*p*) dobivene usporedbom medijana udjela normaliziranih površina Mann-Whitneyevim U testom za glikoforme IgG-a izoliranog iz seruma miševa divljeg tipa sa svakim od uzoraka IgG-a miševa s uklonjenim genima koji kodiraju FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII, FcγRIV te γ teški lanac. *p* vrijednosti su korigirane FDR korekcijom, a statistički značajnom smatra se vrijednost < 0,05.

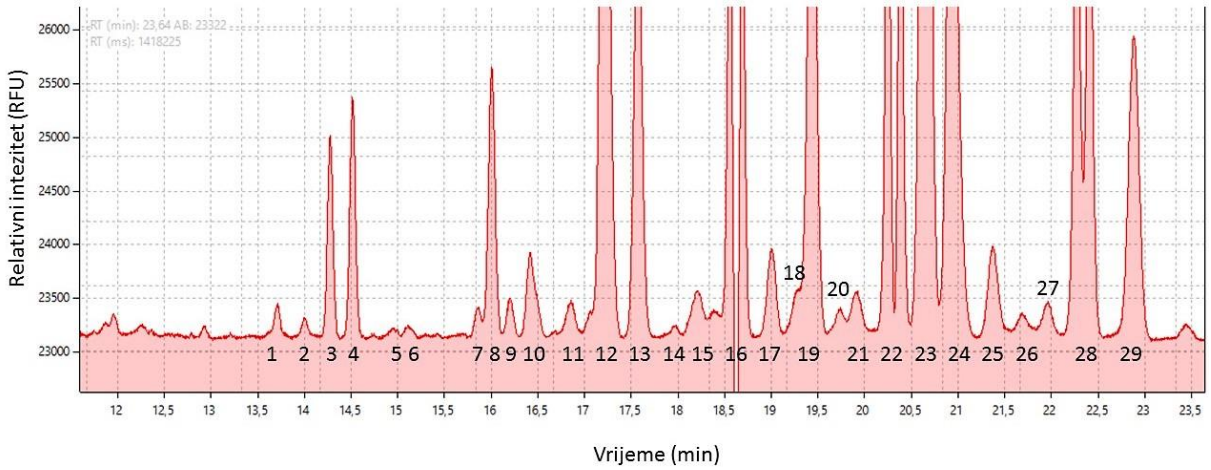
Glikan	mIgG I	mIgG II	mIgG III
	FcγRI		
H3N4F1	0,8325	0,1279	0,5176
H3N5F1	0,5758	/	/
H4N4F1	0,8325	0,2906	1,0000
H4N4F1G1	0,9018	0,9680	0,9018
H5N4F1	0,8325	0,7683	0,3455
H5N4F1G1	0,0480	0,0480	0,3455
H5N4F1G2	0,4201	0,3455	0,2906
	FcγRIIB		
H3N4F1	0,4163	0,0400	0,9353
H3N5F1	0,4163	/	/
H4N4F1	0,4163	0,9018	0,6725
H4N4F1G1	0,6042	0,1120	0,5298
H5N4F1	0,9353	0,0400	0,3455
H5N4F1G1	0,6725	0,1120	0,9353
H5N4F1G2	0,4921	0,6725	0,4921
	FcγRIII		
H3N4F1	0,0400	0,0369	0,9018
H3N5F1	0,5176	/	/
H4N4F1	0,2906	0,7683	0,5603
H4N4F1G1	0,5603	0,0369	0,5176
H5N4F1	0,4163	0,0369	0,6321
H5N4F1G1	0,9760	0,0480	0,8325
H5N4F1G2	0,8325	0,6822	0,0596
	FcγRIV		
H3N4F1	0,3455	0,0480	0,8325
H3N5F1	0,4201	/	/
H4N4F1	0,1279	0,9680	1,0000
H4N4F1G1	0,6725	0,5758	0,9018
H5N4F1	0,7683	0,0480	0,1279
H5N4F1G1	0,5176	0,2015	1,0000
H5N4F1G2	0,8325	0,4201	0,9018
	γ lanac		
H3N4F1	0,9018	0,8325	0,2171
H3N5F1	0,5298	/	/
H4N4F1	0,7683	0,9353	0,0480
H4N4F1G1	0,5298	0,9018	0,5298
H5N4F1	0,5298	0,6042	0,3455
H5N4F1G1	0,1515	0,6725	0,9018
H5N4F1G2	0,9353	0,6725	0,9353

4.2. Analiza *N*-glikozilacije imunoglobulina G metodom kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranom fluorescencijom

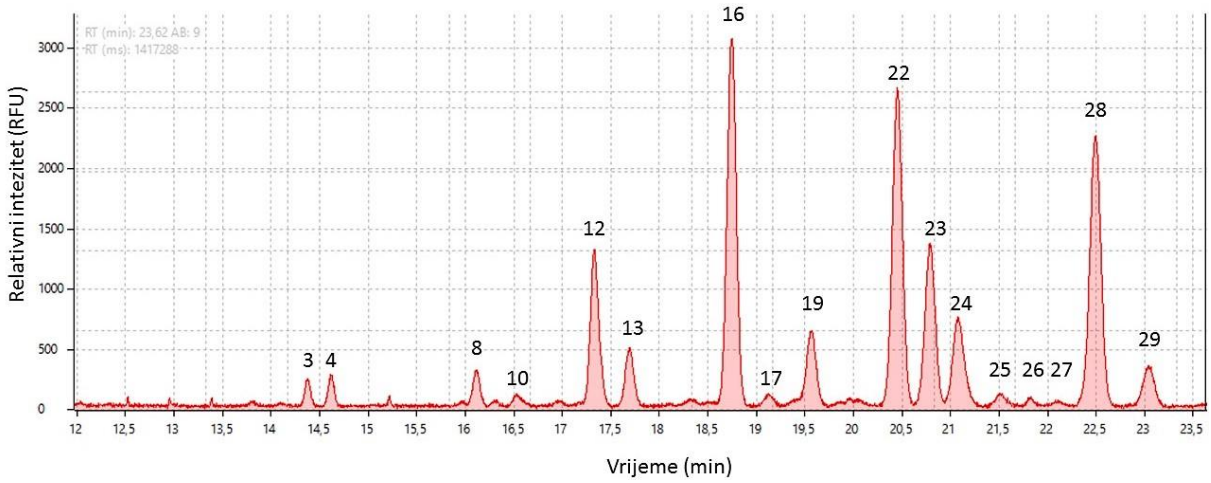
Metodom CGE-LIF analiziraju se slobodni glikani Fab i Fc dijela IgG-a što može dati uvid u strukturu glikana, međutim gubi se informacija mjesno-specifične *N*-glikozilacije fragmenata. Na slici 8. prikazan je reprezentativan elektroforegram *N*-glikozilacije ljudskog IgG-a čijim su pikovima pridružene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



Slika 8. Reprezentativan elektroforegram *N*-glikozilacije ljudskog IgG-a korištenjem metode CGE-LIF.[4]



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



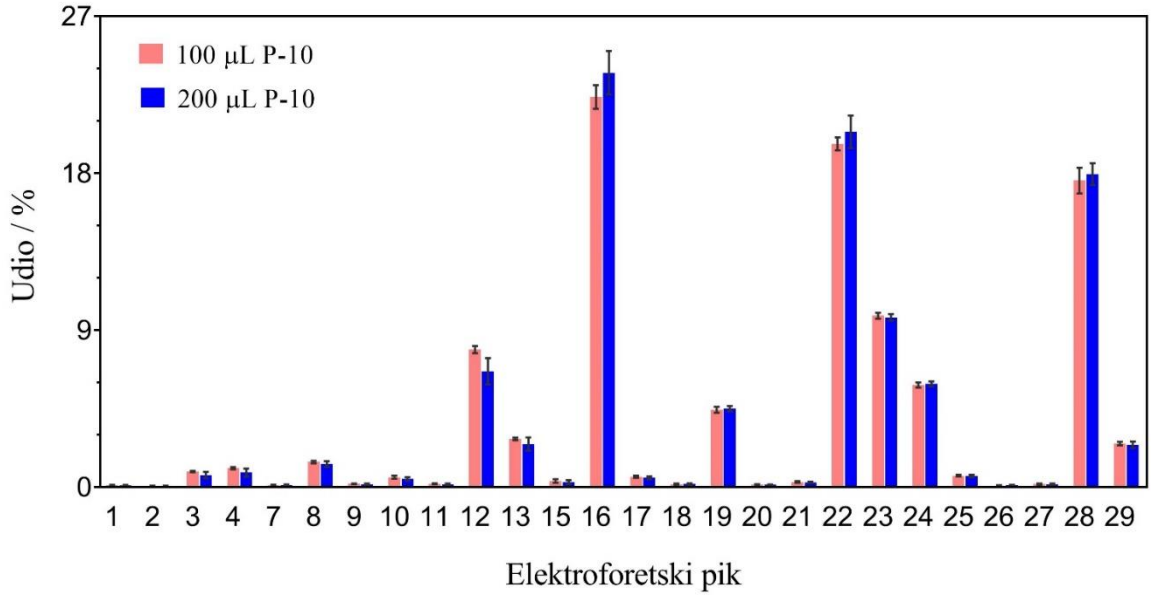
Slika 10. Elektroforegram obilježenih *N*-glikana iz standardnog uzorka ljudskog IgG-a. 1 μL eluata *N*-glikana obilježenih APTS-om prethodno razrijeđenog u vodi 10x, pomiješan je s 9 μL HiDi formamida i 0,02 μL standarda *Gene scan 500 Rox* prije injektiranja. Vrijeme injektiranja je 15 s, a napon injektiranja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

4.2.1. Optimizacija pročišćavanja metodom HILIC

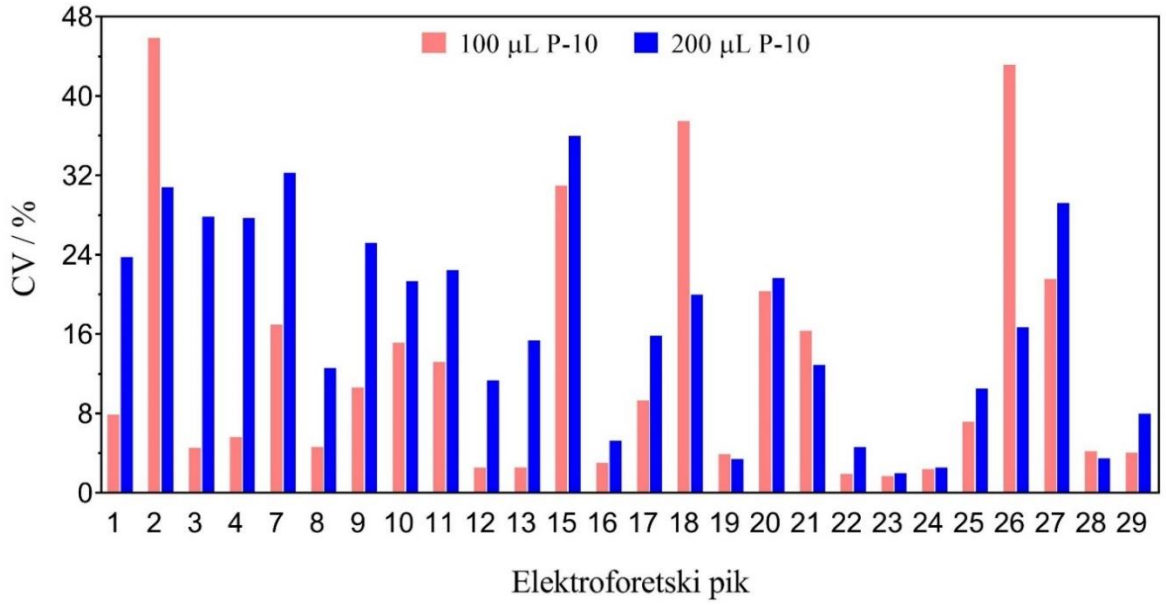
Metoda HILIC na poliakrilamidnoj nepokretnoj fazi Bio-gel P-10 omogućava pročišćavanje glikana obilježenih APTS-om, a u ovome radu testirani su različiti volumeni nepokretne i pokretne faze kako bi se pronašli optimalni uvjeti eluiranja obilježenih *N*-glikana. Uzorci su *N*-glikani iz alikvota od 20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

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

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



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



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

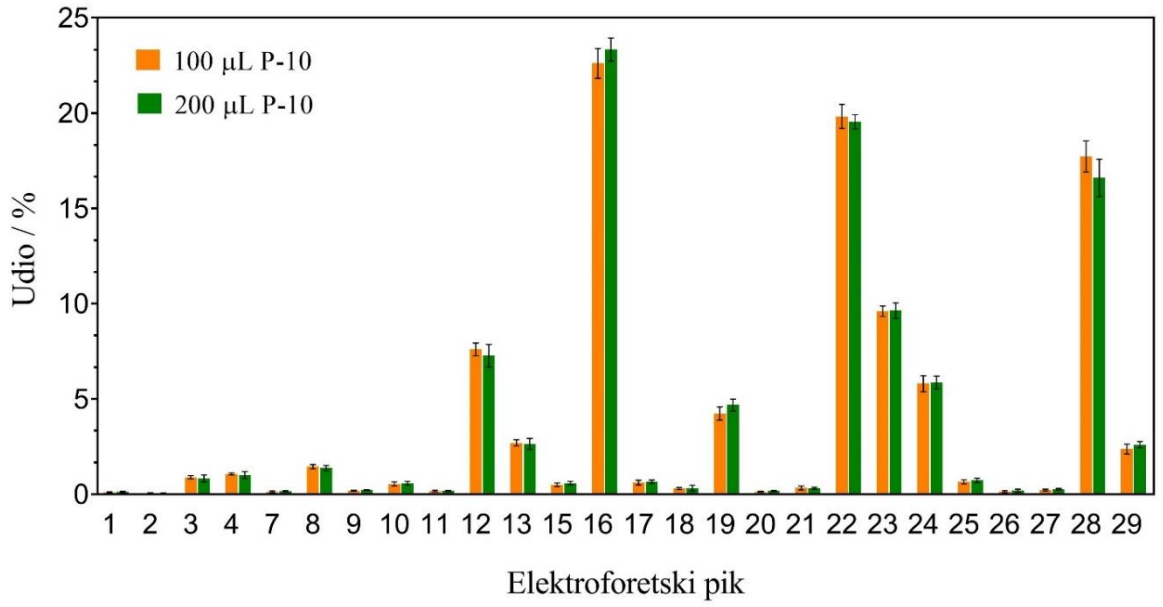
U sljedećem eksperimentu analizirano je 28 tehničkih replika pročišćenih, obilježenih *N*-glikana iz IgG-a izoliranog iz standardnog uzorka ljudske plazme, koji se koristio i u prethodnom eksperimentu. Prilikom pročišćavanja, 14 tehničkih replika *N*-glikana obilježenih APTS-om eluirani su s 100 μL vode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

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

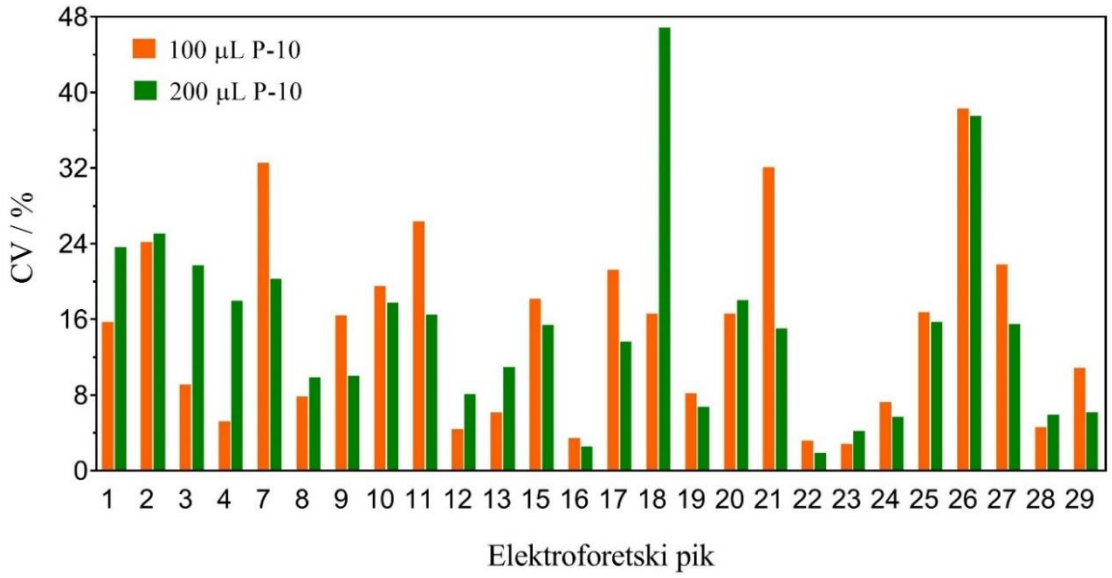
Na slici 13. uspoređeni su udjeli normaliziranih površina 26 pikova za dva različita uvjeta eluiranja metodom HILIC na volumenu nepokretne faze Bio-gel P-10 od 100 i 200 μL za spomenute uvjete injektiranja. 5 glikanskih struktura koje su ujedno i najzastupljenije strukture kod eluiranja na 100 μL Biogel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

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

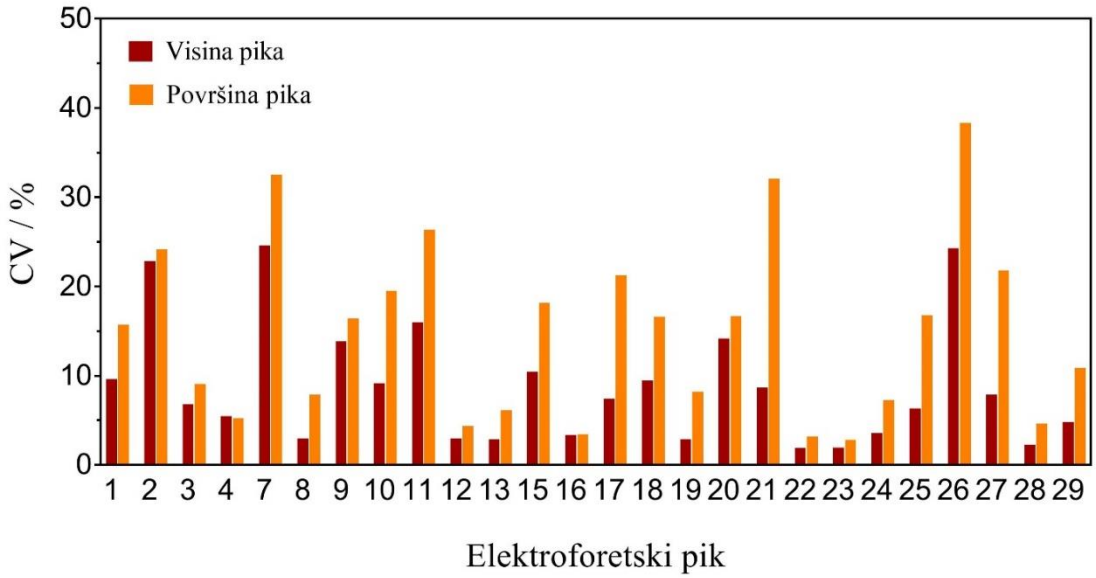
Ukupna prosječna varijacija udjela normalizirane površine pikova je 8,71 % što je manje od prosječne varijacije udjela istih pikova *N*-glikana integriranih preko površine pika koja iznosi 14,98 %. Iz toga proizlazi da način integriranja bitno utječe na varijaciju mjerenih podataka. Budući da korištenje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



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



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



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

5. Zaključak

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

Literatura

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

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

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

6. Prilozi

6.1. Tablice

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

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

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

6.2. Životopis

Ime i prezime: Mia Mrčela

Datum i mjesto rođenja: 30.5.1991., Split

Obrazovanje:

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

Sudjelovanja i priznanja:

2013. 6. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2014. 7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2015. 8. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

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

Radno iskustvo:

veljača - svibanj 2017.	Analitički laboratorij, Istraživanje i razvoj, Pliva d.o.o
rujan - prosinac 2016.	Analytical laboratory, Research and development, Teva Industries Czech s.r.o., u sklopu razmjene Erasmus +