

Populacijska specifičnost glikozilacije imunoglobulina G

Štambuk, Jerko

Doctoral thesis / Disertacija

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:217:804794>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Jerko Štambuk

Populacijska specifičnost glikozilacije imunoglobulina G

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Jerko Štambuk

**Population specificity of
immunoglobulin G glycosylation**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Ovaj je doktorski rad izrađen u laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o., pod vodstvom Prof. dr.sc. Gordana Lauca, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvale

Ovim putem želim zahvaliti svima koji su me podržavali i pomagali mi tokom izrade ovog doktorskog rada.

Hvala mom mentoru prof.dr.sc. Gordanu Laucu na pruženoj prilici i radnim uvjetima kakve mladi znanstvenik može samo poželjeti.

Hvala kolegama iz Genosa što su bili izvor motivacije, ideja i znanja, te najvažnije, smijeha tokom prošlih godina.

Hvala mojoj obitelji koja je vjerovala u mene i podržavala me svim odlukama.

Hvala Kombisti i Grgi što su me trpili sve ove godine, što zasigurno nije bilo lagano.

Na kraju, hvala ti Tami što si moja bolja polovica i činiš me neizmjereno boljom i sretnijom osobom.

Populacijska specifičnost glikozilacije imunoglobulina G

JERKO ŠTAMBUK

Genos d.o.o.

Hondlova 2/11, Zagreb, Hrvatska

Glikozilacija je ključna posttranslacijska modifikacija koja utječe na strukturu i funkciju proteina. Relativno male promjene u glikozilaciji mogu značajno utjecati na proteinsku stabilnost i aktivnost. Imunoglobulin G je najzastupljeniji plazmatski glikoprotein, stoga promjene njegove glikozilacije značajano doprinose promjenama ukupnog N-glikoma. Glikozilacija IgG-a ovisi o spolu i dobi osobe, a povezana je i s različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Veliki broj gena i genskih produkata uključen je u kompleksnu regulaciju glikozilacije, koja je još složenija zbog različitih okolišnih utjecaja. U dosadašnjim istraživanjima uočene su razlike u glikozilaciji IgG-a među analiziranim populacijama, no te razlike nikada nisu sustavno analizirane. U ovom doktorskom radu analizirani su glikanski profili ispitanika iz 24 etničke skupine, koji potječu iz 14 zemalja diljem svijeta i utvrđena je međupopulacijska varijabilnost glikozilacije IgG-a. Pokazno je kako 21% varijacije galaktozilacije IgG-a može biti opisano biogeografskim podrijetlom analiziranih uzoraka. Također je pronađena povezanost ljudskog razvojnog indeksa s monogalaktozilacijom IgG1, pa je primjerice, opaženo da je razina galaktozilacije IgG-a veća u razvijenijim zemljama. Time je dokazan jak utjecaj podrijetla ispitanika, odnosno genskih i okolišnih čimbenika, na glikozilaciju IgG-a.

Ključne riječi: glikomika, visokoprotodne metode, N-glikopeptidi, populacijska studija

Mentor: Prof. dr. sc. Gordan Lauc, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

Izv. prof. dr. sc. Olga Gornik, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

Prof. dr. sc. Alemka Markotić, dr. med., Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Populational specificity of immunoglobulin G glycosylation

JERKO ŠTAMBUK

Genos Ltd.

Hondlova 2/11, Zagreb, Croatia

Glycosylation is essential posttranslational modification which affects protein structure and function. Relatively small changes in glycosylation can significantly change protein stability and activity. Immunoglobulin G (IgG) is glycoprotein which significantly contributes to N-glycome changes due to its relatively high concentration in plasma. IgG glycosylation is associated with different physiological and pathological states, gender and age. Large number of genes and gene products are involved in complex regulation of glycosylation, which is even more complex because of environmental influence. Many previous studies reported differences in IgG glycosylation between analysed cohorts, but these studies were never conducted on a larger number of samples. In this thesis, IgG Fc glycopeptide profiles of 24 separated populations from 14 different countries were analyzed, in order to determine interpopulational variability of IgG Fc glycosylation in different parts of the world. Results of statistical analysis showed that up to 21% of galactosylation variation can be explained by biogeographical origin of samples. It has been also shown that IgG Fc galactosylation levels are higher in more developed countries. By this manner, a strong influence of subject's origin, i.e. genetic and environmental factors, on IgG glycosylation has been proven.

Keywords: glycomics, high-throughput methods, *N*-glycopeptides, populational study

Supervisor: Prof. Gordan Lauc, Ph.D., Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
University of Zagreb

Reviewers: Prof. Kristian Vlahovček, Ph.D., Faculty of Science, University of
Zagreb

Assoc. Prof. Olga Gornik, Ph.D., Faculty of Pharmacy and
Biochemistry, University of Zagreb

Prof. Alemka Markotić, M.D., Ph.D., Clinic for Infectious Diseases "Dr. Fran
Mihaljević"

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Literaturni pregled	2
2.1	Glikozilacija	2
2.1.1	Funkcije glikozilacije	3
2.2	N-glikozilacija	5
2.3	Sinteza N-glikana	6
2.3.2	Kotranslacijska faza glikozilacije	7
2.3.3	Posttranslacijska faza glikozilacije	8
2.3.4	Dozrijevanje glikana	9
2.4	Imunoglobulini	10
2.4.1	Struktura imunoglobulina	11
2.4.2	Izotipovi i promjena klasa	12
2.5	Imunoglobulin G	14
2.5.1	Genetika	14
2.5.2	Podklase imunoglobulina G	14
2.5.3	Odgovor na antigene	15
2.6	Glikozilacija imunoglobulina	16
2.6.1	Uloga glikozilacije u Fc fragmentu	17
2.7	Aktivacija komplementa	20
2.8	Metode analize glikana	21
2.9	Populacijske studije	23
2.9.1	Klasificiranje populacije prema indeksima razvoja i napretka	24
3	Ispitanici, materijali i metode	25
3.1	Ispitanici	25
3.2	Materijali	28
3.2.1	Korištene kemikalije	28

3.2.2	Pribor i uređaji.....	29
3.3	Metode	30
3.3.1	Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme ili seruma	30
3.3.2	Određivanje koncentracije IgG-a nakon izolacije iz seruma ili plazme.....	31
3.3.3	Tripsinizacija i pročišćavanje glikopeptida.....	31
3.3.4	Separacija i mjerenje glikopeptida	31
3.3.5	Predprocesiranje podataka.....	32
3.3.6	Izračun deriviranih svojstava	33
3.3.7	Analiza podataka	35
4	Rezultati.....	38
4.1	Varijabilnost glikozilacije Fc fragmenta specifične za podklasu imunoglobulina G	40
4.1.1	Galaktozilacija.....	41
4.1.2	Sijalinizacija	41
4.1.3	Rasijecajući GlcNAc	41
4.2	Glikozilacija Fc regije imunoglobulina G u različitim populacijama.....	42
4.2.1	Varijabilnost galaktozilacije u analiziranim populacijama	43
4.2.2	Varijabilnost sijalinizacije u analiziranim populacijama	47
4.2.3	Varijabilnost rasijecajućeg N-acetilglukozamina u analiziranim populacijama	47
4.3	Dob i spol	51
4.4	Glikozilacija imunoglobulina G korelira s faktorima razvijenosti zemlje	52
4.4.1	Monogalaktozilacija	53
4.4.2	Agalaktozilacija.....	55
4.4.3	Digalaktozilacija.....	56
4.5	Utjecaj biogeografskog podrijetla i zemlje na varijabilnost glikozilacije imunoglobulina G	57

4.6	Usporedba različitih populacija izuzetih u istom kliničkom centru.....	58
5	Rasprava	60
5.1	Varijabilnost glikozilacije Fc fragmenta imunoglobulina G	62
5.2	Razina galaktozilacije prati trend razvoja određene zemlje.....	65
5.2.1	Galaktozilacija imunoglobulina G opisuje zdravlje ispitanika	65
5.2.2	Galaktozilacija imunoglobulina G uvjetovana je socioekonomskim statusom..	67
6	Zaključci	69
7	Literatura	70
8	Popis kratica	85
9	Životopis	88

1 Uvod

Glikozilacija imunoglobulina G je ključna za njegovu biološku aktivnost, a promjene u glikozilaciji su povezane s različitim patološkim stanjima, dobi i spolom osobe. U prethodnim studijama je uočena varijabilnost glikozilacije među općim populacijama koja do sada nije sustavno istražena. Predloženo istraživanje predstavlja prvu sustavnu analizu varijabilnosti imunoglobulina G među različitim populacijama u svijetu iz kojega će se dobiti podaci o utjecaju biogeografskih i razvojnih čimbenika na varijabilnost glikozilacije imunoglobulina G te omogućiti bolje razumijevanje ovog procesa.

Unutar populacije postoji velika varijabilnost u strukturi N-glikana IgG-a i ukupnog N-glikoma proteina plazme. Istovremeno su longitudinalne studije pokazale stabilnu dugoročnu regulaciju glikozilacije unutar pojedinaca. Nekoliko je studija već pokazalo postojanje određenih genskih faktora koji utječu na razine pojedinih N-glikana. Međutim, razmjer genskih i okolišnih utjecaja na glikane je još uvijek nedovoljno istražen.^{1,2}

Cilj ovog istraživanja je ispitati varijabilnost glikozilacije ljudskog imunoglobulina G među populacijama iz različitih dijelova svijeta. S obzirom da na glikozilaciju utječe velik broj gena i različiti okolišni čimbenici odrediti će se utjecaj biogeografskiog podrijetla uzoraka i države na glikozilaciju ovog proteina.

S obzirom da su u prijašnjim istraživanjima uočene razlike u glikozilaciji IgG-a među različitim analiziranim kohortama, očekujemo značajne razlike u varijabilnosti glikanskih profila među ovim populacijama kao posljedicu populacijske specifičnosti same glikozilacije ovoga proteina.

2 Literaturni pregled

2.1 Glikozilacija

Glikani su uz nukleinske kiseline, proteine i masti četvrta osnovna građevna jedinica stanice. Glikozilacija je proces enzimatskog dodavanja oligosaharida (glikana) na proteine i lipide. To je vrlo česta kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina. Više od 50% ljudskih proteina je glikozilirano, od čega su dominantno glikozilirani proteini na staničnoj površini i ekstracelularni proteini.^{3,4} Pravilna glikozilacija je ključna za vijabilnost većine organizama jer glikani imaju bitnu funkciju u biološkim procesima poput smatanja i uklanjanja proteina, međustanične adhezije, vezanja na receptore i njihove aktivacije.

Glikozilacija značajno pridonosi strukturnoj heterogenosti proteina. Utječe na biološku funkciju i fiziološka svojstva proteina poput topivosti, konformacije, smatanja i stabilnosti.⁵ Nekoliko tisuća različitih glikana može biti sastavljeno promjenom broja, tipa ili redoslijeda šećera koji se nalaze u glikanu.⁶ Osim toga, proteini mogu na više različitih mjesta imati različite tipove glikozilacije što dodatno doprinosi broju mogućih glikoformi.³ Glikom sisavaca sadržava do tisuću glikanskih struktura i mogao bi biti veći od proteoma. Upravo brojnost glikoproteina i razina kompleksnosti ukazuje na važnost ove modifikacije. Pretpostavlja se da glikom, koji je ukupan set svih glikana u eukariotskoj stanici, sadržava više od milijun različitih struktura, koje sadržavaju preko 10 000 glikanskih epitopa za interakcije s različitim molekulama kao što su protutijela, lektini, receptori, toksini, mikrobni adhezini ili enzimi.^{6, 7}

Ovisno o prirodi veze između šećera i peptida te vrsti dodanih šećera, glikani mogu biti svrstani u različite kategorije. Najčešći oblici su N-, O- i C-glikozilacija, glipitacija te fosfoglikozilacija. Najzastupljeniji oblik je N-glikozilacija, u kojoj su glikani vezani na protein preko asparaginskog nastavka N-glikozidnom vezom. O-glikozilacija je sljedeći tip po zastupljenosti s 10% udjela u glikoproteinima. O-vezani glikani se vežu na kisikov atom serina ili treonina ali za razliku od N-glikana nemaju specifičnu sekvencu na koju se vežu. Fosfoglikozilacija je do sada pronađena samo u nekoliko organizama. Fukoza i GlcNAc vezani na fosfoserin su pronađeni u *Dictyostelium discoideum*, manosa u *Leishmania mexicana*, i ksiloza u *Trypanosoma cruzi*. Glipitacija je poseban oblik glikozilacije u kojoj su proteini vezani na lipidno sidro preko glikanskog lanca.⁸

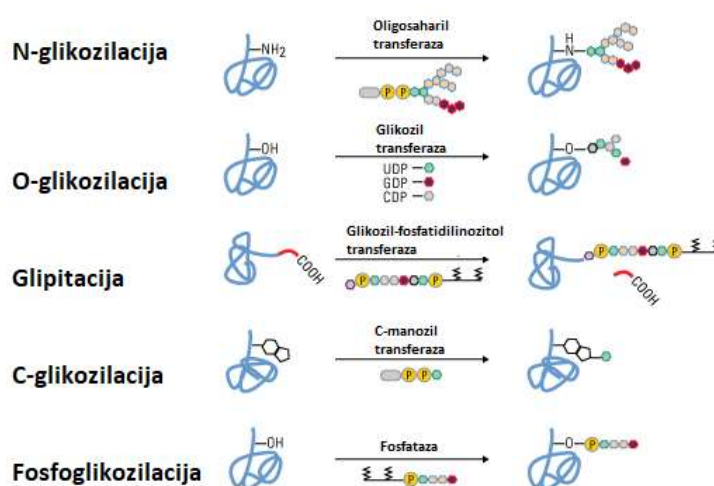
Za razliku od proteina koji su definirani određenim genom, glikani nisu kodirani u genomu. Umjesto toga su sintetizirani kompleksnim biosintetskim putevima koji uključuju različite enzime, supstrate, transkripcijske faktore i okolišne čimbenike.⁹

2.1.1 Funkcije glikozilacije

Površine stanica su prekrivene glikanima. Glikokaliks se sastoji od glikoproteina, glikolipida i proteoglikana vezanih na staničnu membranu. Mnogostruko je deblji od same plazmatske membrane i time dominira staničnom površinom.¹⁰ Prema tome, gotovo sve interakcije stanice s drugim stanicama, proteinima, izvanstaničnim matriksom i mikroorganizmima su posredovane glikanima. Glikani na površini stanice su često ligandi za lektine, proteine koji vežu šećere. Interakcije glikana i lektina su ključne za mnoge stanične procese poput adhezije i migracije stanica, prijenosa signala, vezanja patogena i razlikovanja stranih antigena od vlastitih.^{5,11} Primjer lektina je L-selektin koji je eksprimiran na limfocitima. Prepoznaje glikane vezane na endotel venula perifernih limfnih organa. Interakcija između L-selektina i glikana omogućava migraciju limfocita iz krvi u limfne čvorove. Također, slične interakcije su bitne za održavanje upale tokom koje limfociti migriraju iz krvi u upaljeno tkivo.¹² Oplodnja jajne stanice je još jedan primjer za interakcije između lektina i glikana.¹³ Virus gripe također lektinom na virusnoj ovojnici prepoznaje sijalinske kiseline na stanici domaćina čime započinje proces infekcija stanice domaćina.¹⁴

Razlike u terminalnim šećerima na antenama i različiti broj antena u glikanu proteina utječe na poluživot nekih membranskih i cirkulirajućih proteina. Na primjer, vijek citokina i receptora za faktore rasta ovisi o strukturi N-glikana vezanih na te receptore. Ovi receptori vezanjem liganda mogu aktivirati stanične procese poput proliferacije, diferencijacije, migracije te apoptoze stanica. Prema tome, sastav glikana na tim receptorima regulira njihovu dinamiku što određuje sudbinu same stanice.¹⁵ Glikani također kontroliraju klirens proteina iz cirkulacije. Lutein ima N-glikane koji na antenama mogu sadržavati sijalinske kiseline ili sulfonirani GlcNAc. Varijante koje imaju više sijalinskih kiselina i manje sulfoniranih struktura imaju duži životni vijek upravo zato jer sulfonirani oblici imaju mnogo brži klirens u jetri.¹⁶ Rekombinantni eritropoetin, koji se koristi za liječenje anemije, može imati veći poluživot ako glikani završavaju sa sijalinskim kiselinama. Isto se dogodi ako se eritropoetin modificira genetičkim inženjerstvom čime mu se doda novo glikozilacijsko mjesto.¹⁷

O-GlcNAc, koji je tip O-glikozilacije proteina, ima jedinstveno svojstvo za razliku od drugih tipova glikozilacije. O-GlcNAc može blokirati fosforilaciju proteina i time regulirati aktivnost samog proteina. Fosforilacija i O-GlcNAc mogu se nalaziti na serinima i treoninima u proteinu. O-GlcNAc može onemogućiti fosforilaciju proteina zauzimanjem samog fosforilacijskog mjesta ili nekog drugog mjesta čime sterički onemogućava fosforilaciju.¹⁸ Nedostatak enzima koji stavlja ovu modifikaciju na protein je smrtonosan na staničnoj razini. Ovo je reverzibilna modifikacija što znači da O-GlcNAc može nekoliko puta biti stavljen i uklonjen s proteina. Stavljanje i uklanjanje ove modifikacije je brzo i omogućava jako brzi odgovor stanice na promjene u razini nutrijenata i stresa.¹⁹ Mnogi jezgri i citoplazmatski proteini uključeni u transkripciju, translaciju i prijenos signala su regulirani na sličan način. Primjer takve regulacije je aktivnost RNA polimeraze. Upravo koraci koji prethode aktivaciji polimeraze uključuju stavljanje O-GlcNAc-a, no sama elongacija ne može nastaviti dok se O-GlcNAc ne ukloni i enzim fosforilira.²⁰

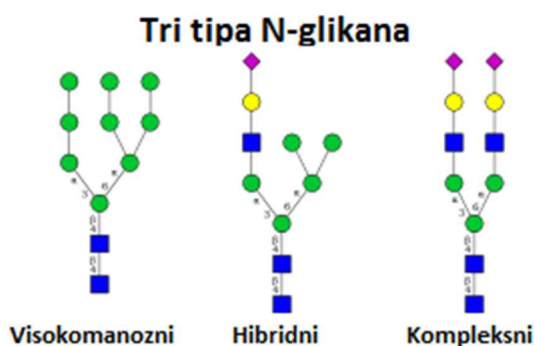


Slika 1: Tipovi glikozilacije proteina. Protein je prikazan kao plava linija s veznim mjestom za modifikaciju. Na strelicama su navedeni enzimi uključeni u prijenos šećera na peptid i prekursori reakcije. Preuzeto sa www.thermofisher.com

Defektivna glikozilacija uzrokuje ozbiljne poremećaje poput kongenitalnih poremećaja glikozilacije.²¹ Promjene glikozilacije su uočene u mnogobrojnim bolestima poput raka, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, autoimunih i upalnih bolesti.^{22,22,23,24,25,26} Glikani ukupnih proteina plazme ili s pojedinih proteina identificirani su kao potencijalni biomarkeri poglavito kao biomarkeri raka i mogu se koristiti u dijagnostičke i terapijske svrhe.²⁷ Populacijske studije pokazuju kako razlike u glikozilaciji su velike među pojedincima i kako te razlike asociraju s podložnosti, progresijom i odgovorom na terapiju neke bolesti. Upravo zato glikani mogu pomoći u stratifikaciji pacijenata prema predispoziciji i prognozi bolesti te odgovoru na terapiju.²⁸

2.2 N-glikozilacija

N-glikani su vezani na protein preko amidnih dušika asparaginskog nastavka N-glikozidnom vezom. Najčešći oblik veze je preko *N*-acetilglukozamina koji je ujedno u sisavcima i prvi šećer u glikanu a veza je u β konfiguraciji. Svi N-glikani dijele zajedničku sržnu strukturu od dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze no razlikuju se u antenama koje su vezane na sržnu strukturu. Upravo prema antenama, N-glikani se dijele na tri tipa: oligomanozni, u kojima su samo manozne jedinice vezane na srž, kompleksni u kojima antene započinju *N*-acetilglukozaminima i hibridni u kojima su manoze vezane na Man α 1-6 srži, a na drugoj ruci se nalazi jedna ili dvije antene kao u kompleksnom tipu glikana.



Slika 2: Tri tipa N-glikana: Visokomanozni glikani koji imaju različit broj manoznih jedinica vezanih na sržne GlcNAc-ove; Hibridni tip glikana koji sadržavaju različit broj manoznih jedinica ali i različito dekoriranu jednu antenu; Kompleksni tip glikana koji sadržavaju različito dekorirane antene. Slika je izrađena u programu GlycoWorkbench verzija 2.

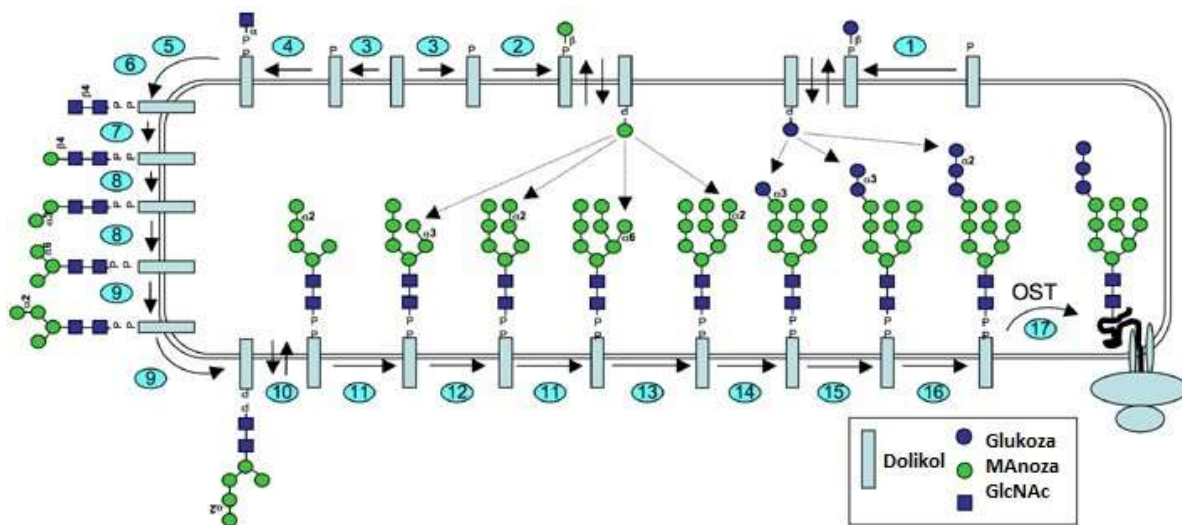
N-glikani se pojavljuju na mnogim sekretiranim i membranskim proteinima na konzerviranoj sekvenci Asn-X-Ser/Thr. Dvije trećine glikoziliranih proteina sadrži spomenutu konzerviranu sekvencu a ukupno 70% konzerviranih sekvenci je glikozilirano (Slika 2).

Prijenos glikana na konzerviranu sekvencu proteina događa se u luminalnoj strani endoplazmatskog retikuluma tokom sinteze samoga proteina i translocira se kroz membranu ER-a pomoću translokona. Membranski glikoproteini ostaju usidreni u membranu endoplazmatskog retikuluma tako da im se dio nalazi u citoplazmi, dio u lumenu, te dio u membrani ER-a. Samo dijelovi proteina koji se nalaze u lumenu ER će dobiti N-glikane. Glikoproteini koji ne sadržavaju transmembransku domenu također kotranslacijski dobivaju glikane i translociraju se u lumen ER.

Iako je konzervirana sekvenca potrebna za vezanje N-glikana, zbog konformacije proteina tokom smatanja, glikan se ne mora nužno vezati. Također, ako je X aminokiselina aspartat ili glutamat to umanjuje efikasnost glikozilacije konzervirane sekvence. Postojanje glikozilacijskog mjesta je uvjet ali ne nužno i dokaz postojanja N-glikana na proteinu.

2.3 Sinteza N-glikana

Biosinteza N-glikana u eukariotima počinje na citoplazmatskoj strani endoplazmatskog retikuluma prijenosom GlcNAc-P s UDP-GlcNAc-a na dolikol fosfat (Dol-P), čime nastaje Dol-P-P-GlcNAc. Nakon toga se dodaje četrnaest šećernih podjedinica prije nego se cijela struktura prebaci na Asn-X-Ser/Thr tek sintetiziranog proteina.²⁹ Nakon toga se glikan remodelira u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu u seriji reakcija kataliziranih membranskim glikozidazama i glikoziltransferazama. Aktivnost ovih enzima ovisi o fiziološkom i biokemijskom statusu stanice u kojoj se protein eksprimira. Zbog toga glikani vezani na asparagin na zrelom glikoproteinu jako ovise o tipu i fiziološkom statusu stanice u kojoj se ekspimiraju (Slika 3).



Slika 3: Biosintetski put N-glikana. Brojevi prikazuju korake dodavanja šećera na dolikolni prekursor koji je prikazan kao sivi pravokutnik u membrani. N-acetilglukozamini su prikazani kao plavi kvadrati, manoze su prikazane kao zeleni krugovi, a glukoze kao plavi krugovi. Ribosom s novosintetiziranim proteinom je prikazan kao dva siva ovala. Preuzeto sa web stranice www.ccre.uga.edu

2.3.1.1 Sinteza glikanskog prekursora (Dol-P-P-glikan)

Dolikol je poliizoprenolni lipid koji se sastoji od izoprenskih jedinica povezanih u linearni polimer. Broj izoprenskih jedinica u molekuli može varirati. Dolikol u kvascima ima 14 izoprenskih jedinica, dok drugi eukarioti, uključujući sisavce, imaju do 19 jedinica.

Sinteza glikanskog prekursora se odvija na citoplazmatskoj strani ER-a prijenosom GlcNAc-P s UDP-GlcNAc na Dol-P vezan na membranu čime nastaje GlcNAc-P-P-Dol. Ovaj korak katalizira enzim GlcNAc-1-fosfotransferaza. U sljedećem koraku sinteze dodaje se još jedan GlcNAc i uzastopno pet manozna na rastući šećer čime nastaje $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ na citoplazmatskoj strani ER-a. Svaki šećer dodaje specifična glikoziltransferaza tako da prenese šećerni dio s nukleotidnog šećera (UDP-GlcNAc ili GDP-Man). Nakon toga $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ se prebacuje na luminalnu stranu ER-a pomoću enzima flipaze.³⁰ U lumenu se na glikanski prekursor dodaju četiri manoze s Man-P-Dol . Na kraju se dodaju tri glukoze s Dol-P-Glc . Dol-P-Man i Dol-P-Glc nastaju na citoplazmatskoj strani ER-a od GDP-Man i UDP-Glc prijenosom na Dol-P, nakon čega ih flipaza prenosi na luminalnu stranu endoplazmatskog retikuluma.³¹ *Mpdul* protein je nužan za dostupnost Dol-P-Man i Dol-P-Glc glikoziltransferazama i manoziltransferazama koje grade zreli glikanski prekursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.³²

Kompleks oligosahariltransferaze (OST) je protein od više podjedinica koji prenosi $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ s prekursora na tek sintetizirani protein.³³ OST se veže na zreli glikanski prekursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ i prenosi $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ kidanjem visokoenergetske veze GlcNAc-P uz oslobađanje Dol-P.³⁴ OST se u kvascima sastoji od 9 transmembranskih podjedinica.³⁵ Sisavci imaju tri različita OST kompleksa, OSTI, OSTII i OSTIII. Razlikuju se u kinetičkim svojstvima i mogućnosti prijenosa glikana s prekursora koji imaju manje od 14 podjedinica.³⁶ Takve glikanske prekursore imaju pacijenti s kognitivnim poremećajima glikozilacije.

2.3.2 Kotranslacijska faza glikozilacije

Nakon prijenosa glikana na konzerviranu sekvencu proteina, nizom reakcija glikan se smanjuje. Početne reakcije su konzervirane u svim eukariotima i imaju ključnu ulogu u pravilnom smatanju proteina zbog interakcija glikana i šaperona (kalneksin i kalretikulin) koji ih prepoznaju u lumenu ER-a.³⁷ Prvo se uklanjaju glukozni nastavci s glikana pomoću enzima α -glukozidaze I i II koje djeluju u lumenu ER-a. Enzim α -glukozidaza I djeluje specifično na terminalnu α 1-2 glukozu dok α -glukozidaza II uklanja ostale dvije unutrašnje glukoze. O ovom procesu ovisi pravilno smatanje proteina i vrijeme koje će glikoprotein provesti u ER-u.³⁸ Samo se s pravilno smotanih proteina uklanja posljednja glukoza. Kastanospermin inhibira aktivnost glukozidaze čime glikan zadržava tri glukoze i gubi jednu ili dvije manoze dok prolazi endoplazmatski retikulum i medijalni Golgijev aparat. Prije izlaska iz ER-a mnogi glikani gube

α 1-2 manozu sa središnje ruke $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ pomoću enzima α -manozidaze čime nastaje $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ izomer. Na nepravilno smotane proteine, s kojih su uklonjene sve tri glukoze topivi enzim endoplazmatskog retikuluma α -glukoziltransferaza ponovno prenosi glukozu te obilježava protein kao nedovršen i ne dopušta mu sudjelovanje u daljnjem procesu. Enzim EDEM prepoznaje pogrešno smotane glikoproteine i obilježava ih za degradaciju. Većina proteina koji izlaze iz ER-a ima 8 ili 9 manozama ovisno o aktivnosti α -manozidaze I.³⁹ Oligosaharid koji nastaje kotranslacijskom fazom glikozilacije naziva se oligomanozni, jer završava nesupstituiranim manozama ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$).

2.3.3 Posttranslacijska faza glikozilacije

U višestaničnim organizmima, uklanjanje α 1-2 manozama se nastavlja u Golgiju djelovanjem α -manozidaze IA, IB i IC u *cis* cisternama Golgijevog aparata što rezultira nastankom $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ glikana koji je ključni intermedijer za nastanak hibridnih i kompleksnih N-glikana. Međutim, neki glikani nisu procesirani do $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ i iz njih ne mogu nastati hibridni i kompleksni glikani. Neki proteini sadrže oligomanozne glikane poput $\text{Man}_5\text{-}_9\text{GlcNAc}_2$. Većina zrelih glikoproteina sadržavaju određen postotak oligomanozних N-glikana koji nisu procesirani u *cis* Golgijevom aparatu.⁴⁰

Nasuprot višestaničnim organizmima, kvasci ne smanjuju $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ kad uđe u Golgijev aparat. Umjesto toga se dodaje još jedna manozama čime nastaje oligomanozna struktura s mnogo razgranatih manoznih nastavaka. Zbog toga kvasci nisu dobri organizmi za proizvodnju rekombinantnih terapijskih glikoproteina osim ako se genetski ne modificiraju da proizvode N-glikane sisavaca.

Biosinteza hibridnih i kompleksnih N-glikana odvija se u središnjim Golgijevim cisternama. N-acetilglukozaminil transferaza-1 (GlcNAcT-I) dodaje GlcNAc na C-2 α 1-3 manoze. Nakon toga α -manozidaza II uklanja terminalne α 1-3 i α 1-6 manoze čime nastaje $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Enzim α -manozidaza II ne može uklanjati terminalne manoze ako GlcNAcT-I ne stavi GlcNAc . Na $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ se potom dodaje drugi GlcNAc na C-2 ugljik α 1-6 manoze pomoću enzima GlcNAcT-II čime nastaje prekursor za sve biantenarne kompleksne glikane. Hibridni tip glikana ima jednu supstituiranu i jednu nesupstituiranu manozu, dok kompleksni tip ima obje manoze supstituirane N-acetilglukozaminom. Hibridni glikani nastaju bez djelovanja α -manozidaze II pri čemu ostaje terminalna α 1-3 i α 1-6 vezana manozama. Enzim α -manozidaza IIX također uklanja terminalne manoze s

GlcNAcMan₄GlcNAc₂. Inaktivacija manozidaze II i manozidaze IIX onemogućava stvaranje kompleksnih N-glikana.

Kompleksni N-glikani imaju dvije antene koje počinju *N*-acetilglukozaminima. Dodatne ruke mogu nastati na C-4 ugljiku sržne α 1-3 manoze i C-6 ugljiku sržne α 1-6 manoze dodavanjem GlcNAc-a pomoću enzima GlcNAcT-IV i GlcNAcT-V čime nastaju tri i tetraantenarni glikani. Peta ruka se može dodati na C-4 ugljik sržne α 1-3 manoze enzimom GlcNAcT-VI. Ovakve jako razgranate strukture su pronađene samo u pticama i ribama.

Kompleksni i hibridni glikani mogu imati rasijećajući GlcNAc vezan na sržnu β -manozu enzimom GlcNAcT-III. Prisustvo rasijećajućeg GlcNAc-a inhibira aktivnost α -manozidaze II, GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV, i GlcNAcT-V. Kompleksni glikani koji imaju više antena mogu nastati ako se rasijećajući GlcNAc dodaje nakon nastanka antena.

2.3.4 Dozrijevanje glikana

Dodavanje šećernih podjedinica na rastući glikan se dovršava u *trans* Golgijevim cisternama. Šećeri se ovdje mogu dodavati na srž glikana, može doći do produživanja antena te završavanja ili dekoriranja antena.

Kod kralješnjaka najčešća modifikacija srži glikana je dodatak fukoze α 1-6 vezane na prvi GlcNAc u glikanu. Beskralješnjaci također imaju fukozu na ovome GlcNAc-u ali ona može biti α 1-3 ili α 1-6 vezana. Također mogu imati do ukupno četiri fukoze vezane na prva dva GlcNAc-a. Biljke imaju fukozu vezanu samo α 1-3 vezom. Fukozil transferaze koje prenose fukozu na srž trebaju aktivnost GlcNAcT-I. Biljke i nematode mogu također imati ksiloze vezanu β 1-2 vezom na manozu srži glikana.

Većina kompleksnih i hibridnih N-glikana imaju produžene antene u kojima se na GlcNAc dodaje naizmjence određen broj galaktoza i GlcNAc-ova. Galaktoze su vezane β 1-4 vezom na GlcNAc i takva jedinica se zove LacNAc (-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-).

Na grane N-glikana se također mogu dodavati sijalinske kiseline, fukoza, galaktoza GlcNAc i sulfat. Ovim reakcijama nastaje velika količina kompleksnih glikana koji se razlikuju u broju, sastavu i dužini antena te modifikacijama srži.

2.4 Imunoglobulini

Protutijela, odnosno imunoglobulini su proteini koje uglavnom proizvode plazma stanice imunološkog sustava. Nastaju kako bi identificirali i neutralizirali patogene poput bakterija i virusa.⁴¹ Protutijelo specifičnim paratopom na Fab regiji prepoznaje i veže epitop na antigenu i time omogućava imunosnom sustavu da ukloni patogen. Protutijela mogu vezanjem na antigen također izravno neutralizirati antigene.⁴²

Imunoglobulini mogu biti u dva oblika: topivi i oblik vezan za plazmatsku membranu. Topivi oblik nastaje lučenjem iz plazma stanice i slobodno cirkulira u krvnoj plazmi, dok oblik vezan za plazmatsku membranu aktivira B limfocit i omogućava diferencijaciju u plazma stanicu ili memorijski B limfocit.⁴³

Imunoglobulini predstavljaju dominantnu frakciju gama globulina u krvi i pripadaju imunoglobulinskoj super obitelji proteina. To je velika skupina membranskih i topivih proteina koji sudjeluju u prepoznavanju, vezanju i adheziji stanica. Članovi ove superobitelji svrstani su na temelju sličnosti u strukturi s imunoglobulinima.

Razina imunoglobulina u serumu daje informaciju o humoralnom imunološkom statusu i rutinski se određuje u kliničkoj praksi. Niske razine imunoglobulina ukazuju na postojanje imunodeficijencija.⁴⁴ Nasuprot tome, povišene razine protutijela (poliklonalne gamopatije) su uočene u bolestima jetre, kroničnim upalnim bolestima, hematološkim poremećajima, infekcijama i malignim oboljenjima.⁴⁵ Razine imunoglobulina su dobar dijagnostički marker za bolesti jetre poput autoimunog hepatitisa i primarne bilijarne ciroze.^{46,47} Postoje razlike u razinama imunoglobulina koje su posljedica razlika u spolovima, dobi, pušenja ili konzumiranja alkohola.⁴⁸ Na primjer, muškarci imaju višu razinu IgM nego žene, a dijabetički pacijenti i dugoročni ovisnici o alkoholu s napredovalim bolestima jetre imaju visoke razine IgA.^{49,50,51} Niža ukupna razina podklasa imunoglobulina G je uočena u populacijama slabijeg socioekonomskog statusa afričkih Amerikanaca i Španjolaca, pogotovo u astmatičnih pacijenata na području istočnog Harlema (New York, SAD).⁵² Također, koncentracija imunoglobulina raste s godinama.⁵³

2.4.1 Struktura imunoglobulina

Imunoglobulini se sastoje od dva teška i dva laka lanca. Laki lanac može biti κ ili λ lanac. Svaki lanac sadržava NH-2 terminalnu varijabilnu regiju i COOH terminalnu konstantnu domenu. Domene sadržavaju po dvije β ploče povezane disulfidnom vezom među konzerviranim cisteinima.⁵⁴ Svaka varijabilna i konstantna regija se sastoji od 110-130 aminokiselina. Laki lanci sadrže jednu, dok teški sadrže tri ili četiri konstantne domene. Teški lanci koji imaju tri konstantne domene sadržavaju zglobnu regiju između prve (CH1) i druge (CH2) domene. L lanac tako ima 25 kDa, dok tri konstantne domene i zglobna regija H lanca imaju 55kDa. Papain reže IgG na dva Fab fragmenta koji vežu antigen i Fc fragment. Pepsin reže IgG na Fc fragment i jedan dimerni F(ab)₂ fragment. Fab sadržava kompletan L lanac te V i CH1 domenu teškog lanca. Fab također može biti podijeljen na varijabilni fragment (Fv) koji se sastoji od VH i VL domene te konstantni fragment (Fc) koji sadržava CL i CH1 domenu.

Imunoglobulini pripadaju skupini glikoproteina koji su međusobno vrlo slični. Sastoje se od 82-96% proteinskog dijela te 4-18% ugljikohidrata. Postoji pet skupina ljudskih imunoglobulina odnosno izotipova. Razlikuju se u strukturi teškog lanca koji daje različite Fc fragmente. Svaki se Fc fragment pojedinog protutijela može vezati na Fc receptor (osim IgD koji je receptor na B stanicama) čime kompleks protutijelo-antigen može aktivirati različite imunosne odgovore ovisno o receptoru na koji se veže. Ova mogućnost protutijela da veže određeni receptor je dodatno regulirana glikanima na konzerviranom glikozilacijskom mjestu na Fc regiji.⁵⁵ Mogućnost protutijela da specifično veže određeni receptor omogućava aktiviranje prigodnog imunog odgovora za određeni antigen.⁵⁶ Na primjer, IgE Fab regijom veže alergijski antigen, a njegova Fc regija veže Fc receptor FcR ϵ . Interakcija alergen-IgE-FcR ϵ uzrokuje aktivaciju signala koji inducira alergijske reakcije poput astme.

Iako je struktura protutijela međusobno slična, hipervarijabilna regija je jedinstvena za svaki imunoglobulin i time omogućava specifično vezanje različitih antigena.⁴¹ Ovakav ogroman repertoar različitih protutijela omogućava prepoznavanje velikog broja različitih antigena. Paratop protutijela je poligenski i tvore ga tri gena: V, D i J. Svaki od lokusa je polimorfan pa tako tokom nastanka protutijela koristi jedan alel V, D i J. Repertoar antitijela se stvori rekombinacijom seta genetskih segmenata koji kodiraju vezna mjesta za antigen. Ovaj rekombinacijski proces se zove VDJ ili VD rekombinacija a nakon nje slijedi nasumična mutacija u ovoj regiji protutijela koja dodatno povećava raznolikost.^{57,58}

2.4.2 Izotipovi i promjena klasa

Protutijela placentalnih sisavaca mogu doći u pet različitih klasa ili izotipova (IgA, IgD, IgE, IgG, i IgM). Razlikuju se u biološkim ulogama, funkcionalnom smještaju i svojstvu da odgovaraju na različite tipove antigena.⁵⁹ Razlikuju se u tipovima teških lanaca (α , γ , δ , ϵ , μ).

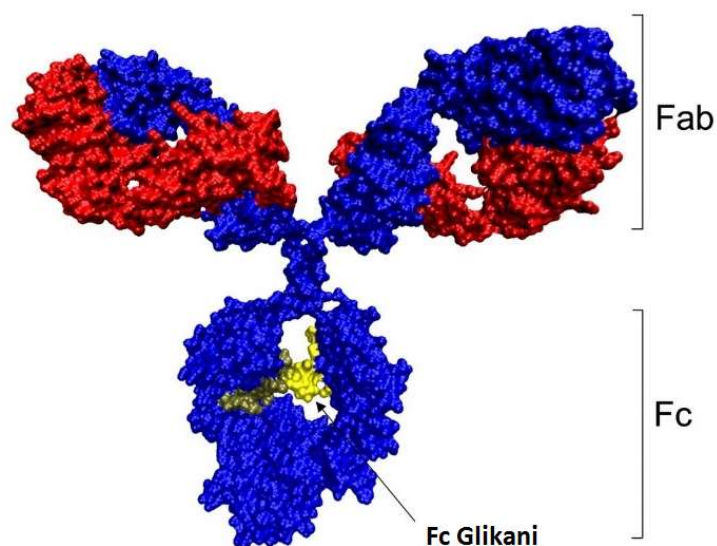
IgA se nalazi u mukoznim organima poput crijeva, dišnog sustava i urogenitalnog trakta. Onemogućava kolonijalizaciju patogena u tim područjima. Također se nalazi u slini, suzama i mlijeku.⁶⁰

IgD najčešće služi kao receptor za antigene na naivnim B limfocitima. Aktivira bazofile i mastocite na proizvodnju antimikrobnih faktora.⁶¹

IgE veže alergene i aktivira oslobađanje histamina iz mastocita i bazofila. Uključen je u alergijske reakcije i štiti protiv parazitskih infekcija.⁶²

IgG predstavlja dominantno protutijelo u humoralnom imunološkom odgovoru protiv patogena. Jedino je protutijelo koje može proći placentnu membranu.⁶²

IgM je eksprimiran na površini B limfocita kao monomer, dok je sekretirani oblik pentamer i ima visoku avidnost. Eliminira patogene u ranim stadijima humoralnog odgovora prije nego što poraste razina imunoglobulina G.⁶³



Slika 4: Struktura i glikozilacija imunoglobulina G. Na ovom strukturalnom modelu protutijela crvenom bojom je označen laki lanac a plavom bojom teški lanac. Glikani vezani na Asn²⁹⁷ Fc fragmenta su prikazani žuto. Zagrade prikazuju antigen-vezujući Fab fragment i fragment koji je zadužen za efektorsku funkciju Fc.⁶⁴

Osnovna funkcionalna jedinica svakog protutijela je monomer. Sekretirana protutijela mogu također biti dimeri poput IgA ili pentameri poput IgM.⁶⁵

Izotip protutijela se mijenja tokom staničnog razvoja i aktivacije B limfocita. Naivni limfocit B, koji nikada nije bio izložen antigenu, eksprimira samo izotipove IgM i IgD na staničnoj membrani. Nakon aktivacije, dolazi do diobe B limfocita i diferencijacije u plazma stanicu koja proizvodi topivi oblik protutijela. U nekim stanicama također, može doći do promjene klase s IgM ili IgD na IgE, IgA ili IgG koji imaju drugačije biološke uloge.

U procesu promjene klase protutijela (engl. *class switching*) također dolazi do reorganizacije gena. Kako bi došlo do promjene izotipa, mora doći do zamjene Fc fragmenata teških lanaca. Na taj način nastaje drugi izotip protutijela koji ima specifičnost za identični antigen. Time se postiže da jedno protutijelo može aktivirati različite Fc receptore ekspimirane na različitim dijelovima imunološkog sustava.⁶⁶ Budući da je svaki izotip specijaliziran za pojedinu funkciju nekad je potrebno više izotipova protutijela specifičnih za isti antigen kako bi ga se efikasno uklonilo. Promjena klase omogućuje upravo takvo stvaranje različitih izotipova koji su specifični za isti antigen. Ovaj proces potiču citokini u okruženju B limfocita.⁶⁷ Promjena klase se odvija u genetskom lokusu za teški lanac rekombinacijom u kojoj se ekson varijabilne regije spaja nehomolognim spajanjem krajeva (eng. *non-homologous end joining*) s konstantnom regijom (γ , α , ili ϵ).⁶⁸

2.5 Imunoglobulin G

IgG je najzastupljeniji imunoglobulin u krvi te se može podijeliti u četiri podklase (IgG1-IgG4). Svaka od četiri podklase na specifičan način veže antigene, formira imune komplekse, aktivira komplement i efektorske stanice te ima jedinstven transport u posteljicu. Također, pojedine podklase IgG-a odgovaraju na različite tipove antigena ili patogena. Nedostatak pojedine podklase nije nužno uvjet, ali često može dovesti do povećane podložnosti određenim skupinama antigena. Svojevrсна specifičnost podklasa za pojedine tipove antigena posljedica je varijabilnosti unutar Ig lokusa i omogućava ovo fino ugađanje imunog odgovora.⁶⁹

2.5.1 Genetika

Imunoglobulini su kodirani s tri nevezane skupine gena. Prva skupina gena na 14. kromosomu kodira za teški lanac molekule, druga skupina na drugom kromosomu kodira κ -laki lanac (engl. *κ -light chain*), dok treća skupina na 22. kromosomu kodira λ -laki lanac (engl. *λ -light chain*) molekule. Varijabilna regija imunoglobulina formira se tokom ranog stadija razvoja limfocita B.

2.5.2 Podklase imunoglobulina G

Podklase imunoglobulina G imaju različita biološka svojstva. Razlikuju se u aktivaciji komplementa, transportu u posteljicu, vezanju na receptore te vezanju antigena.

Zglobna regija omogućava pomičnu vezu između Fab i Fc fragmenata. Duljina i fleksibilnost samog zgloba varira među pojedinim podklasama.⁷⁰ Razlike u zglobnoj regiji uzrokuju različite međusobne položaje dva Fab fragmenta, kao i različite položaje Fab fragmenata u odnosu na Fc fragment. Zglobna regija u IgG1 sadrži 15 aminokiselina i manje je rigidna u odnosu na ostale podklase. IgG2 također ima kraću regiju koja se sastoji od 12 aminokiselina. Sadrži rigidnu poliprolinsku dvostruku zavojnicu koja je stabilizirana s četiri disulfidna mosta koja smanjuje pokretljivost zglobne regije. IgG3 ima najdužu zglobnu regiju među podklasama imunoglobulina G u ljudi. Sadrži 61 aminokiselinu i zbog velikog broja cisteina (11) prolina (21) koji stvaraju poliprolinsku dvostruku zavojnicu ima ograničenu pokretljivost.⁷¹ Također, Fab fragmenti su relativno udaljeni od Fc regije što daje molekuli dodatnu fleksibilnost. Dugačka zglobna regija je posljedica duplikacije eksona koji kodiraju ovu regiju. IgG1, IgG2 i IgG4 imaju po jedan ekson, dok zglobna regija IgG3 ima 4 eksona. Zbog povećane regije IgG3 također ima povećanu masu u odnosu na druge tri podklase. IgG4 ima zglobnu regiju koja se

sastoji od 12 aminokiselina. Kraća je nego na IgG1, a pokretljivost molekule je između IgG1 i IgG2.⁷² Razlike u pokretljivosti zglobne regije utječu na relativnu orijentaciju Fab i Fc regije IgG-a. Najveću fleksibilnost Fab fragmenta ima IgG3 a iza njega slijede IgG1, IgG4 i IgG2.⁷³ Fleksibilnost utječe na vezni kapacitet, formiranje imunih kompleksa te vezanje komponenti komplementa C1q i FcγR.

Četiri podklase imunoglobulina G se također razlikuju u broju disulfidnih mostova koji povezuju dva teška lanca u zglobnoj regiji molekule.

2.5.3 Odgovor na antigene

Priroda samog antigena te put kojim taj antigen ulazi u organizam upravljaju promjenom klasa imunoglobulina. Osim aktivacije B stanica antigenom, mnogobrojni drugi signali također utječu na diferencijaciju B stanice poput liganda za TLR (engl. *toll-like receptors*) i citokina koje proizvode limfociti i antigen-prezentirajuće stanice. Primjer takvog usmjeravanja su proteinski antigeni koji najčešće aktiviraju B stanice uz pomoć T limfocita. Za takve antigene preferentne klase protutijela su IgG1 i IgG3, ali mogu biti i IgG4 ili IgE. U odsutnosti T limfocita polisaharidni antigeni će inducirati proizvodnju IgG2.⁷⁴

2.5.3.1 IgG1

Topivi proteinski antigeni poput otrova tetanusa te membranski proteini najjače induciraju IgG1, dok su druge podklase zastupljene u manjem broju. Deficijencija IgG1 se manifestira u različitim primarnim i sekundarnim deficijencijama te zbog svoje velike zastupljenosti nedostatak ove podklase uzrokuje smanjeni titar IgG-a (hipogamaglobulinemija). Nedostatak ove ili kombinacije ove i deficijencije drugih podklasa je povezan s ponavljajućim infekcijama (engl. *recurrent infections*).⁷⁵ IgG1 se često producira zajedno s IgG3 i ponekad s IgG4 kao posljedica kroničnih izlaganja antigenima u alergijskim bolestima.

2.5.3.2 IgG2

Ova podklasa IgG-a odgovara gotovo isključivo na bakterijske kapsularne polisaharidne antigene.⁷⁶ Deficijencija ove podklase može uzrokovati potpuni nedostatak protutijela protiv ugljikohidrata.⁷⁷ Na važnost podklase IgG2 upućuje povećana podložnost nekim bakterijskim infekcijama koja je povezana sa smanjenim razinama IgG2.⁷⁸ Manjak IgG2 često prati smanjena razina protutijela IgG4, IgA1 i IgA2. Iako IgG2 je najzastupljenije protutijelo za ugljikohidratne antigene, IgG1 nakon takve infekcije također može biti dominantan. Primjer

toga je odgovor na kapsularni polisaharid b virusa *Haemophilus influenza* gdje je IgG1 najzastupljeniji IgG u plazmi.⁷⁶

2.5.3.3 IgG3

IgG3 izvršava efektorske funkcije. Potentno je proupalno protutijelo koje ima kratki poluvijek života preko čega se kontrolira razina upale. Virusne infekcije najčešće uzrokuju povišene razine IgG1 i IgG3. Razina IgG3 raste prva tijekom infekcije. Odgovori na antigene koji uključuju samo IgG3 su rijetki. Primjer su protutijela protiv zglobne regije fragmenta Fab ali ne i cijelog protutijela.⁷⁹ Protutijela protiv P i P^k krvne grupe su uglavnom IgG3 podklasa.⁸⁰ Smanjene razine ove podklase su povezane s deficijencijama drugih podklasa imunoglobulina G.⁸¹

2.5.3.4 IgG4

Alergeni, osim IgE, jako dobro induciraju IgG1 i IgG4. Povišene razine IgG4 pojavljuju se nakon dugotrajnih i ponavljajućih izlaganja nekom alergenu.⁸² Tokom imunoterapije, pojava olakšavajućih simptoma je povezana s povećanjem razine IgG4. Također promjena u podklasu u IgG4 (engl. *class switching*) može biti regulirana pomoću IL-10 što povezuje ovu podklasu s indukcijom tolerancije na antigen.⁸³ Može predstavljati dominantnu podklasu u imunim odgovorima na terapijske proteine poput faktora VIII, faktora IX.^{84,85} Izolirane deficijencije ove podklase su rijetke. Nasuprot tome, postoji skupina poremećaja (IgG4-RD) koji imaju zajedničke simptome poput uz povišene razine IgG4, ulaska IgG4 pozitivnih plazma stanica u tkiva i difuznog oticanja organa ili formiranja fokalne mase s fibrozom.⁸⁶ To su sustavni, kronični i upalni poremećaji koji se pojavljuju u različitim organima.⁸⁷ Ova skupina sadržava širok spektar bolesti i uključuje pacijente s bolestima poput s autoimunog pankreatitisa, hipofizisa, Ridelovog tiroidisa, Mikuliczovljeve bolesti itd. No, budući da 5 % zdrave populacije ima povišenu razinu ove podklase, IgG4 nije dobar marker za ove bolesti.⁶⁹

2.6 Glikozilacija imunoglobulina

Svi ljudski imunoglobulini su glikozilirani, ali u različitoj količini. Na glikane na IgG-u otpada 2-3% ukupne mase glikoproteina. Taj postotak je veći u IgM, IgD i IgE. Fc regija ima konzervirano glikozilacijsko mjesto na Asn²⁹⁷ u svim podklasama. 20% Fab regije također nosi N-glikane čija vezna mjesta (konsenzus sekvence) su rezultat somatskih mutacija koje su pozitivno selektirane.⁸⁸ Većina Fab glikana nalazi se u izloženoj regiji petlje i značajno utječe na vezanje antigena.⁸⁹ IgG iz ljudskog seruma sadrži najčešće biantenarne, kompleksne glikane

od koji na neutralne otpada 86%. Od toga agalaktozilirani zauzimaju 25%, monogalaktozilirani 35%, a digalaktozilirani glikani 20%. Na sijalizirane strukture otpada preostalih 20%. 30% molekula IgG-a sadrži rasijecajući *N*-acetilglukozamin vezna na β -manozi, a 80-92% sadrži sržnu fukozu.^{89,90,91,92} Fc i Fab regije molekule imaju različitu količinu sijalinizacije. Do 80% Fab glikana može biti sijalizirano, dok u slučaju Fc glikana taj postotak je oko 10%. Za razliku od drugih glikoproteina poput fetuina koji sadržava tri i tetraantenarne glikane, takvi glikani nisu pronađeni u IgG-u zdravih ljudi.^{93,94} Ovo ukazuje kako glikozilacijska mjesta na Fab regiji nisu dovoljno izložena enzimima, da B stanicama nedostaju enzimi potrebni za stvaranje struktura s više antena ili na postojanje mehanizma za specifično ugađanje glikozilacije na IgG-u. Nedostatak terminalnog procesiranja glikana može biti uzrokovano ograničenim pristupom glikoziltransferaza u Golgijevom aparatu zbog ograničene fleksibilnosti glikana uzrokovane interakcijama između glikana i proteina. Glikani na Fc regiji su smješteni u blizini C γ 2 domene s kojom stvaraju nekovalentne hidrofobne i elektrostatske interakcije. Sržna struktura glikana i GlcNAc na 6 ruci tvore CH- π interakcije s hidrofobnim aminokiselinama Phe²⁴¹, Phe²³⁴, Val²⁶² i Val²⁶⁴. Također, Glu²⁶⁵ i Arg³⁰¹ stvaraju elektrostatske interakcije s šećerima na reducirajućem kraju glikana. Ove interakcije smanjuju fleksibilnost vezanog glikana i mogući su uzrok smanjenoj terminalnoj galaktozilaciji i sijalizaciji.⁹⁵ Terminalna galaktoza na α 2–6 vezanoj ruci ima interakcije s proteinskom okosnicom čime se dodatno smanjuje fleksibilnost. Fleksibilnost α 2-6 vezane ruke glikana ima sličnu razinu fleksibilnosti kao i Fc fragment, dok α 2-3 vezana ruka ima veću pokretljivost.^{89,96}

2.6.1 Uloga glikozilacije u Fc fragmentu

Ograničeno procesiranje glikana na Fc regiji IgG-a posljedica je smanjenog pristupa glikoziltransferaza u Golgijevom aparatu. Uzrok tome su interakcije između glikana i C γ 2 regije proteina.⁸⁹ Veličina glikana vezanih Fc fragmentu utječe na razmak među C γ 2 domenama što snižava temperaturu taljenja protutijela i ukazuje na strukturalnu nestabilnost.⁹⁷ Narušavanje ovih interakcija pomoću mutageneze hidrofobnih i nabijenih aminokiselina povećava terminalnu galaktozilaciju i sijalizaciju te smanjuje Fc vezanu citotoksičnost.^{95,98} Postoji nekoliko predloženih mehanizama za smanjenu efektorsku funkciju Fc fragmenta. Prvo, povećano terminalno procesiranje glikana, poput sijalinizacije može promijeniti tercijarnu strukturu Fc fragmenta i time smanjiti vezanje na Fc γ R. Razlog tomu može biti povećana fleksibilnost samoga fragmenta zbog smanjenih interakcije između glikana i peptida.^{99,100}

Uklanjanje glikana s Fc fragmenta onemogućuje vezanje protutijela na Fc γ receptore osim Fc γ RIa na koji se veže deset puta slabije u odnosu na glikozilirani oblik.¹⁰¹ Mutacije glikozilacijskog mjesta, kojima nastaje aglikozilirani Fc fragment, onemogućavaju vezanje na sve Fc γ R.¹⁰¹ Također, ako se Fc glikan tretira enzimom EndoS, koji ostavlja samo jedan GlcNAc, vezanje na Fc γ RIIIa je smanjeno.¹⁰² Najmanji glikan koji je potreban za strukturnu stabilnost i efektorsku funkciju Fc fragmenta je jezgri trisaharid.¹⁰³

2.6.1.1 Fukozilacija

Fukoza vezana α 1-6 vezom na srž glikana smanjuje vezanje Fc fragmenta na aktivirajući Fc γ RIIIa receptor 27 puta.¹⁰⁴ Kristalna struktura Fc fragmenta vezanog na Fc γ RIIIa pokazuje interakcije N-glikana vezanog na Asn¹⁶² receptora sa sržnim pentasaharidom Fc glikana. Ove interakcije su jače ako je Fc glikan afukoziliran. Afukozilirani IgG Fc pokazuje povećanu aktivaciju stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC).¹⁰⁵ Razina fukozilacije u IgG-u iz ljudskog seruma iznosi između 80% i 92%, međutim *in vitro* eksprimirani rekombinantni IgG ima razinu fukozilacije preko 90%, što ukazuje na fukozilaciju kao regulatorni mehanizam aktivnosti protutijela.¹⁰⁶ Povišene razine fukozilacije Fc glikana uočene su u pacijenata s trombocitopenijom.¹⁰⁷

2.6.1.2 Galaktozilacija

Količina terminalne galaktoze u glikanima Fc fragmenta utječe na vezanje IgG-a na Fc receptore. 63% ukupnih glikoformi Fc regije je galaktozilirano. Hipergalaktozilacija glikana povećava vezanje Fc fragmenta za Fc γ RIIIA tri puta, vjerojatno zbog povećanja rigidnosti C γ 2 domene.¹⁰⁸ Nasuprot tome, druga istraživanja pokazuju kako hipogalaktozilacija Fc regije povećava vezanje na Fc receptore.⁹⁷ Razina galaktozilacije se mijenja sa starosti,¹⁰⁹ a agalaktozilacija je povezana s upalnim bolestima poput reumatoidnog artritisa.⁹⁷ U ovih pacijenata, razina Fab galaktozilacije je ostala normalna, dok se galaktozilacija Fc glikana smanjila.⁹² Slične razine terminale galaktoze u Fc glikanima su pronađene u pacijentima s drugim upalnim bolestima poput Kronove bolesti i tuberkuloze.¹¹⁰ Zanimljiv primjer su trudnice s reumatoidnim artritisom, koje tokom trudnoće ulaze u remisiju bolesti uzrokovanu povećanom razinom galaktozilacije. Nakon poroda ponovno nastupa hipogalaktozilacija uzrokovana bolešću.¹¹¹ Uzrok smanjene galaktozilacije može biti zbog snižene aktivnosti glikoziltransferaza u B limfocitima¹¹², no to ne objašnjava selektivnu agalaktozilaciju Fc glikana. Predložena su dva mehanizma preko kojih galaktozilacija regulira upalu. Prvi upalni

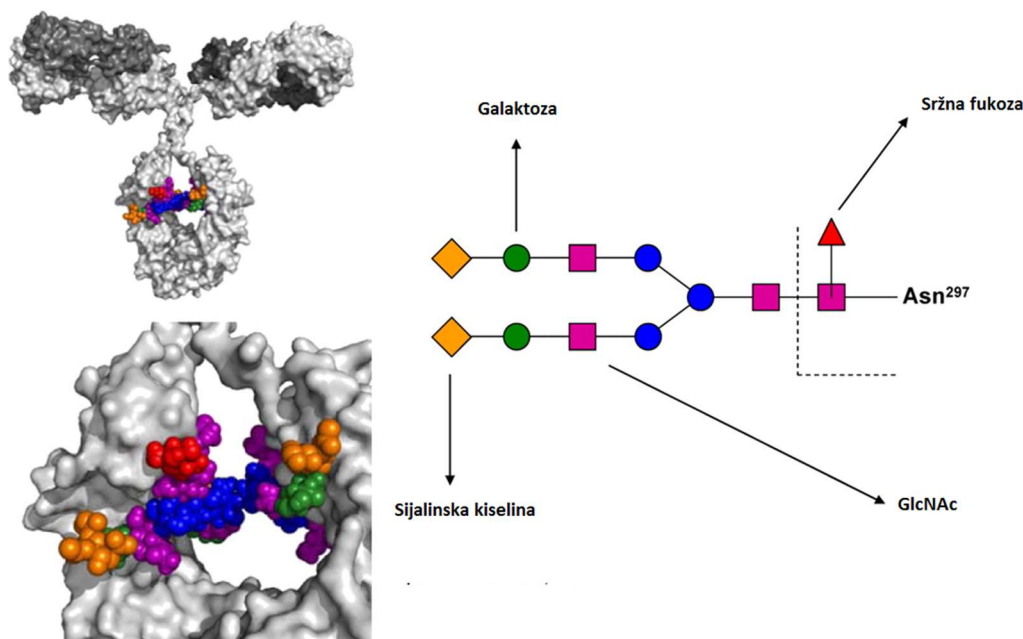
mehanizam opisuje vezanje agalaktoziliranog Fc fragmenta na lektin koji veže manozu koji tada aktivira alternativni put aktivacije komplementa što dovodi do upale.¹¹³ Drugi, protuupalni mehanizam predlaže povećanu galaktozilaciju kao inhibitora upale. U ovom modelu, IgG1 s visokogalaktoziliranim Fc fragmentom veže inhibitorni FcγRIIB i lektin tipa C te tako aktivira inhibitornu kaskadu.¹¹⁴

2.6.1.3 Sijalinizacija

Terminalna sijalinizacija postoji u 10% Fc glikana¹¹⁴ i smanjuje vezanje za FcγRIIIA, FcγRIIB te mišji FcγRIII deset puta.¹¹⁵ Ovakvo smanjenje u vezanju receptora uočeno je i *in vitro* u vezanju hipersijaliziranih monoklonalnih protutijela na receptore.¹¹⁵ Prisustvo sijalinskih kiselina na glikanu utječe na strukturu zglobne regije čime se mijenja vezni afinitet za FcγR.¹¹⁶ Sijalinizacija Fc glikana je regulirana od strane imunološkog sustava. Aktivna imunizacija smanjuje raznu sijalinizacije za 40%.¹¹⁵ Upalni okoliš tokom imunizacije favorizira stvaranje antigen specifičnih IgG-ova sa smanjenom razinom sijalinizacije, no ovakvo smanjenje sijalinizacije tokom imunizacije nije dokazano u mišjim modelima niti u istraživanjima na ljudima.¹¹⁷ Povećana α2-6 vezana sijalinska kiselina na glikanima ima protuupalno djelovanje u miševima i ljudima.¹¹⁵ Također je aktivna komponenta terapije intravenoznim imunoglobulinom G koji se koristi za različite autoimune bolesti.¹¹⁸ α2-6 hipersijalizirani rekombinirani Fc fragment u deset puta manjoj dozi pokazuje isti efekt kao IVIG na autoimunom modelu miša.¹¹⁹

2.6.1.4 Manozna

Visokomanozni glikani tvore malu skupinu ukupnih Fc glikana. Povećavaju Fc afinitet za FcγRIIIA i smanjuju vezanje na FcγRIIB u odnosu na kompleksne biantenarne glikane.¹²⁰ Smanjeno vezanje uzrokovano je nedostatkom sržne fukoze u ovim glikanima koja povećava vezanje za FcγRIIIA.¹⁰⁴ Oligomanozni glikani povećavaju klirens Fc fragmenta u jetri. Razlog tomu može biti vezanje na receptore koji vežu manozu ili zbog uklanjanja manoze serumskim manozidazama.^{121,122} U studijama s radioaktivno obilježenim protutijelima manozni glikani imaju podjednak klirens kao i ostale glikoforme, no terminalna manozna i galaktoza povećavaju katabolizam Fc fragmenta u jetri.¹²³



Slika 5: Na konzerviranom glikozilacijskom mjestu na Asn²⁹⁷ CH2 domene svakog od teških lanaca imunoglobulina G nalazi se N-vezani glikan. U odnosu na prikazanu, različite druge glikoforme (bez ili sa jednom sijalinskom kiselinom, bez ili sa jednom galaktozom, te sa ili bez sržne fukoze i rasijecajućeg GlcNAc-a) mogu biti prisutne na serumskim imunoglobulinima G. Prisustvo različitih glikana uzrokuje različite efektorske funkcije protutijela. Teški i laki lanac su obojani svijetlo i tamo sivom bojom.¹²⁴

2.7 Aktivacija komplementa

Fc glikozilacija je nužna za vezanje C1q i aktivaciju komplementa.¹²⁵ Različite glikoforme različito vežu C1q i time različito aktiviraju citotoksičnost ovisnu o komplementu.¹²⁰ Kompleksni glikani bolje aktiviraju kaskadu komplementa nego hibridni i oligomanozni glikani.¹²⁰ Također, povišena galaktozilacija povećava vezanje na C1q.¹²⁶ Povećana sijalinizacija i/ili fleksibilnost može smanjiti vezanje na C1q. Kada se naruše hidrofbne i elektrostatske interakcije mutiranjem aminokiselinskog slijeda, poraste sijalinizacija i galaktozilacija, a time i oslabi vezanje na C1q što smanjuje aktivaciju komplementa.⁹⁵ Osim vezanja C1q, terminalni GlcNAc veže i protein koji veže manozu čime aktivira alternativnu kaskadu komplementa. Takav mehanizam je predložen da se događa u reumatoidnom artritisu.¹²⁷

2.8 Metode analize glikana

Važnost glikana za strukturu i funkciju proteina više nije upitna u znanstvenoj zajednici, no zbog kompleksnosti strukture i nedostatka genetskog predloška za njegovu sintezu, trenutno znanje o glikanima uvelike zaostaje za onim o proteinima i DNA.⁷ Stoga je potrebno imati robusne i pristupačne metode za visokoprotlačnu glikomiku kako bi se mogle raditi studije s dovoljno velikim brojem uzoraka.

Najčešće korištene metode sa analizu glikozilacije imunoglobulina G su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s fluorescentnim detektorom (HPLC-FLR), gel kapilarna elektroforeza s fluorescencijom induciranom laserom (CGE-LIF), spektrometrija masa s laserskom ionizacijom potpomognutom matriksom (MALDI-MS) i tekućinska kromatografija spregnuta spektrometrijom masa (LC-ESI-MS).¹²⁸

Ključna razlika među metodama koje koriste spektrometriju masa od xCGE-LIF i UPLC-FLR metoda jest ta što posljednje dvije metode analiziraju glikom na razini glikana oslobođenih s proteina (ukupni glikani Fab i Fc fragmenta u slučaju imunoglobulina G), dok se spektrometrijom masa osim glikana mogu analizirati i glikopeptidi. Iako analiza oslobođenih glikana daje detaljnu sliku glikanske strukture, informacija o mjestu vezanja ne može se dobiti ovim tipom analiza. Mjesno specifična informacija o vezanim glikanima dobiva se analizom glikopeptida. Budući da različite podklase IgG-a imaju različitu peptidnu sekvencu oko mjesta glikozilacije na Fc regiji proteina, analiza glikana na glikopeptidima dodatno otkriva sastav glikozilacije specifičan za određenu podklasu. No, za razliku od metoda temeljenih na spektrometriji masa, UPLC-FLR i xCGE-LIF daju informaciji o strukturi samih glikana (razlike između izomera glikana s 3 ili 6 rukom). Primjer toga je razdvajanje izomera FA2[3]G1 i FA2[6]G1, koji imaju različita vremena zadržavanja na koloni, odnosno u kapilari elektroforeze. Sljedeća bitna razlika među metodama je način na koji stvaraju informaciju o količini analita (kvantitativna informacija). Kod UPLC-FLR i XCGE-LIF metoda prednost je to što se samo fluorescentna boja pričvršćena na reducirajući kraj glikana može detektirati i mjeriti. Kod metoda temeljenih na spektrometriji masa kvantifikacija je kompleksnija jer faktor odgovora za svaki peptid je različit i ovisi o strukturi analita i tvari koje s njime koeluiraju¹²⁹. Stoga se apsolutni intenziteti različitih glikana i glikopeptida ne mogu izravno uspoređivati.

Zbog različitih razina na koje se analizira glikozilacija, (oslobođeni glikani u odnosu na glikopeptide) informacija dobivena ovim metodama je slična ali ne i identična. Također,

glikanski sastav izmjeren metodom spektrometrije masa MALDI-TOF-MS je više varijabilan od ostale tri metode.¹²⁸

Upravo zato, trenutno ne postoji metoda koja bi bila 'zlatni' standard za mjerenje glikoma, stoga ne možemo odlučiti koja od navedenih metoda opisuje stvarnu biološku sliku.

2.9 Populacijske studije glikozilacije

Analiza glikozilacije ukupnih proteina plazme na velikom broju ispitanika pokazala je velike interindividualne razlike glikozilacije među ispitanicima. Analizom glikoma plazme na 1008 ispitanika određena je varijabilnost i heritabilnost glikozilacije u populaciji ljudi. Medijan omjera maksimuma i minimuma mjerenih vrijednosti je bio 6,17. Heritabilnost glikana je varirala ovisno o vrsti mjerenog glikana što ukazuje na da utjecaj gena i okoliša varira ovisno o glikanu. Također je pušenje asocirano s glikomom plazme što govori kako bi se ovakve varijable trebale uključiti u buduće genetske studije.¹³⁰ U studiji u kojoj je analizirana glikozilacija imunoglobulina G medijan omjera minimalnih i maksimalnih mjerenih vrijednosti iznosio je 17,2. Varijabilnost G0 je bila od 14% do 70% a G2 od 6 i 47%. Rasijecajući GlcNAc i sržna fukoza su također varirali, no najveće razlike su uočene u sijalinskim kiselinama. Disijalizirana forma varira između 2,2% i 33% dok isti glikan s rasijecajući GlcNAc-om varira od 16% do 60%.

S obzirom na važnost glikozilacije za strukturu i regulaciju proteina, postojeće razlike mogu biti posljedica fenotipske varijabilnosti među ljudima. Također, analiza varijabilnosti imunoglobulina G pokazuje još značajnije razlike među pojedincima što može značiti da analiza ukupnih glikana plazme ne daje najjasniju sliku o pojedinom proteinu.¹²⁸

Sastav bolesti je različit među državama i geografski je odvojen. U razvijenim državama ima mnogo manje zaraznih, a više nezaraznih kroničnih upalnih bolesti. Nasuprot tome, u nerazvijenim državama dominiraju zarazne infektivne bolesti.¹³¹ Zemlje u tranziciji se nalaze između ove dvije skupine gdje ruralna područja izgledaju kao nerazvijene zemlje a urbana kao u razvijenim zemljama. Mehanizmi koji se skrivaju iza ovog fenomena mogu biti različiti. Infekcije su često povezane s jakim imunološkim odgovorom na patogene i strane antigene. S druge strane, mnoge neinfektivne bolesti koje se pojavljuju u razvijenim zemljama i urbanim područjima također su povezane s upalom tkiva. Ove bolesti mogu biti uzrokovane različitim stimulansima poput samo-antigena i alergena.^{132,133} Ovime se postavlja pitanje kako se glikozilacija imunoglobulina G razlikuje među državama različitog razvoja i geografskog položaja. Do sada je pokazano kako galaktozilacija IgG1 u prati razvijenost i urbanizaciju okruženja u kojem ljudi žive. Dokazana je povišena razina galaktozilacije u ispitanicima iz razvijenih zemalja poput Njemačke i Nizozemske u odnosu na nerazvijene zemlje (Gabon, Gana i Ekvador). Također, u zemljama gdje se moglo uspoređivati ruralna u odnosu na urbanu okolinu, povećana galaktozilacija je uočena u urbanim područjima. U Gani, osim razlika

između urbanih i ruralnih područja, različita je razina galaktozilacije između djece koja su pohađala urbane škole visokog i niskog socioekonomskog statusa.

Razina sijalinizacije također prati trendove galaktozilacije. Sijalizacija raste s razinom urbanizacije unutar države i razvijenošću države. Ovakva povezanost je očekivana budući da prisustvo galaktoze je potrebno kako bi se mogla vezati sijalinska kiselina.¹³⁴

2.9.1 Klasificiranje populacije prema indeksima razvoja i napretka

Humani razvojni indeks HDI (engl. *Human Development Index*) je uveden početkom devedesetih godina 20. stoljeća od strane Ujedinjenih Naroda, a svakoj državi daje bodove u rasponu od 0.001 do 1.0 temeljene na očekivanoj životnoj dobi, obrazovanju i dohotku, a na temelju bodova rangiraju se države u četiri skupine: nerazvijene, srednje razvijene, razvijene i jako razvijene. Prema UN-u, države sa HDI-om većim od 0,8 smatraju se razvijenima. HDI je veći ako su veći obrazovanje, očekivana životna dob i bruto domaći proizvod, a manji broj rođene djece i inflacija.

Ciljevi održivog razvoja, koji se nazivaju i Globalnim ciljevima, predstavljaju nadogradnju Milenijskim ciljevima razvoja (engl. *Millenium Development Goals*). Oni predstavljaju osam ciljeva borbe protiv siromaštva koje se svijet obvezao da će postići do 2015. godine. Milenijski ciljevi, usvojeni 2000. godine, obuhvaćaju veliki broj pitanja, uključujući borbu protiv siromaštva, gladi, bolesti, neravnopravnosti spolova i osiguranja pitke vode i sanitarnih uvjeta života. Na postizanju milenijjskih ciljeva ostvaren je ogroman uspjeh, što pokazuje značaj postojanja objedinjujućeg programa koji počiva na ciljevima i rezultatima. Usprkos uspjehu, siromaštvo nije u potpunosti iskorijenjeno. Globalni ciljevi i širi program održivosti idu mnogo dalje od milenijjskih ciljeva i bave se osnovnim uzrocima siromaštva i univerzalnom potrebom razvoja na dobrobit svih ljudi.¹³⁶

3 Ispitanici, materijali i metode

3.1 Ispitanici

U ispitivanje je bilo predviđeno uključiti 27 populacija po stotinu uzoraka iz različitih dijelova svijeta. Od toga je četiri populacije činilo dva para po dvije iste etničke skupine ispitanika koji su skupljeni u različitim centrima (dvije skupine Jakuta i dvije skupine Kazaka). Također, tri skupine etnički različitih uzoraka su skupljene u istom medicinskom centru (populacije Indijaca, Engleza i Jamajčana koji žive u Londonu).

Tablica 1: Popis analiziranih populacija i manjina u studiji s odgovarajućim brojem uzoraka i biogeografskim podrijetlom.

	Populacija i zemlja porijekla uzoraka	Broj uzoraka	Biogeografsko podrijetlo
1	Populacija Kine	100	Istočna Azija
2	Manjina Kazaka, Kina	97	Zapadna Azija-Istočna Azija
3	Manjina Ujgura, Kina	99	Zapadna Azija-Istočna Azija
4	Manjina Kirgiza, Kina	97	Istočna Azija
5	Manjina Evenka, SAD	87	Sjeverna Azija
6	Populacija Njemačke	97	Europa
7	Manjina Roma, Hrvatska	98	Europa
8	Populacija Italije	89	Europa
9	Populacija kosovskih Albanaca, Kosovo	100	Europa
10	Manjina Jakuta, SAD	83	Sjeverna Azija
11	Populacija otočja Orkney, UK	99	Europa
12	Populacija Papue i Nove Gvineje	78	Oceanija
13	Populacija Rusije	100	Europa
14	Manjina Kazaka, Rusija	100	Zapadna Azija-Istočna Azija
15	Manjina Tatara, Rusija	99	Zapadna Azija
16	Manjina Jakuta, Rusija	81	Sjeverna Azija
17	Populacija Engleske (SABRE studija)	98	Europa
18	Indijska manjina, UK	98	Sjeverna Azija
19	Jamajčanska manjina, UK	96	Afro-Europa
20	Populacija Hrvatske	97	Europa
21	Populacija Švedske	97	Europa
22	Populacija Tajlanda	99	Istočna Azija
23	Populacija Trinidad i Tobago	96	Afro-Europa
24	Populacije Turske	100	Zapadna Azija
25	Populacija Ugande	98	Afrika
26	Populacija Ujedinjenog Kraljevstva (TWINS UK studija)	97	Europa
27	Populacija otočja Shetland, UK	99	Europa
	Ukupno:	2579	

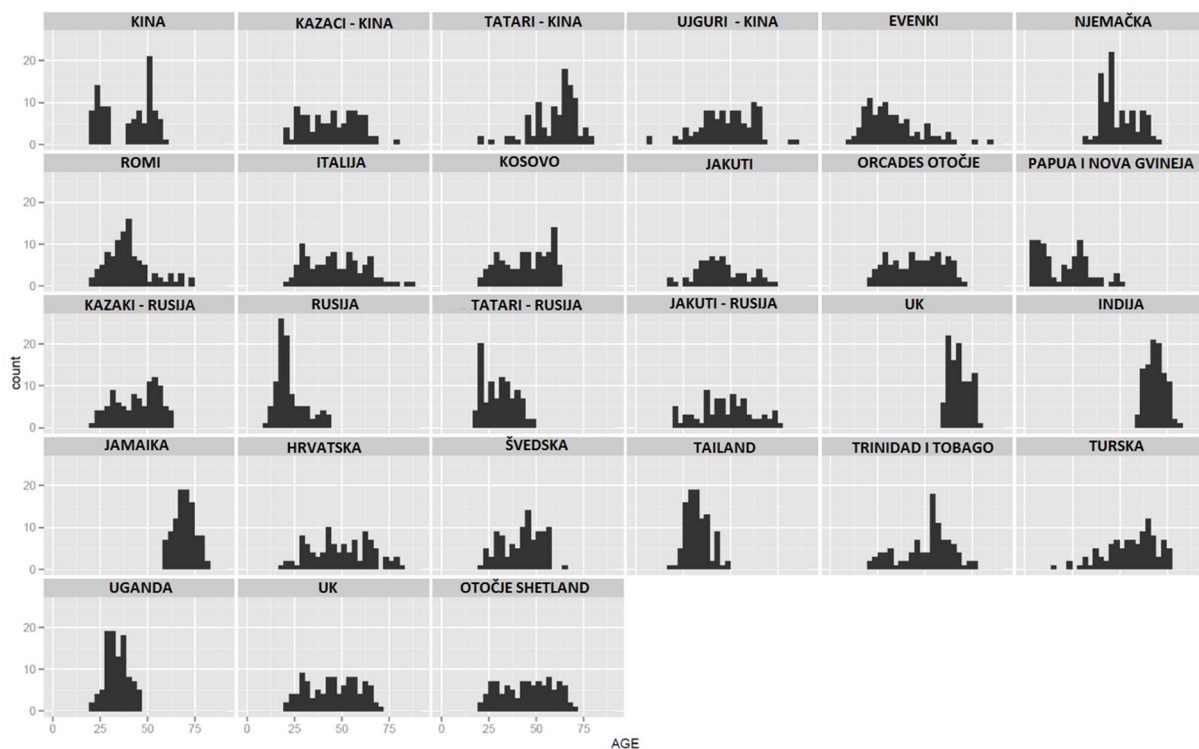
Od etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zatražena je i dobivena suglasnost za provođenje studije. Uključivanje u studiju nije niti na koji način utjecalo na ispitanike koji su dali informirani pristanak za sudjelovanje. Tablica 1 prikazuje popis analiziranih populacija i manjina u studiji s odgovarajućim brojem uzoraka i biogeografskim podrijetlom.

Tablica 2: Raspodjela dobi i spolova u analiziranim populacijama. Kazaki K su Kazaki skupljeni u Kini dok su Kazaki R u Rusiji.. Ž=broj žena; M=broj muškaraca.

Populacija	Minimalna starost	Prvi kvartil	Medijan	Srednja vrijednost	Treći kvartil	Maksimalna starost	Ž	M
Kina	20	26	43	39	51	60	57	43
Kazaki K	21	33	45	44	56	78	52	45
Kirgizi	22	55	65	61	70	92	56	41
Ujguri	8	38	49	47	58	85	64	35
Evenki	10	22	29	33	40	85	36	74
Njemačka	32	43	47	49	57	70	33	64
Romi	18	28	37	37	42	79	54	58
Italija	24	33	46	46	57	86	48	39
Kosovo	21	33	46	44	57	62	69	50
Jakuti	18	34	42	43	54	72	52	44
Papua	3	8	12	18	26	48	47	22
Orkney	21	33	46	45	56	69	49	50
Kazaki R	21	33	42	42	53	63	62	38
Rusija	9	17	20	22	26	43	74	26
Tatari	18	23	31	30	36	48	57	40
Engleska	59	63	66	67	71	77	18	78
Indija	59	65	68	68	72	82	13	85
Jamajka	59	66	69	69	73	80	60	36
Hrvatska	18	37	48	49	62	81	25	71
Švedska	22	32	44	42	51	64	42	54
Tajland	18	28	32	32	36	49	56	66
Trinidad	22	40	53	49	59	77	82	14
Turska	16	48	59	56	67	79	39	61
Uganda	17	29	33	32	37	47	61	50
UK	21	33	46	45	57	70	48	47
Shetland	21	33	45	45	56	69	52	46

U studiju su uključivani ispitanici oba spola. Tablica 2 opisuje raspodjelu dobi i spolova u analiziranim populacijama. Ispitanici unutar skupine od 100 uzoraka su jednoliko distribuirani po dobi i spolu kako bi se smanjio učinak ova dva faktora na glikanski profil, no u nekim populacijama zbog ekstremnijih pomaka u starosti populacije to nije bilo u potpunosti moguće provesti. Distribuciju dobi u analiziranim populacijama također prikazuje Slika 6. U studiju

nisu uključivani ispitanici sa poznatom dijagnozom bilo kakve akutne ili kronične bolesti. Bolesti, pogotovo upalne, mogu promijeniti glikozilacijski profil ispitanika što bi utjecalo na rezultate studije.



Slika 6: Distribucija dobi ispitanika u analiziranim populacijama. Slika je napravljena u programskom jeziku R verzija 3.0.1.

3.2 Materijali

3.2.1 Korištene kemikalije

formijatna kiselina (HCOOH) (Merck)

trifluorooktana kiselina (TFA) (Sigma)

amonij hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (Acros Organic)

sorpcijsko sredstvo C-18 ec (Macherey-Nagel)

acetonitril (LC-MS) (J. T. Baker)

propan-2-ol (Sigma)

acetonitril (HPLC grade) (Scharlab)

ultračista voda (Milipore)

argon (Ar) 5,0 (Messer)

trifluorooktana kiselina (TFA) (Chromasolv)

propionska kiselina (Sigma)

tripsin (Sequencing grade Modified Trypsin) (Promega)

amonij klorid (NH_4Cl) (Acros Organics)

kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich)

kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore)

kloridna kiselina (HCl) (Kemika)

natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Acros Organics)

natrijev hidroksid (NaOH) (Kemika)

natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba)

tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (Acros Organics)

3.2.2 Pribor i uređaji

Pipet-Lite XLS automatske mikropipete raznih volumena (Rainin)

Protein G pločica (BIA Separations)

Laboratory Incubator inkubator (M.R.C.)

Laboratory Incubator pećnica (M.R.C.)

Centrifuge 5840 centrifuga (Eppendorf)

HALO c-18 150 mm x 100 μ m kolona (Advanced Materials Technology)

SpeedVac Concentrator SC210A uređaj za centrifugu s vakuum otparivačem (Thermo)

MR 3000 D magnetna miješalica (Heildoph)

MicroSealer uređaj za lijepljenje mikrofolije na pločice (MicroSeal)

nanoACQUITY UPLC tekućinska kromatografija visokih performansi (Waters)

Compact Q-TOF spektrometar masa (Bruker)

Nanodrop 8000 spektrofotometar (Thermo)

Round Collection Plate pločice s 96 jažica (Waters)

ABgene AB-1300 mikrotitarske pločice (Thermo scientific)

0,10 μ m PE Frit filter pločice (Orochem)

PepMat 100 5mm x 300 μ m kolona (Thermo)

38 μ m lakirana aluminijska termalna folija (Porvair)

Vacuum manifold uređaj za vakuumsko odsisavanje pločica (Pall)

3.3 Metode

3.3.1 Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme ili seruma

Imunoglobulin G je izoliran iz uzoraka krvne plazme afinitetnom kromatografijom vezanjem na protein G pločicu (BIA Separations) s 96 jažica uz korištenje vakuum uređaja za pločice (eng. *vacuum manifold*, Pall). Svi koraci izolacije IgG-a odvijali su se pri smanjenju tlaka od oko 380 mm žive, osim pri nanošenju uzorka plazme i eluiranju IgG-a kada je korišteno smanjenje tlaka od 200 mm žive. Sve korištene otopine su prije upotrebe filtrirane kroz 0,2 µm Supor PES filter (Nalgene).

Prije nanošenja uzoraka, protein G pločica je isprana s 2 mL ultra čiste vode (18 MΩ/cm pri 25 °C), 2 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 (137 mmol/L NaCl; 2,7 mmol/L Na₂HPO₄; 9,7 mmol/L KH₂PO₄; 2,2 mmol/L KCl; titrirano s NaOH do pH 7,4), 1 mL 0,1 mol/L HCOOH pH 2,5; 2 mL 10x koncentriranog pufera PBS pH 6,6; te uravnotežena ispiranjem s 4 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4.

Osim uzoraka ispitanika (50 do 100 µL), na svaku pločicu je stavljeno i po tri alikvota standardnog uzorka plazme (50 µL) na nasumične položaje. Još jedan položaj je ostavljen za negativnu kontrolu.

Uzorci plazme su centrifugirani 3 minute pri 12 100 g (centrifuga miniSpin, Eppendorf), razrijeđeni 1x koncentriranim puferom PBS pH 7,4 ($\psi = 1:7$) te filtrirani kroz 0,45 µm GHP AcroPrep filter pločicu s 96 jažica (Pall) upotrebom vakuum uređaja za pločice. Filtrirani uzorci seruma nanoseni su na protein G pločicu, te isprani tri puta s 2 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 kako bi se uklonili nevezani proteini. Vezani IgG je eluiran s protein G pločice ispiranjem s 1 mL 0,1 mol/L HCOOH te neutraliziran sa 170 µL 1 mol/L NH₄HCO₃.

Protein G pločica je regenerirana radi mogućnosti ponovnog korištenja ispiranjem s 1 mL 0,1 mol/L HCOOH, 2 mL 10x koncentriranog pufera PBS pH 6,6, 4 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 te 1 mL pufera za skladištenje protein G pločice (etanol $\phi = 20\%$, 20 mmol/L Tris; 0,1 mol/L NaCl; titrirano s HCl do pH 7,4); nakon čega je dodan još 1 mL pufera za skladištenje i pločica spremljena na 4 °C.

3.3.2 Određivanje koncentracije IgG-a nakon izolacije iz seruma ili plazme

Nakon izolacije iz plazme, koncentracija IgG-a je izmjerena u svakom uzorku mjerenjem apsorbancije pri 280 nm korištenjem spektrofotometra NanoDrop 8000 (Thermo Scientific). Eluati su spremljeni na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.3.3 Tripsinizacija i pročišćavanje glikopeptida

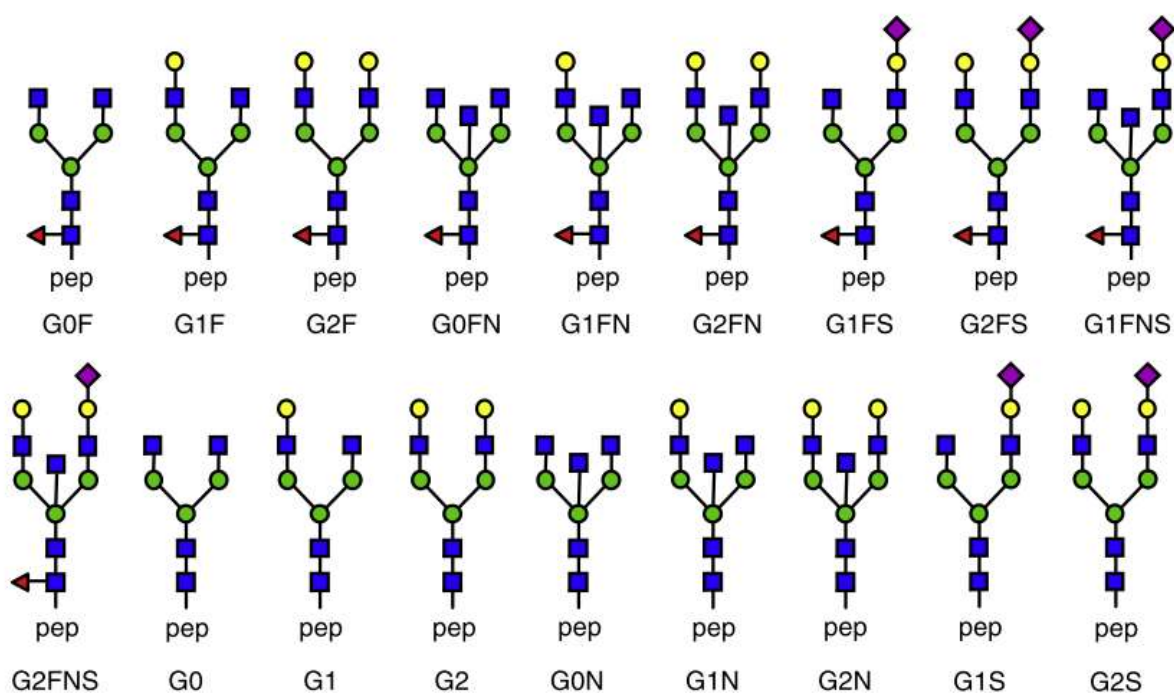
100 µg liofiliziranog tripsina je resuspendirano u puferu za resuspenziju i alikvotirano po 200 µL koncentracije 0.1 µg/µL (Promega). Volumen od 40 µL pročišćenog eluata IgG-a je pipetiran u pločicu s 96 jažica (Waters), što odgovara masi proteina od 15-25 µg. Nakon toga je 200 µL pripremljenog alikvota enzima pomiješano s 900 µL ultra čiste vode rashlađene na 4°C, te se potom iz tako pripremljene otopine enzima dodavalo po 10 µL u svaku jažicu na pločici. Po uzorku je dodano 0,1 µg tripsina. Neposredno nakon toga je indikatorskim lakmus papirom provjerena pH vrijednost koja je trebala biti oko 7. Ukoliko je pH vrijednost bila zadovoljavajuća, pločice su hermetički zatvorene lijepljenjem termalnom folijom. Tako pripremljene pločice su potom stavljene u inkubator na 37 °C preko noći.

Za pročišćavanje tripsiniziranih glikopeptida pripremljena je suspenzija C-18 faze u 80 % ACN-u koncentracije 50 mg/mL. 100 µL tako pripremljene suspenzije je dodano u svaku jažicu filter pločice (Orochem). Zatim su C-18 kolone održavane takvima uzastopnim ispiranjem tri puta s 200 µL 80% ACN-a uz korištenje vakuum uređaja za pločice (Pall). Potom je pločica tri puta ekvilibrirana ispiranjem u 200 µL 0,1% TFA. Nakon toga su dodani glikopeptidi koji su neposredno prije zadnjeg ispiranja kolone razrijeđeni 10 puta s 0,1% TFA. Tako razrijeđeni glikopeptidi dodani su na filter pločicu i još triput ispirani s 0,1% TFA kako bi se uklonile hidrofilne nečistoće i soli iz uzorkaa. Nakon zadnjeg ispiranja s 0,1% TFA, filter pločica je sušena centrifugiranjem. U PCR pločicu su eluirani glikopeptidi iz filter pločice koristeći 20% ACN centrifugiranjem 5 minuta u centrifugi. Potom su pločice stavljene na sušenje u uređaj za centrifugu s vakuum otparivačem.

3.3.4 Separacija i mjerenje glikopeptida

Glikopeptidi Fc regije imunoglobulina G razdvojeni su na Nano AQUITY sustavu (Waters) spregnutom Compact (Bruker) spektrometrom masa opremljenim izvorom iona u obliku elektrospreja, kvadrupolom i analizatorom vremena leta iona TOF (engl. *time of flight*). Izlaz kolone je spojen na izvor iona pomoću CE sprejera za kapilarnu elektroforezu (Agilent).

Posušeni uzorci su rekonstituirani u 20 μL vode prije injiciranja, dok je volumen injiciranja bio je 9 μL . Uzorci su vezani i isprani od hidrofilnih nečistoća na C-18 SPE predkoloni (Dionex, Acclaim PepMap100 5mm x 300 μm) pri protoku od 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ u 0,1% TFA. Glikopeptidi su razdvajani na C-18 nano analitičkoj koloni za tekućinsku kromatografiju (Halo, 150 x 100 μm) obrnutih faza kondicioniranoj u pri protoku od 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 100% otapalom A (0,1% TFA). Analitički protok je bio 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Gradijent koji se koristio za razdvajanje podklasa imunoglobulina G počeo je s 18% otapala B i završio s 25% otapala B (80% ACN, 20% 0,1% TFA). Spektri masa su snimani u prozoru omjera mase i naboja od $m/z=600$ do $m/z=1800$ pri frekvenciji od 0,5 Hz. Kolizijska energija je iznosila 4 eV a kolizijski plin bio je argon. Vrijeme prijenosa iona je bilo postavljeno na 110 μs a skladištenje iona prije pulsa je iznosilo 21 μs . Kako bi se suprimirao negativan utjecaj TFA na ionizaciju u izvoru iona spektrometra masa, konstantno se u izvor iona dovodila 20% proipionska kiselina u 50% izopropanolu pri protoku od 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Slika 7 prikazuje moguće glikanske strukture na Fc fragmentu imunoglobulina G.



Slika 7: Moguće glikanske strukture na Fc fragmentu imunoglobulina G. Plavi kvadrati predstavljaju N-acetilglukozamine, zeleni krugovi manoze, žuti kugovi galaktoze a ljubičasti rombovi silalinske kiseline. Crveni trokuti su fukoze. Pep predstavlja peptid na koji je vezan glikan.¹³⁵

3.3.5 Predprocesiranje podataka

Dobiveni spektri su pretvoreni u otvoreni mzXML format pomoću programa DataAnalysis verzije 3.2 (Bruker) tokom čega su stvarani samo centroidirani linijski spektri. Procesiranje podataka je rađeno u interno napisanoj skripti pyHTGlyco8 koja je radila na temelju

programskog jezika Phyton verzija 3. Uzorci su rekaliبرirani ručnim izborom najboljih 10-15 kalibriranih, s unaprijed definirane liste, koji imaju najveći omjer signala i šuma te očekivanu izotopnu distribuciju za ovakve glikopeptide. Nakon ponovne kalibracije, četiri najjača izotopa su izolirana u m/z prozoru širine 10 ppm. Kvantifikacija je rađena na temelju unaprijed definirane liste analita koja se sastoji od glikopeptida koji sadržavaju 20 najzastupljenijih glikoformi na svakoj od podklasa imunoglobulina G (Slika 7). Tablica 3 sadrži popis korištenih omjera mase i naboja čiji su se intenziteti ekstrahirali iz spektara masa. Nakon definiranja vremenskih prozora specifičnih za glikopeptide pojedine podklase imunoglobulina G, svi signali koji pripadaju određenom analitu su zbrojeni. Dobivene vrijednosti glikopeptida su normalizirane na ukupnu površinu unutar pojedine podklase imunoglobulina G i korigirani na efekt serije metodom *Combat* koristeći interno napravljenu skriptu programa R. Uzorci koji nisu zadovoljavali kriterije kvalitete su isključeni iz daljnje analize.

Tablica 3: Popis omjera mase i naboja (m/z) dvostruko i trostruko nabijenih glikopeptida po podklasama.¹³⁵

	IgG1		IgG2		IgG4	
	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$
G0F	1317.527	878.687	1301.532	868.024	1309.529	873.356
G1F	1398.553	932.705	1382.558	922.042	1390.556	927.373
G2F	1479.580	986.722	1463.585	976.059	1471.582	981.391
G0FN	1419.067	946.380	1403.072	935.717	1411.069	941.049
G1FN	1500.093	1000.398	1484.098	989.735	1492.096	995.066
G2FN	1581.119	1054.416	1565.125	1043.752	1573.122	1049.084
G1FS	1544.101	1029.737	1528.106	1019.073	1536.104	1024.405
G2FS	1625.127	1083.754	1609.133	1073.091	1617.130	1078.423
G1FNS	1645.641	1097.430	1629.646	1086.767	1637.643	1092.098
G2FNS	1726.667	1151.447	1710.672	1140.784	1718.670	1146.116
G0	1244.498	830.001	1228.503	819.338	1236.501	824.670
G1	1325.524	884.019	1309.529	873.356	1317.527	878.687
G2	1406.551	938.036	1390.556	927.373	1398.553	932.705
G0N	1346.038	897.694	1330.043	887.031	1338.040	892.363
G1N	1427.064	951.712	1411.069	941.049	1419.067	946.380
G2N	1508.090	1005.730	1492.096	995.066	1500.093	1000.398
G1S	1471.072	981.051	1455.077	970.387	1463.075	975.719
G2S	1552.098	1035.068	1536.104	1024.405	1544.101	1029.737
G1NS	1572.612	1048.744	1556.617	1038.081	1564.614	1043.412
G2NS	1653.638	1102.761	1637.643	1092.098	1645.641	1097.430

3.3.6 Izračun deriviranih svojstava

Relativni udio svakog od analiziranih glikopeptida su preračunati u derivirana glikanska svojstva na temelju zajedničkih strukturnih karakteristika koje dijele pojedini glikani radi lakše analize i razumijevanja bioloških procesa u kojima sudjeluju. Izračunata su svojstva koja predstavljaju udio galaktozilacije, sijalinizacije, fukozilacije i rasijecajućeg GlcNAc-a na glikopeptidima unutar podklasa imunoglobulina G.

3.3.6.1 Galaktozilacija

Razina galaktozilacije je iskazana pomoću tri glikanska svojstva i to kao udio agalaktoziliranih, monogalaktoziliranih i digalaktoziliranih struktura (glikani koji ne sadržavaju ili sadržavaju jednu ili dvije galaktoze) u neutralnim glikanima (glikani koji nemaju sijalinsku kiselinu) pojedine podklase. Za izračun ovih svojstava korištene su sljedeće formule:

$$\text{IgG1 Agalaktozilacija} = (\text{IgG1 G0F} + \text{IgG1 G0FN}) / (\text{IgG1 G0F} + \text{IgG1 G0FN} + \text{IgG1 G1F} + \text{IgG1 G1FN} + \text{IgG1 G2F} + \text{IgG1 G2FN})$$

$$\text{IgG1 Monogalaktozilacija} = (\text{IgG1 G1F} + \text{IgG1 G1FN}) / (\text{IgG1 G0F} + \text{IgG1 G0FN} + \text{IgG1 G1F} + \text{IgG1 G1FN} + \text{IgG1 G2F} + \text{IgG1 G2FN})$$

$$\text{IgG1 Digalaktozilacija} = (\text{IgG1 G2F} + \text{IgG1 G2FN}) / (\text{IgG1 G0F} + \text{IgG1 G0FN} + \text{IgG1 G1F} + \text{IgG1 G1FN} + \text{IgG1 G2F} + \text{IgG1 G2FN})$$

$$\text{IgG2 Agalaktozilacija} = (\text{IgG2 G0F} + \text{IgG2 G0FN}) / (\text{IgG2 G0F} + \text{IgG2 G0FN} + \text{IgG2 G1F} + \text{IgG2 G1FN} + \text{IgG2 G2F} + \text{IgG2 G2FN})$$

$$\text{IgG2 Monogalaktozilacija} = (\text{IgG2 G1F} + \text{IgG2 G1FN}) / (\text{IgG2 G0F} + \text{IgG2 G0FN} + \text{IgG2 G1F} + \text{IgG2 G1FN} + \text{IgG2 G2F} + \text{IgG2 G2FN})$$

$$\text{IgG2 Digalaktozilacija} = (\text{IgG2 G2F} + \text{IgG2 G2FN}) / (\text{IgG2 G0F} + \text{IgG2 G0FN} + \text{IgG2 G1F} + \text{IgG2 G1FN} + \text{IgG2 G2F} + \text{IgG2 G2FN})$$

$$\text{IgG4 Agalaktozilacija} = (\text{IgG4 G0F} + \text{IgG4 G0FN}) / (\text{IgG4 G0F} + \text{IgG4 G0FN} + \text{IgG4 G1F} + \text{IgG4 G1FN} + \text{IgG4 G2F} + \text{IgG4 G2FN})$$

$$\text{IgG4 Monogalaktozilacija} = (\text{IgG4 G1F} + \text{IgG4 G1FN}) / (\text{IgG4 G0F} + \text{IgG4 G0FN} + \text{IgG4 G1F} + \text{IgG4 G1FN} + \text{IgG4 G2F} + \text{IgG4 G2FN})$$

$$\text{IgG4 Digalaktozilacija} = (\text{IgG4 G2F} + \text{IgG4 G2FN}) / (\text{IgG4 G0F} + \text{IgG4 G0FN} + \text{IgG4 G1F} + \text{IgG4 G1FN} + \text{IgG4 G2F} + \text{IgG4 G2FN})$$

3.3.6.2 Sijalinizacija

Sijalinizacija je izračunata kao udio glikana koji nose sijalinsku kiselinu u ukupnom glikomu podklase. Za izračun sijalinizacije su korištene sljedeće formule:

$$\text{IgG1 Sijalinizacija} = (\text{IgG1 G1FS} + \text{IgG1 G2FS} + \text{IgG1 G1FNS} + \text{IgG1 G2FNS} + \text{IgG1 G1S} + \text{IgG1 G1NS}) / \text{Ukupni glikani}$$

$$\text{IgG2 Sijalinizacija} = (\text{IgG2 G1FS} + \text{IgG2 G2FS} + \text{IgG2 G1FNS} + \text{IgG2 G2FNS} + \text{IgG2 G1S} + \text{IgG2 G1NS}) / \text{Ukupni glikani}$$

$\text{IgG4 Sijalinizacija} = (\text{IgG4 G1FS} + \text{IgG4 G2FS} + \text{IgG4 G1FNS} + \text{IgG4 G2FNS} + \text{IgG4 G1S} + \text{IgG4 G1NS}) / \text{Ukupni glikani}$

3.3.6.3 Rasijecajući GlcNAc

Udio struktura koje sadržavaju rasijecajući GlcNAc u ukupnom glikomu podklase izračunat je prema sljedećim formulama:

$\text{IgG1 Rasijecajući GlcNAc} = (\text{IgG1 G0FN} + \text{IgG1 G1FN} + \text{IgG1 G1FNS} + \text{IgG1 G1NS} + \text{IgG1 G2FN} + \text{IgG1 G2FNS}) / \text{Ukupni glikani}$

$\text{IgG2 Rasijecajući GlcNAc} = (\text{IgG2 G0FN} + \text{IgG2 G1FN} + \text{IgG2 G1FNS} + \text{IgG2 G1NS} + \text{IgG2 G2FN} + \text{IgG2 G2FNS}) / \text{Ukupni glikani}$

$\text{IgG4 Rasijecajući GlcNAc} = (\text{IgG4 G0FN} + \text{IgG4 G1FN} + \text{IgG4 G1FNS} + \text{IgG4 G1NS} + \text{IgG4 G2FN} + \text{IgG4 G2FNS}) / \text{Ukupni glikani}$

3.3.6.4 Fukozilacija

Udio fukoziliranih struktura je izračunat prema sljedećim formulama:

$\text{IgG1 Fukozilacija} = (\text{IgG1 G0F} + \text{IgG1 G0FN} + \text{IgG1 G1F} + \text{IgG1 G1FN} + \text{IgG1 G1FNS} + \text{IgG1 G1FS} + \text{IgG1 G2F} + \text{IgG1 G2FN} + \text{IgG1 G2FNS} + \text{IgG1 G2FS}) / \text{Ukupni glikani}$

$\text{IgG2 Fukozilacija} = (\text{IgG2 G0F} + \text{IgG2 G0FN} + \text{IgG2 G1F} + \text{IgG2 G1FN} + \text{IgG2 G1FNS} + \text{IgG2 G1FS} + \text{IgG2 G2F} + \text{IgG2 G2FN} + \text{IgG2 G2FNS} + \text{IgG2 G2FS}) / \text{Ukupni glikani}$

$\text{IgG4 Fukozilacija} = (\text{IgG4 G0F} + \text{IgG4 G0FN} + \text{IgG4 G1F} + \text{IgG4 G1FN} + \text{IgG4 G1FNS} + \text{IgG4 G1FS} + \text{IgG4 G2F} + \text{IgG4 G2FN} + \text{IgG4 G2FNS} + \text{IgG4 G2FS}) / \text{Ukupni glikani}$

3.3.7 Analiza podataka

U ovoj studiji korišteno je 33 SDG indikatora studije Globalnog tereta bolesti (engl. *Global Burden of Disease* 2015) povezanih s zdravljem ljudi i zdravstvenim sustavom zemlje.¹³⁶ Također je korišten SDG indeks koji prikazuje ukupnu mjeru koja objedinjuje sva 33 korištena SDG indikatora, a koristio se radi lakšeg uočavanja širih uzoraka u podacima i praćenja općenitijih trendova i promjena. MDG indeks je korišten kao mjera koje je obuhvatila sve SDG indikatore koji su bili uključeni u MDG sustav, dok je nonMDG indeks pokrio ostale SDG faktore koji nisu bili uključeni u sustav MDG. Tablica 4 prikazuje popis SDG indikatora korištenih u analizi.

Tablica 4: Popis korištenih indikatora razvoja zemlje. SDG, MDG i nonMDG indeksi nisu uključeni u ovu tablicu.

Indikator	Opis
Prirodna katastrofa	Stopa smrtnosti uzrokovana prirodnim katastrofama na 100 000 stanovnika standardizirana na dob
Zastoj u rastu	Prevalencija zastoja u rastu u djeci mlađoj od 5 godina
Pothranjenost	Prevalencija pothranjenosti u djeci mlađoj od 5 godina
Prekomjerna tjelesna težina	Prevalencija prekomjerne tjelesne težine u djeci starosti 2-4 godine, % u populaciji
Smrtnost roditelja	Broj smrti roditelja pri porodu a na 100 000 živorođenih
Kontrolirani porod	Udio rođenja u prisustvu zdravstvenog osoblja
Neonatalna smrtnost	Šansa za smrtni slučaj djeteta do 28 dana života na 1000 novorođenih
HIV	Stopa novih infekcija HIV-om na 1000 stanovnika standardizirana na dob
Tuberkuloza	Stopa novih infekcija malarijom na 1000 stanovnika standardizirana na dob
Malarija	Stopa novih infekcija malarijom na 1000 stanovnika standardizirana na dob
Hepatitis B	Stopa novih infekcija hepatitisom B na 1000 stanovnika standardizirana na dob
Netretirane tropske bolesti	Prevalencija netretiranih tropskih bolesti standardizirana na dob na 1000 stanovnika
Neinfektivne bolesti	Stopa smrtnosti standardizirana na dob od kardiovaskularnih bolesti, raka, dijabetesa, i kroničnih dišnih bolesti u populaciji od 30 do 70 godina na 100 000 stanovnika
Samoubojstvo	Stopa smrtnosti standardizirana na dob kao posljedica samoozljeđivanja na 100 000 stanovnika
Alkohol	Prevalencija konzumiranja alkohola mjerena kao SEV za korištenje alkohola, %
Prometne nesreće	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog prometnih nesreća na 100 000 ljudi
Planiranje obitelji, moderna kontracepcija	Udio žena u reproduktivnoj dobi (15-49 godina) koje koriste moderne načine kontracepcije i planiranja obitelji, %
Porodi u adolescenata	Porodi u žena od 10-19 godina, broj živorođenih na 1000 žena
Zdravstveni sustav	Pokrivenost zdravstvenog sustava za prevenciju i tretman bolesti
Onečišćenje zraka	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog kakvoće zraka u domu i prostorima
Voda, sanitacija i higijena	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog nesigurne vode, sanitacije, i higijene
Otrovi	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog nenamjernog trovanja
Pušenje	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog pušenja u populaciji starijoj od 10 godina, %
Nasilje u obitelji	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog nasilja u obitelji nad ženama starijim od 15 godina, %
Voda	Prevalencija populacije koja koristi nesiguran i neunaprijeđen izvor vode, % mjereno kao SEV
Sanitacija	Prevalencija populacije koja koristi nesiguran i neunaprijeđene sanitacije, % mjereno kao SEV
Higijena	Prevalencija populacije koja koristi nesiguran i neunaprijeđene higijene (pranje ruku bez sapuna), % mjereno kao SEV
Onečišćenje zraka u domu	Prevalencija onečišćenja zraka kod kuće, % mjereno kao SEV
Smrtnost na poslu	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog ozljeda na radu
PM 2.5 čestice	Srednja vrijednost koncentracije čestica manjih od 2,5µm µg/m ³
Nasilje	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog nasilja među ljudima na 100 000
Rat	Stopa smrtnosti standardizirana na dob zbog rata na 100 000 ljudi
Smrtnost ispod 5 godina	Šansa za smrtnim slučajem do pete godine života na 1000 živorođenih

Osim SDG indikatora korišten je i HDI indeks i neki drugi indikatori sadržani u HDI indeksu. Osam korištenih indikatora HDI sustava vrednovanja prikazuje Tablica 5. Budući da se imena nekih indikatora preklapaju sa SDG sustavom vrednovanja, ovi indikatori imaju oznaku UN u zagradi.

Tablica 5: Popis indikatora sadržanih u UN-ovom indeksu razvijenosti društva HDI koji su korišteni u analizi. HDI indeks nije uključen u ovu tablicu.

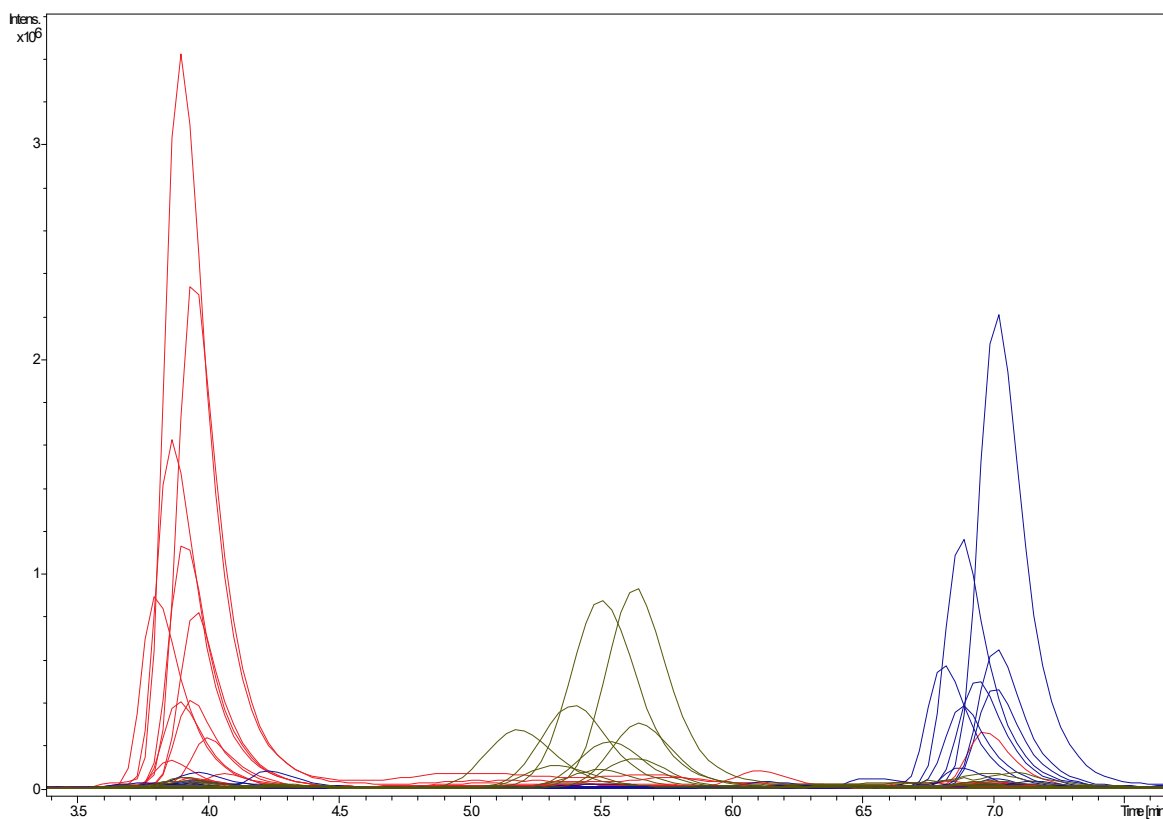
Indikator	Opis
Edukacijski indeks (UN)	Srednja vrijednost normaliziranih podataka stope pismenosti starijih od 15 godina, očekivanog trajanja školovanja, srednje vrijednosti godina školovanja i udjela djece koja napuštaju osnovnoškolsko obrazovanje
GDP (UN)	Bruto nacionalni dohodak po glavi stanovnika
Zdravstveni indeks (UN)	Srednja vrijednost normaliziranih podataka od smrtnosti odraslih i djece, prevalencije HIV-a i nedostatka imunizacije
Životni vijek (UN)	Očekivani životni vijek pri rođenju
Životni vijek - M (UN)	Očekivani životni vijek pri rođenju muškaraca
Životni vijek - Ž (UN)	Očekivani životni vijek pri rođenju žena
Voda (UN)	Dostupnost pitke vode prema UN-u
Sanitacija (UN)	Dostupnost naprednih načina sanitacije prema UN-u

3.3.7.1 Statistička analiza podataka

Statistička analiza je rađena u programskom jeziku R. Relacije između dobi i spola s glikanskim svojstvima modelirane su linearnom regresijom. Spearmanov koeficijent korelacije je korišten kako bi se odredile asocijacije različitih indikatora razvoja s glikanskim deriviranim svojstvima populacije iz određene države. p vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje Bonferonijevom korekcijom. Udio varijacije dobi, spola i biogeografskih značajki i populacije u ukupnoj varijabilnosti neke populacije je određen linearnim miješanim modelom. U linearnom miješanom modelu fiksirane varijable su bile dob i spol, dok su nasumične varijable bile biogeografsko podrijetlo i populacija. p vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima, osim ako nije drugačije navedeno.

4 Rezultati

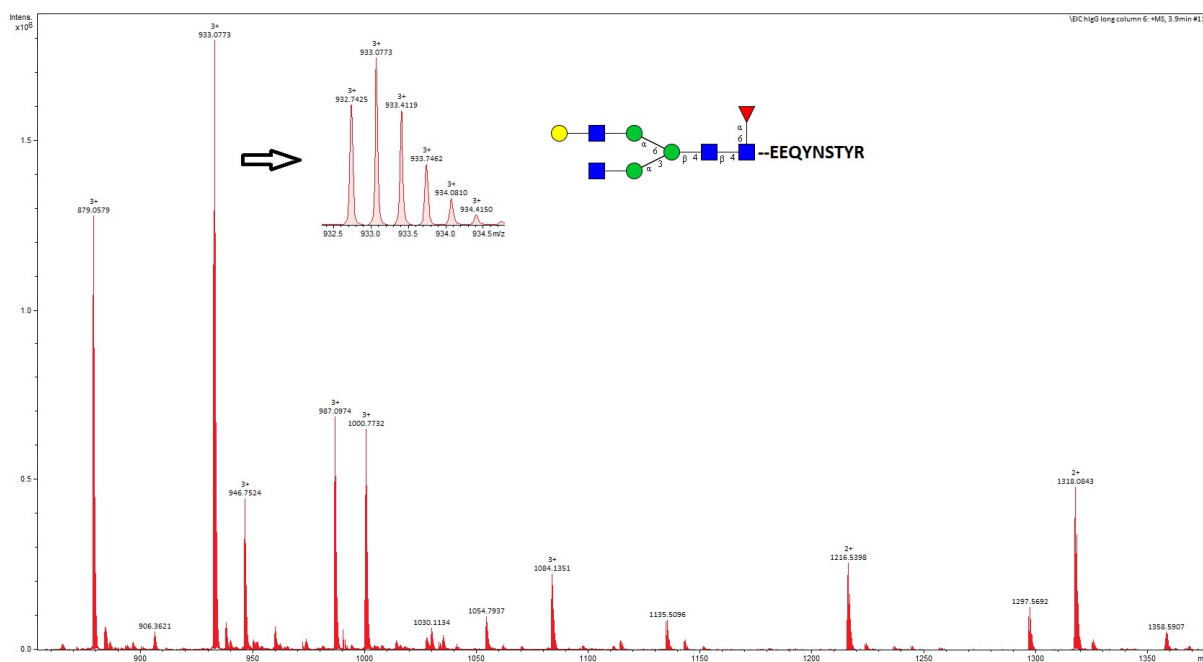
Od početnih 2700 uzoraka, glikanski profil Fc fragmenta imunoglobulina G je uspješno analiziran u 2579 uzoraka. Sve četiri podklase ljudskog IgG-a su dobivene visokoprotočnim afinitetnim pročišćavanjem na pločicama od 96 jažica s imobiliziranim proteinom G. Nakon digestije tripsinom, glikopeptidi su koncentrirani i odsoljeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi i analizirani u pozitivnom načinu rada pomoću LC-ESI-TOF-MS (Slika 8). Budući da glikopeptidi podklase IgG3 u bjelačkoj populaciji imaju aminokiselinsku sekvencu kao IgG2 (EEQFNSTFR), a u populacijama iz Azije i Afrike sekvencu kao IgG4 (EEQYNSTFR)¹³⁷, IgG3 nije analiziran kao zasebna podklasa nego unutar podklasa IgG2 i IgG4. Spektri masa (Slika 9) su automatski procesirani, što je rezultiralo određivanjem ukupno 60 glikopeptida, odnosno po 20 glikopeptida po pojedinoj podklasi imunoglobulina G.



Slika 8: Tipičan ionski kromatogram glikopeptida Fc regije podklasa ljudskog imunoglobulina G. Prvi kromatografski vršak (retencijsko vrijeme 4 minute) predstavlja ionske kromatograme dvostruko i trostruko nabijenih iona čije mase odgovaraju glikopeptidima s podklase IgG1; Drugi kromatografski vršak (retencijsko vrijeme 5.5 minuta) odgovara glikopeptidima s podklasa IgG2 i IgG4 dok treći kromatografski vršak (retencijsko vrijeme 7 minuta) odgovara ionskim kromatogramima podklasa IgG2 i IgG3. Separacija pomoću tekućinske kromatografije je potrebna prije detekcije masa analita zbog preklapanja u nekim masama.¹³⁵ Slika je napravljena u programu DataAnalysis verzija 4.1

Glikoforme su određene na temelju precizne mase prema podacima poznatim iz literature.¹³⁵ Intenziteti su dobiveni integracijom i zbrajanjem površina četiri izotopna vrška dvostruko i trostruko nabijenih ionskih vrsta čiji omjeri mase i naboja odgovaraju Fc glikopeptidima, nakon čega su rezultati normalizirani na ukupnu površinu glikoma unutar pojedine podklase.

Za određivanje razlika unutar i među serijama pripremljenih uzoraka korišteno je ukupno 155 standardnih uzoraka. Varijabilnost je računata za glikoformu najvećeg intenziteta kojoj relativna standardna devijacija iznosi manje od 5% među svim serijama uzoraka. Zbog slabih intenziteta, glikopeptidi sve tri podklase koji nose sljedeće glikane su izostavljeni iz analize: G0, G1, G2, G01N, G0N, G1N, G2N, G2S, G2NS. Upravo zbog slabih signala nefukoziliranih struktura, nije računata fukozilacija Fc glikopeptida imunoglobulina G jer bi umjetno iznosila gotovo 100%.



Slika 9: Prikaz tipičnog spektra glikopeptida podklase 1 imunoglobulina G. Sekvenca peptida je EEQYNSTYR. U gornjem dijelu spektra je prikazana tipična izotopna distribucija za vršak omjera mase i naboja $m/z = 932.74$, koja odgovara masi G1F glikana vezanog na spomenuti peptid. Desno od prikazane izotopne distribucije je prikazana struktura očekivanog glikopeptida. Slika je napravljena u programu DataAnalysis verzija 4.1

4.1 Varijabilnost glikozilacije Fc fragmenta specifične za podklasu imunoglobulina G

Kako bi se odredila glikozilacija Fc fragmenta imunoglobulina G, 20 različitih glikopeptida po pojedinoj podklasi protutijela je prikazano u obliku pet deriviranih glikanskih svojstava. Agalaktozilacijom su prikazani neutralni glikopeptidi bez galaktoze, monogalaktozilacijom su prikazani neutralni glikopeptidi s jednom, a digalaktozilacijom s dvije galaktoze. Prisustvo rasijecajućeg GlcNAc-a i sijalinskih kiselina je opisano istoimenim svojstvima kao udio ovih struktura u ukupnom glikomu Fc fragmenta imunoglobulina G. Razinu ovih glikanskih svojstava u pojedinim podklasama imunoglobulina G ukupno u svim analiziranim populacijama prikazuje Tablica 6.

Tablica 6: Razina deriviranih glikanskih svojstava u podklasama IgG-a. U tablici su prikazane minimalna, maksimalna i srednja vrijednost; medijan te vrijednost 25. i 75. percentila glikanskih svojstava u cjelokupnoj studiji.

Glikansko svojstvo	Minimum	25. percentil	Medijan	Srednja vrijednost	75. percentil	Maksimum
IgG1 Agalaktozilacija	12,03	28,25	34,33	34,99	41,21	74,88
IgG1 Monogalaktozilacija	16,14	35,79	38,49	37,97	40,97	51,15
IgG1 Digalaktozilacija	2,159	11,48	14,43	14,78	17,78	34,42
IgG1 Sijalinizacija	3,095	9,482	11,87	12,26	14,43	52,36
IgG1 Rasijecajući GlcNAc	6,244	12,92	15,07	15,38	17,46	33,23
IgG2 Agalaktozilacija	17,68	35,21	41,83	42,15	48,73	79,55
IgG2 Monogalaktozilacija	13,76	30,25	32,9	32,6	35,09	46,06
IgG2 Digalaktozilacija	2,248	10,23	12,95	13,36	16,19	31,42
IgG2 Sijalinizacija	2,886	9,225	11,62	11,89	14,19	29,94
IgG2 Rasijecajući GlcNAc	4,501	9,933	11,46	11,76	13,32	28,65
IgG4 Agalaktozilacija	11,52	31,16	39,19	40,14	48,05	87,19
IgG4 Monogalaktozilacija	6,471	29,69	32,99	32,39	36,11	54,61
IgG4 Digalaktozilacija	1,487	9,824	13,31	13,73	17,07	43,4
IgG4 Sijalinizacija	1,279	9,334	13,32	13,75	17,5	42,98
IgG4 Rasijecajući GlcNAc	3,916	10,29	12,37	12,96	14,78	50,26

Varijabilnost glikozilacije Fc fragmenta pokazala se relativno velikom. Medijan omjera maksimalnih i minimalnih vrijednosti svih glikanskih struktura za podklasu IgG1 iznosio je 39, dok je za podklase IgG2 i IgG4 bio još veći te iznosio 164 i 99. Medijan omjera maksimalnih i minimalnih vrijednosti deriviranih svojstava mnogo manji nego u ukupnim glikanima, te je za IgG1 i IgG2 je iznosio 6, dok je za IgG4 iznosio 13.

4.1.1 Galaktozilacija

Galaktozilacija imunoglobulina G je jedna od najpromatranijih svojstava na glikoproteinima, pogotovo nakon povezivanja promjena u galaktozilaciji IgG-a s autoimunim bolestima poput reumatoidnog artritisa i kalendarske dobi ispitanika. U ovom istraživanju medijan agalaktoziliranih struktura u svim podklasama je iznosio do 42%, monogalaktoziliranih do 38%, dok je razina struktura s dvije galaktoze iznosila do 15%. Razina agalaktoziliranih struktura u podklasi IgG1 je iznosila 35%, u podklasi IgG2 42%, a u podklasi IgG4 40%. Od svih glikanskih svojstava, agalaktozilacija je pokazala najveću varijabilnost u ovome istraživanju. Interkvartilni raspon za IgG1 je iznosio 13%, dok je za IgG2 i IgG4 iznosio 14% i 16%. U analiziranim populacijama razina monogalaktoziliranih glikopeptida na IgG1 je bila 38%, na IgG2 33%, dok je IgG4 sadržavao 32% ovih glikopeptida. Monogalaktozilacija je manje varirala od agalaktozilacije u ovoj studiji. Interkvartilni raspon je iznosio 5% za IgG1 i IgG2, i 6% za IgG4. Zastupljenost glikana koji sadržavaju dvije galaktoze bio je sljedeći: IgG1 je sadržavao 15%, IgG2 13%, a IgG4 14% ovih struktura s pripadajućim interkvartilnim rasponima od 6% za IgG1 i IgG2, te 7% za IgG4.

4.1.2 Sijalinizacija

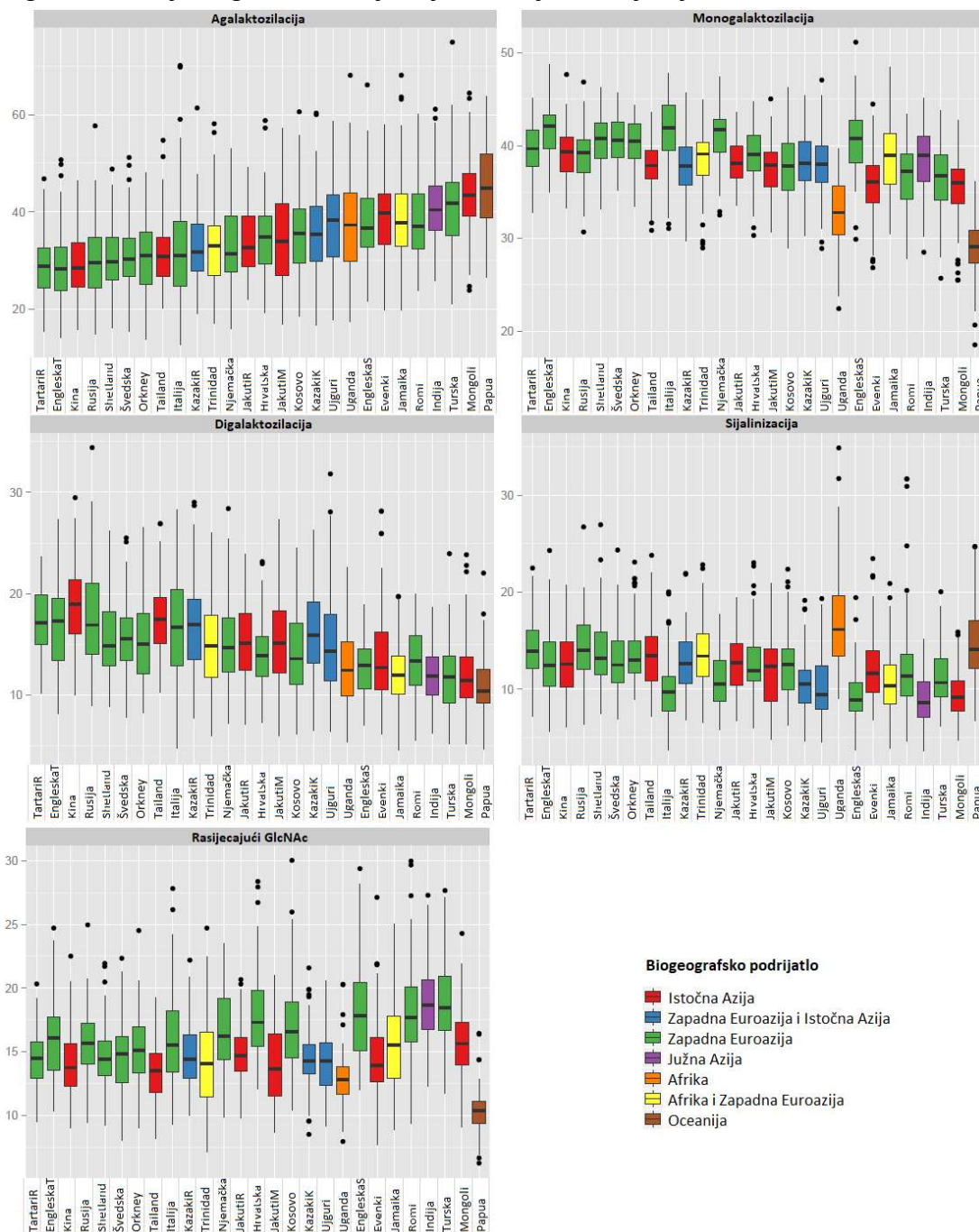
Sijalinizacija imunoglobulina G je zaslužna za njegova protuupalna djelovanja. U ovom istraživanju medijani udjela sijalinizacije u Fc glikomu određene podklase bili su do 14%. Razina sijalinizacije među podklasama bila je stalna, te za razliku od galaktozilacije varijabilnost ovog svojstva bila je relativno niska. Podklase IgG1 i IgG2 sadržavale su oko 12% sijaliniziranih struktura s istim interkvartilnim rasponom od 5%, dok je podklasa IgG4 sadržavala oko 14% ovih struktura i interkvartilni raspon od 8%.

4.1.3 Rasijecajući *N*-acetilglukozamin

Prisustvo rasijecajućeg GlcNAc-a omogućava pristup drugim glikoziltransferazama. U ovoj studiji ovaj glikan je bio zastupljen u prosijeku do 13% što je slično vrijednostima u pojedinim podklasama. IgG1 je sadržavao oko 15% glikana s ovom strukturom, IgG2 oko 12%, dok je podklasa IgG4 sadržavala oko 13% glikopeptida s rasijecajućim GlcNAc-om. Glikopeptidi s ovom strukturom pokazali su najmanju varijabilnost u ovoj studiji s interkvartilnim rasponom od 3% za podklasu IgG2, te 4% i 5% za podklase IgG4 i IgG1.

4.2 Glikozilacija Fc regije imunoglobulina G u različitim populacijama

Za svaku od analiziranih populacija izračunata je srednja vrijednost, medijan, vrijednost prvog i trećeg kvartila, te maksimumi i minimumi za derivirana glikanskih svojstava: agalaktozilaciju, monogalaktozilaciju, digalaktozilaciju, sijalinizaciju te rasijecajući GlcNAc. Sržna fukozilacija



Slika 10: Razina pojedinih deriviranih glikanskih svojstava u svakoj od analiziranih populacija ($n=2579$). Prikazana je razina galaktozilacije, sijalinizacije i rasijecajućeg GlcNAc-a. Kazaki K su Kazaki skupljeni u Kini dok su Kazaki R u Rusiji. Engleska T i Engleska S su uzorci skupljeni u studijama UK TWINS i SABRE. Slika je napravljena u programskom jeziku R verzija 3.0.1. Razlike su prikazane dijagramom pravokutnika (engl. box plot) gdje svaki pravokutnik predstavlja raspon od 25 do 75 percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Linije izvan pravokutnika predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar 1.5 x interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. outliers) naznačene su krugovima.

nije uključena u studiju zbog velike greške mjerenja afukoziliranih struktura. Varijabilnost je izražena kao interkvartilni raspon prvog i trećeg kvartila. Razina pojedinih deriviranih svojstava prikazuje Slika 10. U većini analiziranih populacija nije bilo većih odstupanja razine analiziranih deriviranih svojstava (agalaktozilacija, monogalaktozilacija, digalaktozilacija, rasijecajući GlcNAc i sijalinizacija). Zamjetna odstupanja uočena su u populacijama Ugande i Papue i Nove Gvineje koje su imale smanjenu razinu galaktozilacije i rasijecajućeg GlcNAc-a te povećanu razinu sijalinizacije u odnosu na ostale populacije.

4.2.1 Varijabilnost galaktozilacije u analiziranim populacijama

Razina agalaktozilacije u podklasi IgG1 bila je najmanja u populaciji uzoraka iz Engleske gdje je iznosila 28%, dok su najveću ovog svojstva imali uzorci Papue i Nove Gvineje, oko 44%. U podklasi IgG2, razina ovog svojstva bila je najmanja u populaciji Tajlanda, oko 34 %, dok su najveću vrijednost imali uzorci Kirgiza, odnosno 51%. Na IgG4, najmanja vrijednost agalaktozilacije je uočena u populaciji Tajlanda gdje je iznosila oko 30%, dok su najveću vrijednost ovog svojstva imali uzorci Papue i Nove Gvineje, odnosno 62%. Tablica 7 prikazuje razinu agalaktozilacije u podklasama IgG-a. U analiziranim populacijama interkvartilni rasponi agalaktozilacije su se protezali od minimalnih 8% do maksimalnih 15%. Slično su izgledali interkvartilni rasponi na podklasi IgG2, gdje je najmanji interkvartilni raspon iznosio 7% dok je najveći bio 16%. Podklasa IgG4 je imala najveću varijaciju agalaktozilacije s najmanjim interkvartilnim rasponom od 10%, a najvećim 20%.

Tablica 8 prikazuje monogalaktozilaciju imunoglobulina G u analiziranim populacijama. Razina monogalaktozilacije je bila najmanja je u uzorcima Papue i Nove Gvineje gdje je ovo svojstvo iznosilo 29%, dok je najveća bila u uzorcima iz Engleske (42%). Najnižu razinu monogalaktoziliranih glikopeptida na IgG2 su imali uzorci Papue i Nove Gvineje (28%) što je bilo slično kao i u podklasi IgG1, dok su najvišu razinu ovog svojstva imali uzorci iz Italije (36%). Podklasa IgG4, je slično drugim dvjema podklasama imala najnižu razinu monogalaktozilacije u uzorcima Papue i Nove Gvineje gdje je ona iznosila 20%, dok je bila najviša u uzorcima iz Njemačke (37 %). IgG1 i IgG2 su imali sličnu varijabilnost ovog glikanskog svojstva. Najmanji interkvartilni raspon u ove dvije podklase je iznosio 3%, a najveći 6%. Najmanji interkvartilni raspona na IgG4 je bio 4%, a najveći oko 13%.

Tablica 7: Agalaktozilacija imunoglobulina G u analiziranim populacijama. Opisana je razina agalaktozilacije u sve tri analizirane podklase IgG-a. Prikazane su srednja vrijednost i medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti, te prvi i treći kvartil. Kazaki K su Kazaki skupljeni u Kini dok su Kazaki R u Rusiji.

IgG1							IgG2/3						IgG4					
Populacija	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.
Kirgizi	15,37	24,41	28,80	28,95	32,54	46,82	22,36	30,69	36,19	36,34	40,55	55,65	15,63	26,16	31,54	31,53	36,79	49,14
UK	14,22	23,77	28,28	29,16	32,76	50,71	21,84	30,66	36,28	37,25	43,45	58,70	12,61	35,18	40,24	41,99	49,67	80,18
Kina	15,75	24,66	28,50	29,38	33,66	46,46	17,68	32,47	37,34	37,26	43,58	56,16	11,69	26,90	33,51	33,88	40,10	71,02
Rusija	12,03	24,31	29,38	29,42	34,79	57,70	18,00	31,09	36,90	36,74	42,11	61,41	14,36	27,53	34,82	35,04	42,63	66,92
Shetland	16,14	26,00	29,72	30,35	34,76	48,82	20,16	34,70	41,10	40,46	45,58	65,88	17,66	30,56	36,96	37,26	44,77	62,15
Švedska	15,51	26,79	30,30	30,64	34,57	51,19	21,79	35,46	40,08	39,98	45,19	60,41	17,19	33,06	38,08	38,38	43,39	63,40
Orkney	13,81	25,20	31,00	30,74	35,79	48,08	22,31	35,15	42,19	41,91	48,72	62,22	15,02	29,48	38,03	37,64	45,20	58,95
Tajland	20,27	26,78	31,05	31,51	34,85	58,61	22,63	30,53	33,99	34,47	37,83	52,43	12,55	23,33	29,51	30,20	35,04	68,77
Italija	12,68	24,70	30,97	32,60	37,98	70,10	17,83	30,91	37,84	38,41	44,02	67,50	11,79	32,40	40,06	41,56	52,60	86,77
KazakiR	15,49	27,87	31,72	32,72	37,37	61,36	24,00	34,38	37,85	39,74	44,79	59,15	15,67	27,43	32,30	34,70	43,28	60,11
Trinidad	17,17	26,89	33,07	32,95	37,08	58,13	23,08	34,32	42,43	41,82	47,35	67,51	13,43	28,11	35,06	35,12	41,64	65,86
Njemačka	16,05	27,60	31,45	32,97	39,20	52,98	24,17	35,32	41,09	41,47	47,29	68,00	15,85	34,55	41,35	42,93	50,29	76,24
Hrvatska	19,24	29,27	34,90	34,50	39,07	58,78	25,84	39,33	43,73	43,99	49,39	67,20	19,00	32,34	39,41	40,21	45,88	67,98
Jakuti	16,97	26,86	33,95	35,40	41,74	57,18	24,77	33,60	41,29	42,37	49,32	69,56	15,06	26,29	36,69	37,12	44,48	75,14
Kosovo	18,56	29,52	35,59	35,60	40,59	60,58	24,52	35,99	42,21	43,37	49,66	65,90	18,50	32,12	37,58	40,70	48,44	73,49
KazakiK	16,81	29,86	35,34	35,82	41,12	60,31	21,39	34,79	40,55	40,73	47,26	62,77	13,46	31,00	39,93	39,81	46,31	73,62
Ujguri	14,45	30,58	37,84	37,07	43,57	58,74	20,81	37,30	44,62	43,45	49,47	72,91	11,52	35,53	44,40	44,12	52,24	78,27
Uganda	17,45	29,84	37,33	37,31	43,89	68,07	22,12	33,89	41,20	41,32	48,53	59,72	12,72	26,09	33,13	34,15	42,29	61,84
Engleska	21,64	32,81	36,63	37,89	42,81	66,10	32,31	42,00	46,14	46,94	51,40	72,27	20,31	44,50	51,08	51,70	58,47	87,19
Romi	16,40	31,74	36,90	38,44	43,60	60,04	29,37	38,17	42,62	44,56	50,09	67,28	17,85	35,53	41,18	41,14	47,42	69,23
Evenki	16,13	32,77	39,39	38,48	43,65	57,97	24,08	38,26	43,81	44,56	50,29	64,18	13,03	30,99	37,79	38,21	45,49	72,80
Jamajka	19,83	32,96	37,81	39,01	43,79	68,08	31,90	41,80	45,56	47,69	52,81	70,45	15,43	33,31	39,28	40,02	46,38	68,22
Indija	25,89	36,19	40,43	41,03	45,35	61,11	23,83	43,98	48,73	48,25	52,46	65,28	27,67	42,72	50,17	51,02	56,96	79,51
Turska	21,09	35,18	41,79	41,15	46,04	74,88	22,46	42,14	47,93	47,73	53,11	79,55	22,10	37,80	46,22	46,06	54,49	78,37
Kirgizi	21,95	39,07	43,31	43,25	47,94	64,41	27,42	44,88	51,36	49,91	54,95	71,49	24,02	43,32	50,11	49,09	56,25	69,51
Papua	26,63	38,85	44,88	45,97	51,90	63,81	33,34	42,96	48,75	47,75	52,15	71,86	26,09	50,56	61,57	59,35	68,28	83,40

Tablica 8: Monogalaktozilacija imunoglobulina G u analiziranim populacijama. Opisana je razina monogalaktozilacije u sve tri analizirane podklase IgG-a. Prikazane su srednja vrijednost i medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti, te prvi i treći kvartil. Kazaki K su Kazaki skupljeni u Kini dok su Kazaki R u Rusiji.

IgG1							IgG2/3						IgG4					
Populacija	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.
Kina	31,08	37,12	39,18	39,15	40,92	47,67	28,40	32,87	34,79	34,88	36,51	42,85	11,04	30,89	33,45	33,72	37,05	44,72
KazakiK	26,98	36,14	38,04	37,86	40,41	45,44	23,53	30,93	33,02	32,57	34,58	41,14	14,85	31,78	35,03	34,02	37,44	44,69
Kirgizi	21,16	33,74	35,99	35,18	37,44	42,70	20,23	27,92	29,66	29,48	32,10	36,48	18,29	27,17	29,93	29,94	33,20	41,04
Ujguri	23,33	36,06	37,95	37,71	39,84	47,07	16,11	29,65	31,51	31,49	33,64	40,18	12,36	28,24	32,74	31,39	35,85	43,81
Evenki	24,48	33,71	36,06	35,74	37,81	44,48	24,18	29,99	32,44	32,33	34,10	39,17	12,42	29,22	31,69	31,18	33,34	38,51
Njemačka	30,92	39,11	41,76	41,08	42,80	47,45	19,97	32,06	34,62	34,11	36,77	46,06	19,06	31,96	37,42	36,03	39,63	45,39
Romi	26,51	34,13	37,21	36,48	39,09	43,41	21,58	28,99	31,79	31,23	33,94	38,58	15,51	30,29	32,98	32,61	35,21	44,66
Italija	20,70	39,19	41,89	40,81	44,26	47,83	21,18	32,70	36,37	35,33	38,53	42,82	9,29	26,76	34,23	32,83	39,27	54,61
Kosovo	25,19	35,06	37,68	37,70	40,19	46,32	20,77	29,11	31,88	31,31	33,72	39,48	12,69	29,26	31,97	31,62	35,20	40,81
Jakuti	27,17	35,51	37,83	37,37	39,28	45,04	23,54	30,11	33,38	32,69	34,81	39,99	18,96	30,85	33,39	32,76	35,49	42,81
Papua	17,44	27,18	28,99	28,47	30,84	36,10	18,41	26,49	28,39	28,28	30,35	38,40	9,92	17,64	20,14	21,07	24,52	34,79
Orkney	32,66	38,57	40,46	40,17	42,34	44,33	23,77	31,53	33,21	33,01	35,29	38,96	19,40	30,20	32,52	32,61	35,58	40,97
KazakiR	29,70	35,79	37,84	37,82	39,90	45,68	27,08	30,99	33,21	33,22	34,93	40,42	16,88	30,21	33,29	33,31	36,63	47,87
Rusija	28,44	37,02	39,18	38,82	40,60	46,86	26,21	31,21	33,19	33,04	35,21	40,29	18,91	30,36	32,99	32,81	35,55	42,24
KirgiziR	30,91	37,79	39,65	39,63	41,71	45,13	25,38	32,31	34,44	33,98	36,00	41,01	23,57	31,84	34,03	33,67	35,88	43,54
Engleska	26,25	37,93	40,67	40,37	42,64	51,15	19,77	30,44	32,86	32,70	35,70	39,82	6,47	26,86	31,54	30,63	35,94	44,87
Indija	27,11	35,95	38,76	38,14	41,02	45,10	21,65	29,11	31,61	31,27	33,34	39,15	10,68	28,14	32,04	31,41	34,94	40,85
Jamajka	22,08	35,65	38,95	38,08	41,28	48,43	21,02	29,95	32,12	31,89	34,47	40,48	21,19	32,12	35,28	35,11	38,17	45,70
Hrvatska	27,09	37,14	39,02	38,78	41,14	44,74	21,57	30,47	33,09	32,46	34,82	40,28	19,28	29,55	33,16	32,34	35,49	43,28
Švedska	30,55	38,52	40,58	40,63	42,52	45,69	23,57	33,03	34,44	34,32	36,08	40,56	21,02	31,83	33,97	33,83	36,72	41,21
Tajland	26,26	36,25	37,72	37,56	39,45	43,56	26,49	32,67	34,21	33,97	35,30	41,21	16,54	31,62	34,04	33,90	36,56	41,90
Trinidad	27,66	36,74	39,09	38,41	40,35	44,98	24,31	31,64	33,78	33,45	35,93	40,12	21,35	31,50	34,00	34,11	37,20	43,32
Turska	16,14	33,99	36,70	36,09	38,99	43,83	13,76	28,65	31,06	30,68	33,12	38,55	14,21	27,31	30,36	29,91	33,04	41,06
Uganda	18,59	30,24	32,69	32,49	35,65	39,63	22,56	28,76	31,18	30,82	32,93	38,24	21,08	29,22	31,41	31,20	33,81	42,73
UK	33,33	39,59	42,01	41,42	43,29	48,71	22,81	32,30	34,96	34,69	36,81	42,73	10,72	32,36	36,35	34,19	38,10	44,04
Shetland	33,20	38,59	40,76	40,33	42,43	46,29	23,17	32,36	33,96	34,02	36,15	40,08	17,51	30,84	33,09	32,79	35,38	48,46

Tablica 9: Digalaktozilacija imunoglobulina G u analiziranim populacijama. Opisana je razina digalaktozilacije u sve tri analizirane podklase IgG-a. Prikazane su srednja vrijednost i medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti, te prvi i treći kvartil. Kazaki K su Kazaki skupljeni u Kini dok su Kazaki R u Rusiji.

IgG1							IgG2/3						IgG4					
Populacija	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.
Engleska	3,81	8,78	10,30	10,78	12,52	22,03	4,59	9,77	11,86	11,94	13,80	22,10	2,35	5,25	7,42	8,30	10,69	21,75
Turska	3,96	9,67	11,35	11,93	13,76	23,84	2,96	8,87	10,37	10,89	12,71	23,39	2,69	7,59	9,57	10,66	12,84	23,23
Njemačka	2,16	9,20	11,74	11,73	13,80	23,95	2,25	8,54	10,33	10,85	13,13	24,79	1,59	7,93	10,47	10,95	14,03	22,29
Jakuti	6,22	10,01	11,90	11,86	13,73	18,64	5,43	8,51	10,23	10,41	12,05	17,54	3,13	6,60	8,92	9,02	11,53	16,72
Trinidad	3,49	9,82	11,97	12,00	13,85	19,72	2,50	7,89	9,92	9,95	12,19	16,31	4,83	10,77	12,65	13,22	15,96	24,31
Kina	4,53	9,90	12,41	12,74	15,22	22,61	6,72	10,46	12,83	13,17	16,10	21,82	7,17	12,69	16,54	16,20	18,95	27,58
Uguri	6,14	10,51	12,70	13,60	16,20	28,14	5,79	9,62	12,68	12,84	15,10	24,24	3,41	11,05	14,45	14,75	18,00	29,42
Orkney	3,87	10,56	12,85	12,50	14,51	18,94	3,37	8,94	10,52	10,53	12,05	16,58	2,74	5,50	8,21	8,95	10,83	32,36
Romi	5,54	10,91	13,38	13,20	15,82	19,98	4,38	9,82	12,39	12,40	14,84	20,84	3,75	10,23	13,05	13,37	15,49	25,30
Jamajka	6,15	11,04	13,58	14,17	17,10	24,52	4,74	9,80	12,32	12,81	15,15	22,07	3,60	9,56	12,52	13,06	16,33	24,91
Shetland	6,42	11,69	13,76	13,92	15,76	23,16	4,15	10,02	11,68	12,04	14,02	22,36	5,19	9,51	12,72	12,56	15,03	24,18
Uganda	4,63	11,40	14,27	15,04	17,93	31,82	4,22	9,99	12,44	13,51	15,93	28,16	3,27	8,60	11,99	13,03	15,33	33,87
Indija	7,20	12,30	14,69	15,24	17,59	28,40	5,95	10,56	12,77	13,00	15,64	22,69	2,37	8,07	11,29	11,48	14,56	24,13
Švedska	4,75	11,67	14,83	15,13	17,76	26,03	3,79	10,09	12,47	13,19	16,08	23,26	4,17	11,65	14,90	15,27	18,36	26,89
Italija	8,83	12,85	14,86	15,60	18,20	26,21	5,25	10,49	12,77	13,23	15,66	23,17	3,64	10,99	13,12	13,58	15,58	25,23
KazakiK	8,24	12,13	15,03	15,43	18,02	26,54	5,67	9,78	12,60	12,95	15,46	24,39	7,45	10,08	13,00	13,66	16,70	28,72
Evenki	5,99	12,17	15,12	15,59	18,32	27,32	3,83	11,16	14,28	14,27	17,95	24,43	3,15	11,60	14,75	15,54	20,07	25,82
Tajland	6,66	13,41	15,55	15,74	17,62	25,50	7,78	11,29	13,30	13,48	15,76	21,03	5,16	11,21	13,33	13,51	15,29	23,47
Kirgizi	5,40	12,99	15,76	15,90	19,14	26,27	5,92	11,74	14,59	14,82	17,65	26,34	3,62	10,07	14,25	14,73	18,83	33,11
Kosovo	3,56	12,74	16,68	16,70	20,38	28,29	5,39	12,16	14,94	15,20	18,78	25,86	1,49	7,81	13,35	13,80	17,19	43,40
Hrvatska	4,36	13,44	16,78	16,44	19,47	29,02	7,18	11,98	14,96	14,96	17,43	26,40	6,50	12,38	16,43	16,31	19,74	29,36
Rusija	6,23	13,96	16,85	17,65	20,90	34,42	5,29	13,17	15,64	15,91	18,32	31,42	4,72	11,80	15,41	15,30	18,52	30,88
KazakiR	10,12	14,96	17,20	17,43	19,95	29,80	9,20	14,01	15,95	15,99	17,97	26,28	7,44	13,90	16,04	16,71	19,08	27,03
UK	8,12	13,38	17,29	16,93	19,53	27,28	6,99	11,62	14,50	14,69	17,36	24,78	2,36	9,08	12,43	12,44	15,51	26,82
KirgiziR	7,32	14,80	17,41	17,37	19,49	26,91	8,63	14,90	17,01	17,11	19,03	26,23	4,42	16,07	18,76	19,16	22,00	35,54
Papua	9,98	16,05	18,99	18,73	21,33	29,47	6,30	12,93	15,93	16,14	18,41	25,59	7,38	14,33	16,84	17,87	21,01	33,81

Razina glikopeptida s dvije galaktoze na IgG1 je također bila recipročna agalaktozilaciji i najmanje zastupljena u uzorcima Papue i Nove Gvineje (10%), a najviše u uzorcima iz Engleske (17%). Na podklasi IgG2, glikani s dvije galaktoze bili su najmanje zastupljeni u uzorcima Jamajke (10%), a najviše u Tajlandu (17%). Na podklasi IgG4, glikana s dvije galaktoze je bilo najmanje u uzorcima Papue i Nove Gvineje (7%), što je bilo slično podklasi IgG1, a najviše ih je bilo u populaciji Tajlanda (19%). Razinu digalaktozilacije po podklasama IgG-a u analiziranim populacijama prikazuje Tablica 9. Varijabilnost digalaktozilacije je bila relativno niska u svim podklasama. Najmanji interkvartilni raspon na IgG1 je bio 4%, a najveći 8%. Slično, IgG2 je imao interkvartilni raspon od 3% do 7%, dok je na IgG4 najmanji interkvartilni raspon iznosio 4%, a najveći 9%.

4.2.2 Varijabilnost sijalinizacije u analiziranim populacijama

Imunoglobulin G1 je imao najnižu razinu sijalinizacije u populaciji uzoraka iz Indije (9%), dok je najviša razina ovog glikanskog svojstva bila u populaciji Ugande (16%). Populacija uzoraka Kirgiza je na IgG2 imala najnižu razinu sijalinizacije (9%), dok je najviša razina bila u populaciji Tajlanda gdje je iznosila 14%. Na IgG4, populacija uzoraka iz Engleske je imala najnižu razinu ovog glikanskog svojstva (7%), dok je najviša razina bila u populaciji iz Ugande (18%). Tablica 10 prikazuje razinu sijalinizacije glikopeptida Fc fragmenta imunoglobulina G u analiziranim populacijama. Varijabilnost ovog glikanskog svojstva bila je ista u podklasama IgG1 i IgG2. U obje podklase najmanji interkvartilni raspon je iznosio 3%, a najveći 6%. U podklasi IgG4 najmanji interkvartilni raspon je iznosio 5%, a najveći oko 9%.

4.2.3 Varijabilnost rasijecajućeg N-acetilglukoamina u analiziranim populacijama

Razinu rasijecajućeg GlcNAc-a u populacijama prikazuje Tablica 11. Najnižu razinu ovog glikanskog svojstva na IgG1 imala je Papua i Nova Gvineja (10%), a najvišu uzorci iz Indije (19%). Slično imunoglobulinu G1, IgG2 je imao najnižu razinu rasijecajućeg GlcNAc-a opet u uzorcima Papue i Nove Gvineje gdje je ovo glikansko svojstvo iznosilo 9%, dok je najviša razina izmjerena u uzorcima iz Indije, oko 14%. Na IgG4, najniža razina ovog svojstva je bila u uzorcima s Tajlanda (10 %), a najviša u uzorcima Han Kineza (11%). Razina rasijecajućeg N-acetilglukoamina je najmanje varirala u ovoj studiji od svih glikanskih svojstava. Podklasa IgG1 za ovo svojstvo je imala najmanji interkvartilni raspon od 2%, dok je najveći iznosio 5%. Slično imunoglobulinu G1, podklasa IgG2 je imala interkvartilni raspon od 2%, a najveći 4%.

Očekivano, podklasa IgG4 je najviše varirala od sve tri podklase. Najmanji interkvartilni raspon za rasijecajući GlcNAc je iznosio 3%, dok je najveći bio 7%.

Tablica 10: Sijalinizacija imunoglobulina G u analiziranim populacijama. Opisana je razina Sijalinizacije u sve tri analizirane podklase IgG-a. Prikazane su srednja vrijednost i medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti, te prvi i treći kvartil. Kazaki K su Kazaki skupljeni u Kini dok su Kazaki R u Rusiji.

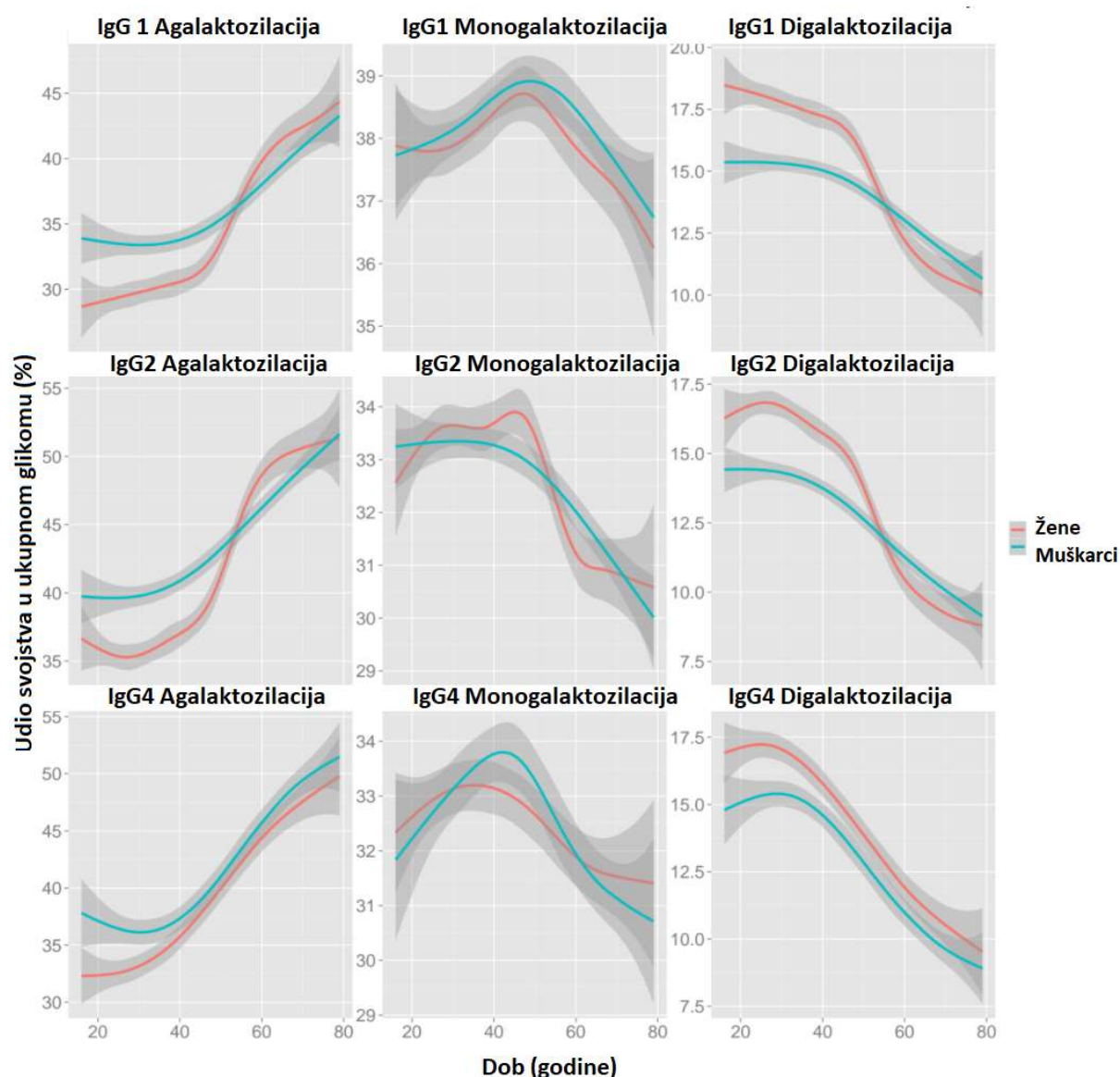
IgG1							IgG2/3						IgG4					
Populacija	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.
Papua	4,56	10,14	12,57	12,74	14,84	20,71	5,57	9,38	11,44	11,72	13,32	24,81	2,69	10,28	14,87	14,54	18,63	37,48
Kirgizi	3,10	8,48	10,45	10,42	11,95	19,14	5,12	9,75	11,68	11,89	13,53	19,75	2,35	7,59	10,59	11,44	13,36	29,87
Turska	4,71	7,74	9,16	9,65	10,95	23,90	3,83	7,62	9,14	9,72	11,50	17,74	1,28	6,68	9,46	10,30	12,98	24,04
Uganda	3,24	7,89	9,44	10,18	12,35	19,33	3,91	8,51	10,88	11,55	14,06	21,64	1,87	6,44	10,08	11,46	14,87	39,36
Ujguri	4,53	9,64	11,63	12,18	13,95	28,52	3,83	7,58	9,86	10,27	11,81	22,76	5,72	12,71	14,99	15,86	19,09	29,63
Indija	4,28	8,57	10,45	10,72	12,92	17,67	6,08	9,20	11,45	11,42	13,03	23,96	2,32	6,50	8,88	9,55	11,90	22,15
Romi	3,75	9,13	11,34	11,87	13,54	31,66	3,96	8,89	12,26	11,80	14,19	19,43	3,08	9,37	12,79	12,88	16,50	25,36
Kosovo	3,68	7,72	9,67	9,89	11,35	20,03	4,49	7,76	11,17	11,06	13,09	21,19	2,16	6,29	8,34	11,82	15,64	42,01
Jamajka	5,03	9,91	12,47	12,52	14,12	22,36	5,73	10,08	12,17	12,52	14,56	25,59	4,65	10,61	14,40	14,61	18,18	26,36
Evenki	4,81	8,73	12,36	11,63	14,12	20,93	3,06	7,67	11,09	10,67	13,39	17,07	2,27	10,14	13,48	14,58	18,27	32,13
Engleska	3,93	11,89	14,10	14,78	17,02	24,70	5,14	9,52	12,04	12,03	14,68	19,46	3,83	8,22	10,79	11,27	14,16	26,81
KazakiK	4,85	11,61	12,98	13,66	14,94	23,09	4,53	9,97	12,32	12,13	13,95	21,07	5,60	12,48	15,78	16,09	19,26	27,73
Hrvatska	4,59	10,55	12,60	13,02	14,93	31,59	5,57	10,12	11,68	12,08	14,00	23,13	3,33	12,05	15,44	15,67	18,52	37,29
Rusija	5,14	11,87	13,92	14,11	16,45	26,71	5,51	11,88	13,78	14,30	16,65	26,12	3,87	13,16	17,18	16,85	20,98	30,15
KazakiR	7,22	12,14	13,91	13,99	16,04	22,48	6,29	11,20	13,77	13,70	15,90	22,26	8,39	14,57	18,07	18,08	21,04	39,04
Orkney	3,69	7,72	8,87	9,24	10,64	19,43	4,40	8,30	9,94	9,83	11,09	17,02	1,92	5,46	7,19	8,73	10,12	31,85
Jakuti	3,66	7,09	8,64	8,97	10,73	15,16	4,14	7,86	9,50	10,08	11,32	27,64	1,91	5,31	7,55	8,55	10,62	29,67
Trinidad	3,90	8,48	10,33	10,90	12,54	29,31	2,89	8,08	10,21	10,48	12,58	26,27	3,27	8,14	11,57	11,65	14,04	41,23
Shetland	5,19	10,78	11,91	12,80	14,40	29,84	4,58	9,51	11,21	11,52	12,70	21,79	5,63	11,83	15,07	14,89	17,37	26,11
Tajland	6,93	10,64	12,50	12,99	14,98	24,33	5,72	9,88	12,01	12,22	14,17	22,80	4,82	11,10	13,98	14,29	17,24	25,74
KirgiziR	7,17	10,87	13,42	13,56	15,46	23,79	8,05	12,35	14,37	14,45	16,18	21,62	6,35	13,85	16,56	16,74	19,48	32,86
Švedska	6,52	11,27	13,41	13,51	15,67	22,82	3,35	9,14	11,28	11,55	13,82	22,71	6,44	12,53	15,17	15,50	18,59	26,24
Njemačka	4,74	9,15	10,59	11,03	13,12	20,03	4,44	8,75	10,35	10,75	12,06	23,72	3,36	9,60	12,75	13,07	15,92	33,71
Kina	5,28	13,44	16,19	17,45	19,63	52,36	6,54	11,72	13,99	14,69	16,64	29,94	9,42	13,80	18,12	18,45	22,52	35,07
UK	4,07	10,04	12,41	12,49	14,88	24,29	4,43	9,68	13,59	13,37	16,09	21,73	2,08	6,67	10,46	11,38	14,17	42,98
Italija	5,63	11,36	13,13	13,73	15,90	26,94	5,29	9,88	11,84	12,28	14,48	22,03	6,47	12,84	16,12	16,38	19,18	29,44

Tablica 11: Rasijecajući GlcNAc u imunoglobulinu G u analiziranim populacijama. Opisana je razina Sijalinizacije u sve tri analizirane podklase IgG-a. Prikazane su srednja vrijednost i medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti, te prvi i treći kvartil. Kazaki K su Kazaki skupljeni u Kini dok su Kazaki R u Rusiji.

IgG1							IgG2/3						IgG4					
Populacija	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.	Min.	Q1	Medijan	Srednja vrijednost	Q3	Maks.
Papua	9,03	12,29	13,75	13,97	15,65	22,51	6,69	9,49	10,78	10,86	12,06	17,30	6,59	9,48	10,70	11,54	13,13	26,33
Kirgizi	8,50	13,25	14,27	14,37	15,59	21,59	6,20	9,82	11,13	11,06	12,15	16,36	6,40	9,77	11,28	12,00	13,04	32,79
Turska	8,70	13,72	15,62	15,67	17,32	24,30	7,16	10,50	11,38	11,71	13,10	16,76	6,70	12,06	13,44	13,97	15,55	39,91
Uganda	7,58	12,32	14,24	14,08	15,66	20,60	4,91	9,49	10,83	10,77	11,86	16,72	6,88	9,72	11,44	12,47	12,77	45,87
Ujguri	7,67	12,63	13,92	14,47	16,10	27,13	6,00	9,76	10,94	11,13	12,47	18,14	5,85	11,30	12,70	12,97	14,65	23,68
Indija	9,83	14,37	16,25	16,62	19,17	23,52	7,19	10,10	12,15	11,96	13,62	16,45	7,16	10,97	13,18	13,28	15,19	24,11
Romi	9,38	15,79	17,71	17,90	20,09	29,98	5,52	11,32	13,27	13,18	14,71	21,96	4,63	11,55	13,72	13,99	15,79	23,90
Kosovo	9,30	13,41	15,51	16,00	18,21	27,83	7,47	10,71	12,23	12,48	13,47	18,90	7,07	10,25	13,15	15,89	17,68	50,26
Jamajka	10,41	14,55	16,60	16,91	18,93	30,04	7,20	11,13	12,18	12,67	13,91	23,95	5,23	11,54	13,21	13,63	15,00	27,54
Evenki	8,64	11,55	13,64	14,04	16,41	21,01	6,60	9,67	11,14	11,17	12,78	16,13	7,42	9,91	11,93	12,30	13,95	22,99
Engleska	6,24	9,35	10,34	10,34	11,10	16,44	5,18	8,52	9,46	9,47	10,21	20,44	4,90	9,12	11,15	11,29	13,28	18,85
KazakiK	9,01	13,32	15,14	15,14	16,95	24,53	8,20	9,95	11,21	11,40	12,54	17,39	6,78	10,19	11,93	12,45	14,36	26,73
Hrvatska	8,44	12,78	14,36	14,55	16,29	22,20	5,74	9,64	11,06	11,25	12,45	18,66	5,98	9,68	11,48	11,74	13,27	32,95
Rusija	8,33	13,95	15,63	15,44	17,24	24,97	5,47	10,71	11,87	11,80	12,98	17,03	6,08	10,95	11,93	12,33	13,89	20,93
KazakiR	9,47	12,90	14,50	14,47	15,78	20,33	6,60	9,96	10,91	11,11	12,16	18,30	6,71	9,73	11,31	11,59	13,01	29,64
Orkney	12,02	15,11	17,82	18,06	20,47	29,39	7,70	12,12	13,81	14,12	15,97	25,87	7,17	12,39	15,84	16,11	18,73	34,91
Jakuti	12,31	16,74	18,72	18,98	20,68	33,23	8,77	13,34	14,30	14,93	16,21	28,65	7,81	13,02	14,82	15,17	16,73	28,20
Trinidad	8,89	12,90	15,52	15,46	17,82	25,03	6,94	10,85	12,42	12,63	14,33	20,65	6,61	11,24	13,16	13,16	15,20	21,86
Shetland	12,10	15,42	17,30	17,72	19,83	28,38	9,33	10,52	12,29	12,70	14,64	20,29	7,23	11,26	13,80	14,38	16,87	30,49
Tajland	8,02	12,56	14,81	14,74	16,16	22,34	4,50	9,62	10,95	11,06	12,29	18,57	3,92	10,21	12,01	12,11	14,05	21,17
KirgiziR	8,15	11,83	13,53	13,48	14,84	19,23	6,77	9,07	10,37	10,61	12,02	14,69	6,79	8,51	9,60	10,03	11,38	14,74
Švedska	7,09	11,45	14,05	14,13	16,52	24,72	5,93	8,52	10,38	10,45	11,98	17,69	5,62	9,28	11,40	12,00	14,45	24,05
Njemačka	11,71	16,66	18,46	18,87	20,91	27,67	8,32	12,02	13,53	13,80	15,18	19,99	6,96	12,49	14,06	15,08	17,60	27,74
Kina	6,70	11,62	12,79	12,63	13,79	20,28	6,55	8,67	9,47	10,05	11,27	16,84	6,85	9,94	12,02	12,22	14,14	19,15
UK	10,31	13,54	16,07	15,95	17,70	24,72	6,70	10,11	11,42	11,80	13,25	18,89	6,17	10,51	12,91	13,62	14,83	48,98
Italija	9,24	13,15	14,42	14,74	16,07	29,56	6,58	9,86	11,01	11,14	12,20	16,27	6,62	9,68	11,62	12,11	14,11	23,44

4.3 Dob i spol

U ovoj studiji je također evaluirana korelacija glikozilacije imunoglobulina G i kalendarske dobi ispitanika. Dobiveni rezultati su ukazali na jaku povezanost kalendarskom dobi ispitanika u svim podklasama IgG-a s ovim glikanskim svojstvom, naime razina monogalaktoziliranih i digalaktoziliranih glikopeptida je padala s kalendarskom dobi ispitanika. Suprotan efekt je uočen kod agalaktozilacije, čija je razina rasla s kalendarskom dobi. Slika 11 prikazuje promjenu razine agalaktozilacije, monogalaktozilacije i digalaktozilacije u odnosu na starost ispitanika.



Slika 11: Ovisnost razine galaktozilacije o dobi i spolu ispitanika analizirana u 2579 ispitanika. Odnosi između dobi i glikanskih svojstava su određeni lokalnom regresijom. Crvena linija predstavlja žene a plava muške ispitanike. Siva pozadina prikazuje interval sigurnosti modela. Na X osi su vrijednosti glikanskih svojstava a na Y osi su godine ispitanika. Prikazani su rezultati za tri podklase imunoglobulina G (IgG1, IgG2/4 i IgG2/3). Slika je napravljena u programskom jeziku R verzija 3.0.1

4.4 Glikozilacija imunoglobulina G korelira s faktorima razvijenosti zemlje

U ovom istraživanju su analizirane asocijacije deriviranih glikanskih svojstava Fc glikopeptida specifičnih za pojedinu podklasu imunoglobulina G s 45 indikatora razvijenosti zemlje iz koje potječu uzorci. Glikozilacija Fc fragmenta imunoglobulina G pokazala se značajno korelirana s indeksima razvoja analiziranih populacija. Od deriviranih glikanskih svojstava, agalaktozilacija i monogalaktozilacija su korelirane sa sva tri korištena indeksa (HDI, MDG i SDG) i 20 drugih indikatora koji čine te razvojne indekse. Većina deriviranih glikanskih svojstava koja su korelirana s indikatorima razvijenosti neke zemlje bila su na podklasi IgG1 (22 od ukupno 23), a od deriviranih svojstava, monogalaktozilacije je povezana najviše indikatora. Tako su monogalaktozilirane strukture povezane sa sva tri indeksa razvijenosti. Od ostalih indikatora razvijenosti, s monogalaktozilacijom IgG1 povezano ih je 19. Agalaktozilacija je također povezana sa sva tri indeksa razvijenosti i još osam indikatora, dok je digalaktozilacija nije pokazala značajnu povezanost s niti jednim od tri indeksa razvoja, a povezana je s pet ostalih indikatora.

Tablica 12: Deset najzanimljivijih indikatora razvoja zemlje koreliranih s galaktozilacijom imunoglobulina G1. Prikazani su koeficijentima korelacije (r) s pripadajućim p vrijednostima i deriviranim glikanskim svojstvima s kojima su indikatori asocirani. p vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje Bonferonijevom korekcijom.

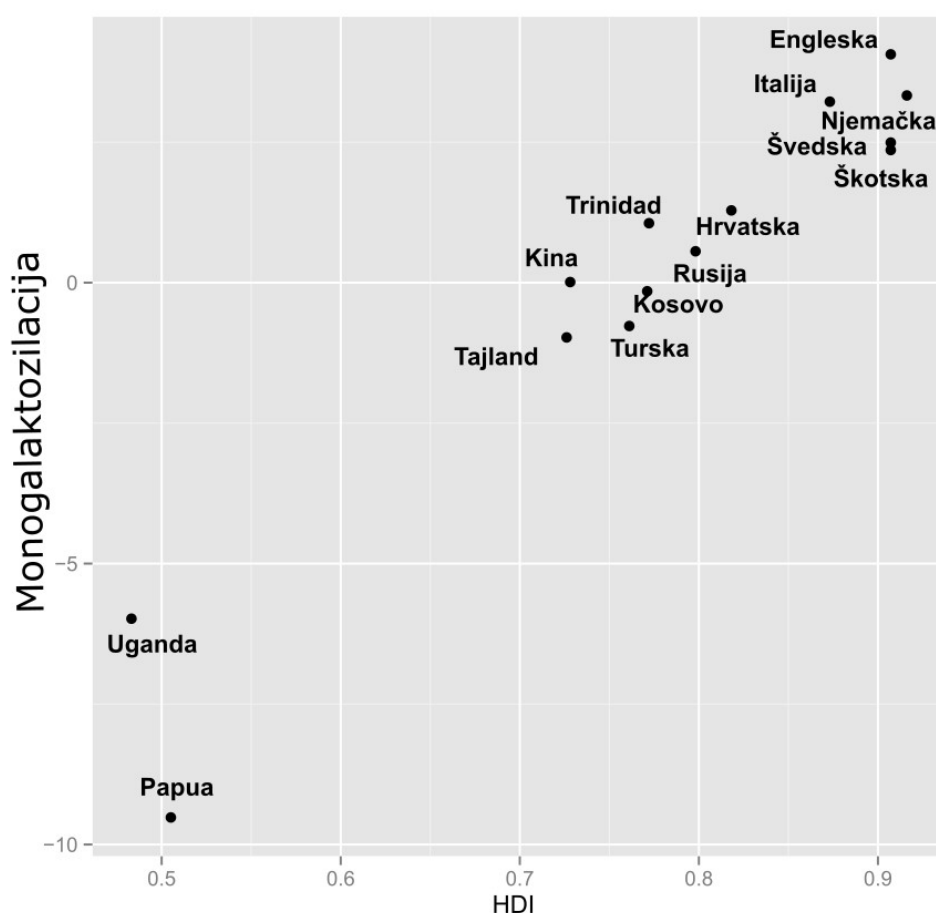
Indikator	Derivirano svojstvo	Korelacijski koeficijent (r)	p vrijednost
MDG	Monogalaktozilacija	0.969	7.44E-06
Zastoj u rastu	Monogalaktozilacija	0.967	1.16E-05
HDI	Monogalaktozilacija	0.966	1.44E-05
Zdravstveni sustav	Monogalaktozilacija	0.945	2.30E-04
SDG	Monogalaktozilacija	0.940	3.86E-04
Edukacijski indeks	Monogalaktozilacija	0.937	5.14E-04
Smrtnost na poslu	Monogalaktozilacija	0.931	9.13E-04
Zastoj u rastu	Agalaktozilacija	-0.942	3.27E-04
Zdravstveni sustav	Agalaktozilacija	-0.950	1.31E-04
Smrtnost na poslu	Agalaktozilacija	-0.950	1.37E-04

Na podklasi IgG2, monogalaktozilacija je povezana s MDG i HDI indeksima ($p=0.045$; $p=0.046$) te zastojem u rastu, zagađenjem zraka i smrtnosti na poslu ($p=0.013$; $p=0.056$; $p=0.049$). Na podklasi IgG4 jedini povezani faktor s monogalaktozilacijom je dostupnost pitke vode ($p=0.031$).

Sijalinizacija i rasijecajući GlcNAc, za razliku od svojstava vezanih uz galaktozilaciju, nisu pokazali statistički značajnu korelaciju s navedenim indikatorima razvoja države. Tablica 12 prikazuje deset najzanimljivijih indikatora koji su korelirani s deriviranim glikanskim svojstvima na imunoglobulinu G1.

4.4.1 Monogalaktozilacija

Monogalaktozilacija Fc fragmenta IgG1 podklase je pokazala je povezanost s 22 od ukupno 45 analiziranih svojstava razvijenosti neke zemlje. Pozitivno je korelirana sa sva tri indeksa razvijenosti: UN-ovim HDI ($r=0,966$; $p=1,44 \cdot 10^{-5}$), MDG indeksom ($r=0,969$; $p=7,44 \cdot 10^{-6}$) koji obuhvaća zdravstvene faktore iz MDG sustava, i SDG indeksom ($r=0,940$; $p=5,72 \cdot 10^{-7}$)



Slika 12: Ovisnost indeksa razvoja HDI o monogalaktozilaciji imunoglobulina G1. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost razine monogalaktozilacije u određenoj populaciji nakon korekcije na dob i spol. Slika je napravljena u programskom jeziku R verzija 3.0.1.

Među ostalim asociranim svojstvima koja su sadržana u indeksima MDG i SDG najveće koeficijente korelacije su imali: zastoj u rastu, zdravstveni sustav, edukacijski indeks i smrtnost na poslu. Tablica 13 prikazuje listu indikatora koreliranih s monogalaktozilacijom IgG1.

Podklasa IgG2 je pokazala slične korelacije kao i podklasa IgG1, a značajno je korelirana s pet indikatora razvijenosti. Monogalaktozilacija ove podklase pozitivno je korelirana s HDI i MDG indeksima ($r=0,864$ i $r=0,864$; $p=0,0455$ i $0,0459$) dok povezanost sa SDG indeksom, za razliku od IgG1, nije bila statistički značajna. Zastoj u rastu ($p=0,013$), smrtnost na poslu ($p=0,0455$) i smrtnost vezana uz onečišćenje zraka ($p=0,049$) su bila ostala tri indikatora povezana s monogalaktozilacijom imunoglobulina G2.

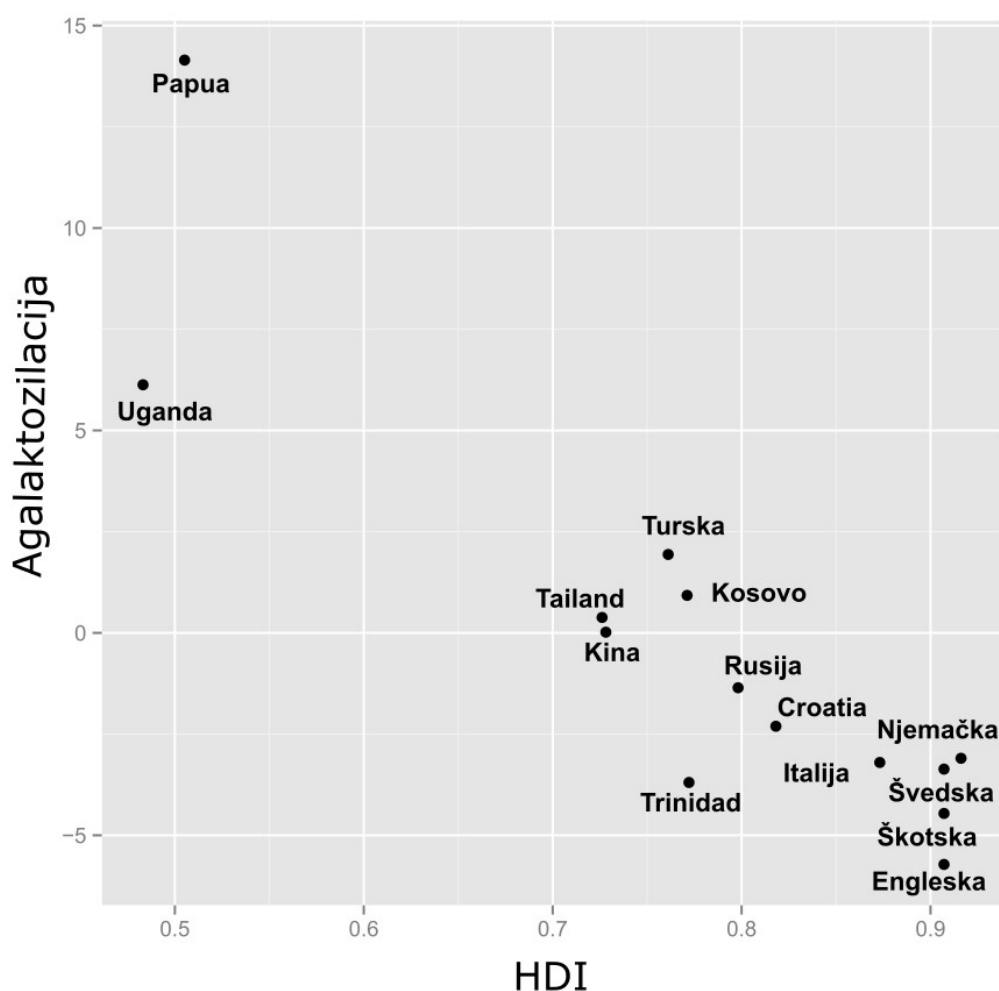
Monogalaktozilacija podklase IgG4 je bila značajno povezana samo s UN-ovim indikatorom koji opisuje kvalitetu vode (voda (UN); $p=0,0314$).

Tablica 13: Povezanost indikatora razvoja zemlje i monogalaktozilacije imunoglobulina G1. Prikazani su korelacijski koeficijenti i p vrijednosti indikatora povezanih s monogalaktozilacijom imunoglobulina G1. p vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje Bonferonijevom korekcijom.

Marker razvoja	Korelacijski koeficijent (r)	p vrijednost
Zastoj u rastu	0,967	0,0001
HDI	0,966	0,0001
MDG	0,969	0,0001
Zdravstveni sustav	0,945	0,0002
SDG	0,940	0,0004
Edukacijski indeks	0,937	0,0005
Smrtnost na poslu	0,931	0,0009
Očekivani životni vijek (Ž)	0,917	0,0027
Onečišćenje zraka	0,914	0,0032
Zdravstveni sustav (UN)	0,901	0,0074
Očekivani životni vijek	0,901	0,0074
nonMDG	0,898	0,0087
Hepatitis B	0,890	0,0133
Smrtnost roditelja	0,889	0,0146
GDP 2013	0,889	0,0146
Sanitacija	0,885	0,0177
Higijena	0,882	0,0203
Kontrolirani porod	0,876	0,0272
Voda, sanitacija i higijena	0,874	0,0300
Porodi u adolescenata	0,871	0,0344
Očekivani životni vijek (M)	0,869	0,0373
Smrtnost ispod 5 godina	0,866	0,0414

4.4.2 Agalaktozilacija

Agalaktozilacija je pokazala negativne korelacijske koeficijente sa svim analiziranim značajnim indikatorima. Isto kao i monogalaktozilacija, ovo glikansko svojstvo je pokazalo velike ali negativne korelacijske koeficijente sa sva tri indeksa razvoja HDI, MDG i SDG ($-0,906$; $-0,899$; $-0,871$; $p=0,0055$; $p=0,0082$; $p=0,0334$). Slika 13 prikazuje ovisnost monogalaktozilacije imunoglobulina G1 o vrijednosti HDI indeksa razvijenosti, gdje se može uočiti trend pada agalaktozilacije kako raste razvijenost određene zemlje.



Slika 13: Ovisnost indeksa razvoja HDI o agalaktozilaciji imunoglobulina G1. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost agalaktozilacije u određenoj populaciji nakon korekcije na dob i spol. Slika je napravljena u programskom jeziku R verzija 3.0.1.

Indeks zdravstvenog sustava, smrtnost na poslu i zastoj u rastu su bila tri indikatora s najvećim koeficijentom korelacije s agalaktozilacijom. Tablica 14 prikazuje svih 11 svojstva koja su negativno korelirana s agalaktozilacijom imunoglobulina G1.

Tablica 14: Asocijacija agalaktozilacije i indikatora razvoja zemlje. Prikazani su korelacijski koeficijenti (r) i p vrijednosti za korelaciju agalaktozilacije s indikatorima razvoja zemlje iz koje potječu uzorci. p vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje Bonferonijevom korekcijom.

Indikator razvoja	Korelacijski koeficijent (r)	p vrijednost
Zdravstveni sustav	-0,950	0,00013
Smrtnost na poslu	-0,950	0,00014
Zastoj u rastu	-0,942	0,00033
HDI	-0,906	0,00547
MDG	-0,899	0,00816
Edukacijski indeks	-0,895	0,01020
Voda	-0,891	0,01262
Kontrolirani porod	-0,890	0,01322
Onečišćenje zraka	-0,872	0,03297
SDG	-0,871	0,03338
Sanitacija	-0,862	0,04980

4.4.3 Digalaktozilacija

Glikani koji nose dvije galaktoze na Fc regiji imunoglobulina G1 su pozitivno korelirani s pet indikatora razvoja zemlje. Digalaktozilacija nije prešla granicu značajnosti za niti jedan od tri razvojna indeksa jer su p vrijednosti za MDG i HDI indekse nakon korekcije na višestruko testiranje porasle na 0,05. Indikatori koji su značajno povezani uz ovo glikansko svojstvo su kontrolirani porod, zastoj u rastu, kakvoća vode prema UN-u, sanitacija i smrtnost na poslu. Tablica 15 prikazuje pet koreliranih svojstava s digalaktoziliranim glikopeptidima imunoglobulina G1.

Tablica 15: Asocijacije indikatora razvoja s digalaktozilacijom imunoglobulina G1. Prikazani su korelacijski koeficijent(r) i p vrijednosti indikatora koreliranih s digalaktozilacijom imunoglobulina G1. p vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje Bonferonijevom korekcijom.

Indikator razvoja	korelacijski koeficijent (r)	p vrijednost
Kontrolirani porod	0,930	0,00095
Zastoj u rastu	0,923	0,00167
Voda (UN)	0,880	0,02225
Sanitacija	0,867	0,04014
Smrtnost na poslu	0,866	0,04123

4.5 Utjecaj biogeografskog podrijetla i zemlje na varijabilnost glikozilacije imunoglobulina G

Budući da glikozilacija Fc fragmenta imunoglobulina G pokazuje veliku varijabilnost, izračunat je udio biogeografske varijabilnosti, države u kojoj ispitanici žive, te dobi i spola u ukupnoj varijabilnosti određenog glikanskog svojstva kako prikazuje Tablica 16.

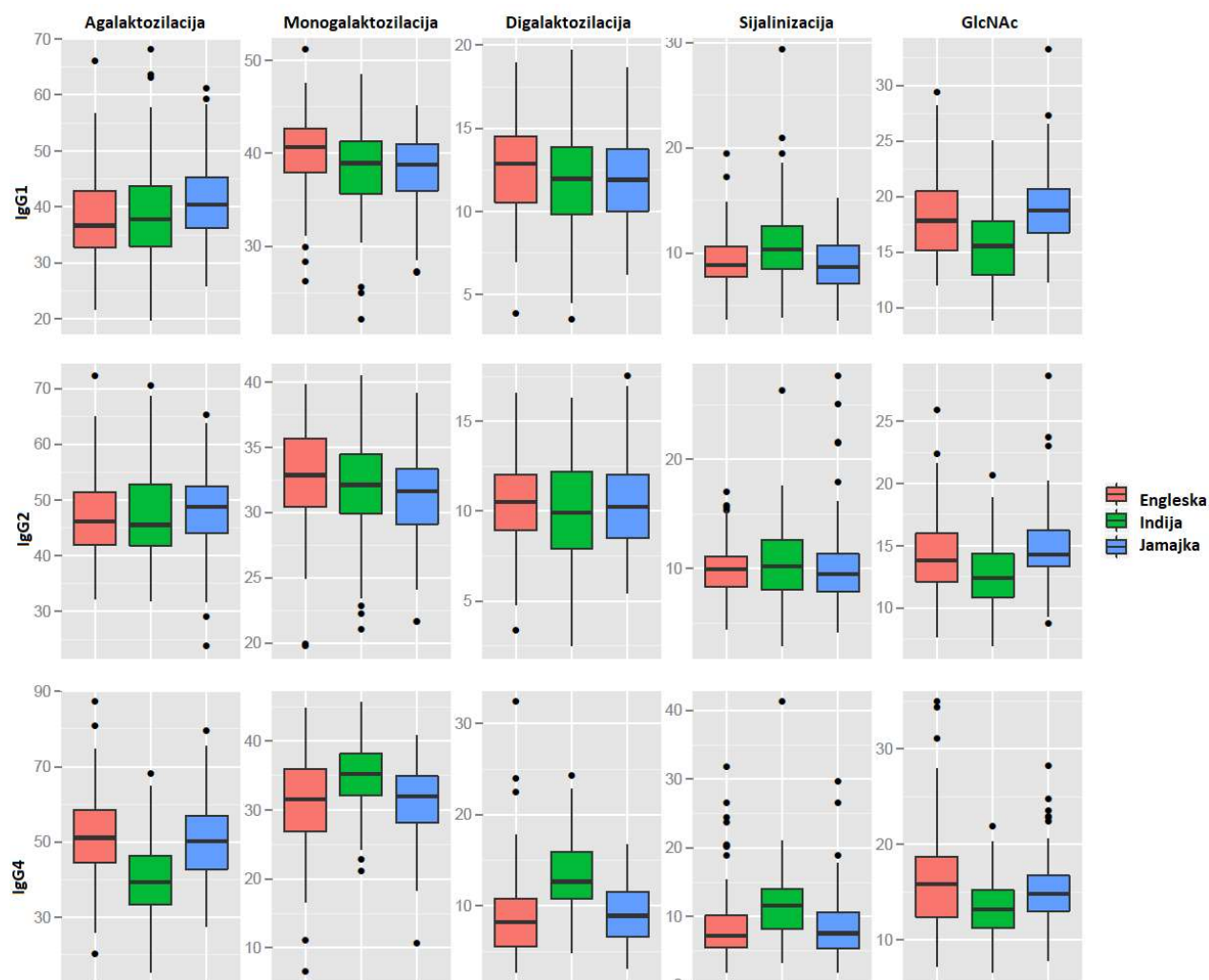
Tablica 16: Udio biogeografskog podrijetla, države, dobi i spola u varijabilnosti specifičnog glikanskog svojstva. Korišten je linearni mješoviti model u kojem su fiksirani parametri bili dob i spol dok su nasumični parametri bili biogeografski položaj i država (n=2658). p vrijednosti manje od 0,003 su smatrane značajnima.

Glikansko svojstvo	Biogeografsko podrijetlo	Država podrijetla	Dob	Spol	p vrijednost
IgG4 Sijalinizacija	0,00%	13,94%	9,59%	0,44%	9,26E-83
IgG1 Monogalaktozilacija	20,48%	11,64%	3,00%	0,07%	1,80E-216
IgG2 Monogalaktozilacija	5,14%	10,28%	8,30%	0,07%	6,16E-106
IgG1 Agalaktozilacija	8,69%	7,76%	19,78%	0,99%	1,37E-129
IgG1 Sijalinizacija	0,73%	7,56%	13,61%	0,60%	1,19E-60
IgG1 Digalaktozilacija	7,88%	6,38%	23,57%	1,22%	3,12E-117
IgG2 Agalaktozilacija	3,29%	5,87%	25,61%	0,96%	4,13E-75
IgG1 Rasijecajući GlcNAc	10,15%	4,85%	18,69%	0,01%	2,68E-121
IgG4 Monogalaktozilacija	10,92%	4,62%	3,21%	0,09%	1,26E-91
IgG2 Digalaktozilacija	3,14%	4,61%	28,95%	1,10%	1,25E-68
IgG2 Rasijecajući GlcNAc	5,19%	4,31%	13,08%	0,06%	1,09E-69
IgG4 Agalaktozilacija	11,72%	3,54%	15,36%	0,41%	1,86E-113
IgG2 Sijalinizacija	1,21%	3,48%	19,51%	0,51%	7,46E-35
IgG4 Digalaktozilacija	10,66%	3,33%	15,82%	0,78%	1,16E-105
IgG4 Rasijecajući GlcNAc	2,60%	3,26%	16,90%	0,69%	8,38E-44

Linearni mješoviti model je pokazao kako biogeografsko podrijetlo uzoraka može opisati do 20% varijabilnosti monogalaktozilacije imunoglobulina G1 te do 11% varijabilnosti agalaktozilacije, monogalaktozilacije i digalaktozilacije imunoglobulina G4. Državom podrijetla uzoraka moglo se opisati do 14% varijabilnosti sijalinizacije imunoglobulina G4 te do 11% varijabilnosti monogalaktozilacije IgG1 i IgG2. Iako u manjem udjelu, biogeografsko podrijetlo i država značajno su pridonosili varijabilnosti sijalinizacije i rasijecajućeg GlcNAc-a na svim podklasama protutijela.

4.6 Usporedba različitih populacija izuzetih u istom kliničkom centru

Kako bi otklonili mogućnost da su potencijalne razlike koje uočene među populacijama posljedica uzorkovanja, skladištenja i rukovanja uzorcima u različitim centrima, uspoređene su tri etnički različite populacije podrijetlom iz Jamajke, Engleske i Indije koje su skupljene u istome medicinskom centru u Velikoj Britaniji. Slika 14 prikazuje usporedbu udjela deriviranih glikanskih svojstava u ove tri populacije.



Slika 14: Razlike u udjelima pojedinih glikanskih grupa u tri populacije izuzete u istom kliničkom centru ($n=389$). Crveni plotovi predstavljaju populaciju Engleske, zeleni populaciju Indije, a plavi populaciju Jamaike. Razlike su vizualizirane kao dijagrami pravokutnika (engl. box plot), gdje svaki pravokutni predstavlja raspon od 25. do 75. percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Vanjske linije predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar 1.5 interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. outliers) naznačene su krugovima. Slika je napravljena u programskom jeziku R verzija 3.0.1.

Za 11 od 15 analiziranih glikanskih svojstava postoje statistički značajne razlike, dok u četiri svojstva ne postoji značajna razliku među ovim populacijama. Svojstva u kojima nema

značajnih razlika su digalaktozilacija IgG1 te digalaktozilacija, agalaktozilacija i sijalinizacija IgG2.

Tablica 17: Usporedba populacija Jamajke, Indije i Engleske. Prikazane p vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje Bonferonijevom korekcijom. Populacija Engleske je korištena kao referentna točka nije prikazana u tablici. Efekti prikazuju razlike srednjih vrijednosti populacija Jamajke i Indije u odnosu na populaciju Engleske.

Glikansko svojstvo	Efekt Jamajka	Efekt Indija	p vrijednost
IgG1 Agalaktozilacija	0.030666	0.339381	4.12E-02
IgG1 Digalaktozilacija	-0.08099	-0.14151	6.22E-01
IgG1 Monogalaktozilacija	-0.52142	-0.54675	1.40E-04
IgG1 Rasijecajući GlcNAc	-0.74712	0.210563	1.76E-11
IgG1 Sijalinizacija	0.512444	-0.04679	1.33E-04
IgG2 Agalaktozilacija	-0.01475	0.110446	6.22E-01
IgG2 Digalaktozilacija	-0.12881	0.030097	5.65E-01
IgG2 Monogalaktozilacija	-0.17418	-0.3754	4.12E-02
IgG2 Rasijecajući GlcNAc	-0.54433	0.232677	3.68E-07
IgG2 Sijalinizacija	0.245579	0.035563	2.24E-01
IgG4 Agalaktozilacija	-0.9878	-0.08391	1.43E-13
IgG4 Digalaktozilacija	1.05981	0.108185	1.85E-15
IgG4 Monogalaktozilacija	0.72002	0.070925	5.27E-07
IgG4 Rasijecajući GlcNAc	-0.73363	-0.18345	1.28E-06
IgG4 Sijalinizacija	0.679897	0.015028	6.13E-07

5 Rasprava

Većina plazmatskih proteina je glikozilirana, a mnogi biološki procesi su regulirani glikozilacijom.⁷ Pravilna glikozilaciju utječe na funkciju i poluživot proteina, a njene promjene dokazane su u mnogim patološkim i fiziološkim stanjima organizma.²² No, iako je važnost glikozilacije proteina neupitna, još uvijek postoji velik broj neodgovorenih pitanja u ovome području. Upravo zbog toga, glikobiologija je brzo rastuće polje znanosti. Potrebno je provođenje studija na velikom broju ispitanika, kakve se provode u genomici i proteomici, kako bi se opsežnije mogla shvatiti uloga i varijabilnost ove proteinske modifikacije kod ljudi.^{138,139} Velike studije zahtijevaju i primjenu visokoprotočnih metoda, koje omogućavaju osjetljivu, robusnu i pouzdanu analizu. Takav tip opsežne analize glikoma pojedinačnog proteina ili ukupnih proteina plazme, na velikom broju ispitanika, još uvijek nije proveden. Razlog tome krije se u strukturalnoj kompleksnosti glikana popraćenoj tehničkim zaprekama, poput osjetljivosti trenutno dostupne opreme te kompliciranih i dugotrajnih analitičkih postupaka koji joj prethode. Također, alati dostupni za analizu višedimenzionalnih glikanskih podataka, koji mogu procesirati, anotirati i spremati prikupljene informacije tek se počinju razvijati.¹⁴⁰

Zbog važnosti glikozilacije za funkciju imunoglobulina G ovakva velika studija bila je potrebna kako bi se odredila njena varijabilnost u različitim populacijama. Studije na većem broju uzoraka su potrebne da se zbog malog broja uzoraka ne bi dolazilo do nasumičnih, a time ponekad i pogrešnih rezultata i zaključaka. Također, ako se želi dobiti informacija o glikozilaciji nekog proteina na globalnoj razini, kao što je u ovom slučaju imunoglobulin G, potrebno je analizirati uzorke iz različitih dijelova svijeta i uključiti čim više različitih etničkih skupina ljudi. Do sada su provedene analize ukupnog glikoma plazme na nekoliko tisuća ispitanika različitim dostupnim metodama (HILIC-UPLC-FLR, MALDI-TOF, CGE-LIF) i glikoma imunoglobulina G (HILIC-UPLC, MALDI-TOF)^{141,142}, no glikopeptidi Fc fragmenta specifični za podklasu imunoglobulina u općoj populaciji zdravih ljudi do sada nisu mjereni u ovako velikom broju. Ovo istraživanje prikazuje analizu glikoma Fc fragmenta imunoglobulina G, mjereno zasebno za svaku njegovu podklasu (IgG1-IgG4), kako bi se dobio uvid u mjesno specifičnu glikozilaciju. Opisana analiza je provedena za 2579 zdravih ljudi, čiji uzorci potječu iz 24 različite etničke skupine iz 14 različitih država koje se nalaze u Europi, Aziji i Africi.

Prije tumačenja dobivenih rezultata potrebno je ukazati na specifičnosti korištene analitičke metode. Budući da se radi o glikopeptidima Fc fragmenta imunoglobulina G, informacija o glikozilaciji Fab fragmenta nije dostupna i zato se glikozilacija protutijela ne može procijeniti

u potpunosti. Zatim, kao što je već spomenuto, jedina podklasa koja se sama odvaja tijekom kromatografije je IgG1. IgG3 u bjelačkoj populaciji ima jednak aminokiselinski sastav kao i IgG2, a u azijskim i afričkim populacijama kao IgG4. Zbog toga se, ovisno o analiziranoj populaciji, imunoglobulin G3 ne može kromatografski razdvojiti od podklasa IgG2 ili IgG4, što onemogućuje donošenje zasebnih zaključaka o navedenim podklasama. Nadalje, spektrometrijom masa ne mogu se razlikovati strukturni izomeri, što znači da se glikopeptidi koji sadržavaju različite heksozne šećerne ostatke (manozne, glukozne ili galaktozne) različito anotiraju, ovisno sadrže li manozu ili galaktozu, na temelju sastava i struktura glikana poznatih iz literature. Također, budući da nije provedena fragmentacija u negativnome načinu rada, koja uzrokuje pucanje šećernih prstenova, literatura je jedini izvor informacija o vezama između monosaharida. Konačno, metodologija korištena u ovom istraživanju onemogućava usporedbu omjera glikopeptida među podklasama, zbog različitog ionizacijskog odgovora peptidne okosnice, međutim može se pretpostaviti da su relativni omjeri glikopeptida unutar pojedinačne podklase stalni.¹⁴³

5.1 Varijabilnost glikozilacije Fc fragmenta imunoglobulina G

Glikozilacija protutijela mijenja se u različitim fiziološkim i patološkim stanjima, a također je poznato kako se mijenja i u općoj populaciji zdravih ljudi. Takva varijabilnost je posljedica kombinacije genskih razlika među pojedincima i okolišnih faktora, koji uz veliki broj gena i ostalih čimbenika uključenih u kompleksnu regulaciju glikozilacije čine ovaj proces dodatno složenim.¹⁴¹ Utjecaj različitih okolišnih čimbenika i ponašanja ispitanika, poput pušenja i konzumacije alkohola, na promjenu glikanskih struktura opisan je u dosadašnjim istraživanjima, no njihov glavni nedostatak je relativno mali broj ispitanika na kojima su provedena.¹ Iako se mnogo zna o varijabilnosti glikana u općim populacijama zdravih ljudi, šire istraživanje na većem broju ispitanika do sada nije bilo napravljeno. Ovo istraživanje prikazuje analizu varijabilnosti glikozilacije Fc fragmenta imunoglobulina G ispitanika iz 14 različitih zemalja i 24 različite etničke skupine.

Ova studija je pokazala veću varijabilnost glikozilacije IgG-a u usporedbi s ukupnim proteinima plazme, što se podudara s dosadašnjim istraživanjima ukupnog glikoma IgG-a.¹³⁰ Većina ove varijabilnosti potječe od deriviranih glikanskih svojstava koja opisuju galaktozilaciju. Primjerice, razina glikana G2NS (dvije galaktoze, rasijećajući GlcNAc i sijalinska kiselina) kod podklase IgG4 ima maksimalnu vrijednost više od 400 puta veću od minimalne vrijednosti. Za razliku od IgG Fc glikoma, glikom ukupnih proteina plazme pokazuje varijabilnost od samo 6%.²

Galaktozilacija imunoglobulina G je jedno od najviše analiziranih glikanskih svojstava. Otkada je otkrivena njegova povezanost s reumatoidnim artritisom, ovo glikansko svojstvo je analizirano u mnogim studijama.^{109,111,114,144} Naime, razina galaktoziliranih glikanskih struktura vezanih na IgG značajno se smanjuje kod navedene autoimune bolesti. U ovom istraživanju udio agalaktoziliranih struktura u svim podklasama IgG-a je bio malo niži od 40%, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima na glikomu ovog proteina, no zamjetno povećanje u odnosu na očekivanu vrijednost za Fc glikopeptide. Agalaktozilacija se pokazala najvarijabilnijim svojstvom od svih deriviranih glikanskih svojstava. Njen interkvartilni raspon iznosio je 13% za podklasu IgG1, što je približno jednako varijabilnosti agalaktozilacije cijelog IgG-a. Za razliku od podklase IgG1, agalaktozilacija podklase IgG4 pokazuje interkvartilni raspon od čak 17%. Budući da ova podklasa IgG-a pokazuje najniže signale, veća eksperimentalna greška može uzrokovati povećanu varijabilnost glikanskih svojstava. Varijabilnost agalaktozilacije unutar pojedinih populacija je poprilično različita među

analiziranim uzorcima. I u ovom slučaju IgG1 je imao najniži interkvartilni raspon od 8% i to u slučaju ispitanika iz Švedske, dok IgG4 pokazuje najveći interkvartilni raspon od čak 20% u populaciji Jakuta.

Udio monogalaktoziliranih glikopeptida u glikomu svih populacija iznosi oko 36% te je poput agalaktozilacije, i monogalaktozilacija potvrdila prethodne podatke kako za cijeli IgG tako i za Fc fragment. Varijabilnost ovog deriviranog glikanskog svojstva za podklase IgG1 i IgG2 je ista kao i kod N-glikoma čitavog IgG-a, gdje je interkvartilni raspon iznosio 4%, dok je za podklasu IgG4 bio nešto viši, oko 6%.

Za razliku od agalaktozilacije i monogalaktozilacije, udio digalaktoziliranih struktura u glikomu Fc fragmenta je iznosio do 15% za različite podklase IgG-a, što je približno 5% manje u odnosu na N-glikom čitavog imunoglobulina G i oko 10% manje od do sada objavljenih vrijednosti udjela digalaktoziliranih struktura u N-glikomu Fc fragmenta.^{145,146}

Poznato je kako se ovakva velika varijabilnost galaktozilacije može se opisati pomoću dobi ispitanika, jer se do 25% varijabilnosti agalaktozilacije i 29% varijabilnosti digalaktozilacije imunoglobulina G2 može objasniti biološkom starošću ispitanika. No, osim dobi, biogeografsko podrijetlo ispitanika također može opisati veliki udio varijabilnosti galaktozilacije. Kod imunoglobulina G1 20% varijabilnosti monogalaktoziliranih glikana se može opisati biogeografskim podrijetlom, dok sama država podrijetla uzoraka može opisati do 12% varijacije monogalaktozilacije IgG1 i IgG2. Slično, do 12% galaktozilacije imunoglobulina G4 može biti opisano biogeografskim podrijetlom. Ove spoznaje upućuju da su ova dva faktora, nakon dobi ispitanika, drugi najveći uzročnici velike varijabilnosti galaktozilacije među populacijama zdravih ljudi.

Sijalinizacija i rasijecajući GlcNAc u ovom istraživanju prate do sada objavljene trendove za glikom čitavog IgG-a.² Prema ranijim studijama oko 10% glikana Fc fragmenta završava sijalinskom kiselinom, dok sijalinizacija u glikomu čitavog IgG-a iznosi oko 20%, budući da je većina sijaliniziranih glikana vezana na Fab regiju.¹¹¹ Sijalinizacija je u analiziranim populacijama prosječno iznosila oko 12%, i to za sve tri podklase IgG-a, što je blagi porast u odnosu na očekivanja iz literature. Ovo povećanje sijalinizacije Fc fragmenta moglo bi biti uzrokovano modifikacijama pripreme i analize uzoraka, koje su rezultirale smanjenom hidrolizom sijalinskih kiselina s analiziranih glikana.

Varijabilnost sijalinizacije u ispitanim populacijama je bila relativno niska. Njezin interkvartilni raspon u svim populacijama iznosio je 5% za podklase IgG1 i IgG2, dok je za podklasu IgG4 iznosio oko 8%. Očekivano, unutar pojedine populacije, interkvartilni rasponi sijalinizacije svih podklasa su nešto manji i ne prelaze 6% za podklase IgG1 i IgG2, dok nasuprot tome, kod ispitanika iz Italije za podklasu IgG4 iznosi čak 9%. Opažena manja varijabilnost sijalinizacije vjerojatno je uzrokovana činjenicom da samo manji dio glikana s Fc fragmenta ima vezanu sijalinsku kiselinu. Također, biogeografsko podrijetlo ispitanika pokazuje jako mali, iako značajan, utjecaj na varijabilnost sijalinizacije - tek oko 1%, dok pripadnost određenoj populaciji može opisivati i do 14% varijacije ovog glikanskog svojstva.

Udio rasijećajućeg GlcNAc-a iznosi oko 13%, za sve populacije ispitanika i podklase IgG-a. Također, ovo glikansko svojstvo ima najmanju varijabilnost od svih ispitanih glikanskih svojstava, kako za sve, tako i unutar pojedinih populacija. Najmanji interkvartilni raspon udjela rasijećajućeg GlcNAc-a pokazuje podklasa IgG2 i to samo 3%, dok podklase IgG1 i IgG4 imaju interkvartilni raspon oko 5%. Iako ovo svojstvo ne pokazuje veliku varijabilnost, zanimljivo je kako čak do 10% njegove varijacije može biti objašnjeno biogeografskim podrijetlom ispitanika, dok 5% može biti opisano državom iz koje potječu uzorci.

Veliki utjecaj biogeografskog podrijetla ispitanika na glikozilaciju imunoglobulina G ne iznenađuje. Budući da je čak do 50% varijabilnosti glikozilacije proteina genski uvjetovano, tako će se na glikozilaciju odraziti i razlike u genskom sastavu pojedinih populacija, pri čemu je poznato da su ispitanici sličnog biogeografskog podrijetla i genski međusobno sličniji.^{2,147} No, budući da osim genskih razlika postoje i razlike u kulturi, ekonomiji, obrazovanju i mnogim drugim čimbenicima, jasno je kako i okoliš ima snažan utjecaj na varijabilnost ove proteinske modifikacije.

5.2 Razina galaktozilacije prati trend razvoja određene zemlje.

U ovom istraživanju ponovno su potvrđena saznanja iz dostupne literature koja opisuju promjene galaktozilacije sa starošću ispitanika.^{109,148,149} No, nedavno je pokazano kako se galaktozilacija N-glikana Fc fragmenta IgG-a, osim s dobi ispitanika, mijenja i ovisno o zemlji podrijetla analiziranih uzroka. Isti takav trend je demonstriran i u ovom istraživanju. Pokazano je kako ispitanici iz zemalja s nižim stupnjem razvoja pokazuju niži stupanj galaktozilacije IgG-a, dok ispitanici iz razvijenijih zemalja pokazuju veću razinu galaktozilacije IgG-a.¹⁴⁴

Kako bi se objasnilo uočeno kretanje promjena galaktozilacije, ovisno o stupnju razvoja određene zemlje, nakon korekcije dobivenih podataka na dob i spol ispitanika, analizirana je povezanost glikozilacije i ljudskog razvojnog indeksa (HDI). Rezultati analize ukazuju na pozitivnu korelaciju monogalaktozilacije Fc fragmenta imunoglobulina G s navedenim indeksom razvoja. HDI indeks pokazao je značajnu povezanost s agalaktozilacijom i monogalaktozilacijom podklase IgG1 te s monogalaktozilacijom podklase IgG2, što ukazuje da osim genskih čimbenika, na galaktozilaciju Fc fragmenta IgG-a jako utječu i okolišni čimbenici predstavljeni ovim indeksom. HDI indeks predstavlja ukupnu mjeru razvijenosti određene zemlje i kao takav se sastoji od tri skupine indikatora razvoja koji se dijele na kvalitetu obrazovanja, BDP i kvalitetu zdravlja ljudi, od kojih su svi tri korelirani s galaktozilacijom. Osim samog HDI indeksa, mnogi drugi indikatori razvoja također su pokazali korelaciju s galaktozilacijom imunoglobulina G, iz čega je vidljivo kako se različiti aspekti kvalitete života ljudi reflektiraju na galaktozilaciju ovog protutijela.

Iz svega navedenog jasno je kako nema jedinstvenog odgovora koji bi opisao utjecaj okoliša na glikozilaciju protutijela, čemu u prilog ide činjenica da od ukupno 45 različitih analiziranih indikatora, njih čak 22 pokazuje značajnu povezanost s glikozilacijom imunoglobulina G. Premda je utjecaj razvijenosti zdravstvenog sustava na zdravlje, pa tako i na glikozilaciju imunoglobulina G relativno lagano objasniti, kvaliteta obrazovanja i BDP također mogu neizravno utjecati na zdravlje ljudi, čime ova mreža interakcija postaje još zamršenija.¹⁵⁰

5.2.1 Galaktozilacija imunoglobulina G odražava zdravlje ispitanika u određenoj zemlji

Kao što je već spomenuto, glikozilacija imunoglobulina G je povezana s mnogim bolestima i fiziološkim stanjima. Najčešće je analizirana povezanost galaktozilacije i upalnih bolesti, odnosno upalnog odgovora.¹⁵⁰ Osim bolesti, mnogi vanjski čimbenici koji dokazano utječu na zdravlje ispitanika, poput pušenja i uzimanja alkohola, također utječu na i promjene u

galaktozilaciji imunoglobulina G. Također, indeks tjelesne mase i mnogi drugi čimbenici su povezani s ovim glikanskim svojstvom. Zbog toga nije iznenađujuća povezanost indikatora vezanih uz zdravlje ispitanika i razine galaktozilacije ovog protutijela.¹³⁰

Prema literaturi, koncentracija imunoglobulina G u krvnoj plazmi ovisi o biogeografskom podrijetlu uzoraka. Naime, usporedba razina IgG-a u plazmi pokazuje kako u bjelačkoj populaciji postoji značajno niža razina IgG-a nego u afro-karibijanskoj, arapskoj, indijskoj i kineskoj populaciji.¹⁵¹ Takve spoznaje dovode do hipoteze da ljudi podrijetlom iz tropskih područja imaju povećanu predispoziciju za proupalni imunološki odgovor. Slično tome, rezultati ovog istraživanja pokazuju smanjenje galaktozilacije u zemljama ovakvog biogeografskog okruženja. U literaturi su također uočene razlike između razvijenih i nerazvijenih zemalja vezano uz serumske koncentracije CRP-a. Naime, u nerazvijenim zemljama primijećena je povećana razina CRP-a, što je objašnjeno povećanom incidencijom parazitskih infekcija i aktivacijom imunološkog sustava. Također je, unutar pojedine zemlje, pokazana slična povezanost galaktozilacije i stupnja urbanizacije nekog područja.¹⁵²

Ova studija ukazuje kako je utjecaj kvalitete zdravstvene zaštite i zdravlja na glikozilaciju vidljiv iz njene povezanosti s indikatorima razvoja, koji su odraz dostupnosti brojnih zdravstvenih usluga. Naime, od ukupno 22 indikatora koji su pokazali značajnu korelaciju s galaktozilacijom imunoglobulina G, njih 19 je vezano uz zdravlje i kvalitetu zdravstvenog sustava određene zemlje. Primjeri navedenih indikatora su kontrolirani porod, smrtnost prije pete godine života, preživljavanje roditelja pri porodu i učestalost infekcija hepatitisom B, a najveći efekt pokazuju kvaliteta zdravstvenog sustava, smrtnost na poslu i zastoj u rastu. Osim s prethodno opisanim, galaktozilacija IgG-a je također povezana i s indikatorima koji ne opisuju izravno kvalitetu zdravstvenog sustava, ali su bitni za ljudsko zdravlje, zbog utjecaja čimbenika koje opisuju na kvalitetu života. To su, primjerice, dostupnost pitke vode, napredna sanitacija, higijena te kvaliteta zraka. Navedeni indikatori potencijalno upućuju na mogućnost povećane izloženosti određene populacije patogenima i alergenima, što posljedično dovodi do aktivacije imunološkog sustava, a time i imunoglobulina G.

Poznata literatura osim povezanosti galaktozilacije s dobi ispitanika, što je u ovom istraživanju potvrđeno, povezuje ovo glikansko svojstvo s upalom u različitim bolestima. Prema tome, osobe poput sportaša, koji potencijalno imaju povećanu upalu zbog velikih fizičkih napora, imaju razinu galaktozilacije kao starije osobe. Sličnu sliku pokazuju stanovnici zemalja koji

imaju lošije indekse razvoja i indikatore vezane uz zdravlje građana gdje očekivana životna dob muškaraca i žena korelira s monogalaktozilacijom IgG1.

Prema svemu navedenom, iz ovih rezultata može se pretpostaviti kako stanovnici zemalja s nižim indikatorima razvoja imaju smanjenu galaktozilaciju imunoglobulina G zbog veće sklonosti upalnom odgovoru i ubrzanijem starenju, koji su posljedica negativnog utjecaja okolišnih čimbenika na njihovo zdravlje.

5.2.2 Galaktozilacija imunoglobulina G uvjetovana je socioekonomskim statusom

Osim faktora vezanih uz zdravstveni sustav i zdravlje, i drugi okolišni čimbenici mogu utjecati na promjene galaktozilacije. Iako u prijašnjim istraživanjima nije pokazana povezanost obrazovanja roditelja s galaktozilacijom imunoglobulina G1 potomaka, ovo istraživanje pokazalo je jaku povezanost razine galaktozilacije i kvalitete obrazovanja ljudi.¹⁴⁴ Osim obrazovnog sustava, očekivana životna dob ispitanika i BDP također pozitivno koreliraju s monogalaktozilacijom IgG1, čime su sva tri krovna indikatora koji čine HDI indeks korelirana s glikozilacijom imunoglobulina G. Iako na prvi pogled veza glikozilacije protutijela s BDP-om i obrazovnim sustavom nije logična, utjecaj ova dva indikatora razvoja na zdravlje ljudi je neupitan.¹⁵⁰ Ova tri parametra međusobno su jako povezana, što pokazuju i socioekonomske studije. Mnogo faktora djeluje međusobno i utječe na zdravlje pojedinaca i društva. Hoće li ljudi biti zdravi ili bolesni uvjetovano je mnogim okolnostima i okolišem. Faktori poput životnog okruženja, genetike, prihoda, obrazovanja i međuljudskih odnosa značajno utječu na zdravlje.¹⁵³ BDP i obrazovanje definiraju socioekonomski status ljudi koji se neminovno reflektira na zdravlje i povezan je s mnogim bolestima poput koronarnih bolesti, shizofrenije i reumatoidnog artritisa. Ove bolesti mogu biti posljedica radnog i životnog okruženja u kojem se ljudi nalaze. No, iako su veze između obrazovanja, BDP-a i zdravstva jasne, mehanizmi koji se skrivaju iza njih još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni.^{154,155}

U ovom istraživanju je na više populacija izmjerena razina glikana Fc fragmenta imunoglobulina G specifično za podklasu proteina. Pokazana je varijabilnost unutar i između pojedinih populacija, čime je kreirana velika količina informacija koje mogu dati uvid o specifičnim glikanskim profilima imunoglobulina G u različitim državama, što je potencijalno bitno kod razvoja dijagnostičkih testova temeljenih na promjenama glikozilacije imunoglobulina G.

Također, iz ovih saznanja može se uočiti jaki utjecaj okoliša na zdravlje ljudi, što pak ovisi o velikom broju međusobno povezanih čimbenika, koji su izravno ili neizravno povezani sa samim zdravljem i zdravstvenim sustavom. Zdravstveno stanje osobe se očituje na glikozilacijskom profilu Fc fragmenta imunoglobulina G, što ga čini dobrim markerom stanja organizma. Upravo zato, glikozilacija može biti korisno oruđe za mjerenje odraza utjecaja velikog broja okolišnih čimbenika na kvalitetu zdravlja, a time i ukupnog života među stanovnicima različitih država.

6 Zaključci

- U ovom istraživanju analizirana je glikozilacija Fc fragmenta specifična za podklasu imunoglobulina G u 24 različite populacije iz cijeloga svijeta. Određeni su N-glikanski profili i varijabilnost ove proteinske modifikacije na globalnoj razini, što može biti korisno kod dizajniranja budućih glikomskih studija i razvoja potencijalnih testova koji mjere razlike u glikozilaciji imunoglobulina G.
- Varijabilnost svih deriviranih glikanskih svojstava Fc fragmenta imunoglobulina G veoma je slična varijabilnosti glikozilacije čitavog protutijela, od čega najviše odstupa agalaktozilacija IgG4, koji ima interkvartilni raspon ovog glikanskog svojstva od 16%.
- Osim dobi i spola ispitanika, biogeografsko podrijetlo te država iz koje potječu također pokazuju veliki utjecaj na varijabilnost glikozilacije Fc fragmenta imunoglobulina G. Naime, biogeografsko podrijetlo može opisati do 21% varijabilnosti monogalaktozilacije imunoglobulina G1, dok država podrijetla ispitanika opisuje do 14% varijabilnosti sijalinizacije imunoglobulina G4.
- Razina galaktoziliranih glikana Fc regije imunoglobulina G prati razinu razvijenosti određene zemlje. Naime, ispitanici iz razvijenijih zemalja karakterizirani su višom razinom galaktozilacije IgG-a, dok su ispitanici iz manje razvijenih zemalja pokazali nižu razinu ovog glikanskog svojstva.
- Indikatori razvijenosti određene zemlje, koji opisuju kvalitetu različitih čimbenika, poput kvalitete zdravstvenog sustava, obrazovanja i bruto domaćeg proizvoda korelirani su s razinom galaktozilacije imunoglobulina G.
- Galaktozilacija može biti koristan alat za mjerenje odraza utjecaja velikog broja genskih i okolišnih čimbenika na kvalitetu zdravlja i života među stanovnicima različitih država.

7 Literatura

1. Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C et al. (2009) Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *J. Proteome Res.* 8: 694–701.
2. Pucić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O et al. (2011) High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol. Cell. Proteomics* 10: M111.010090.
3. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1473: 4–8.
4. Roth J (2002) Protein N-Glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to Organelle Topography and Function, Protein Quality Control, and Cell Interactions. 102: 285–303.
5. Ohtsubo K, Marth JD (2006) Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* 126: 855–867.
6. Cummings RD, Lecture C, Landsteiner K, Watkins WM, Morgan WT, Morgan WT et al. (2009) The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol. Biosyst.* 5: 1087–1104.
7. Hart GW, Copeland RJ, An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB, Aoki-Kinoshita KF et al. (2010) Glycomics hits the big time. *Cell* 143: 672–676.
8. Lisowska E, Jaskiewicz E, Lisowska E, Jaskiewicz E (2012) eLS Wiley & Sons, New Jersey
9. Endo T, Seeberger PH, Hart GW, Wong CH, Taniguchi N (2015) Glycoscience: Biology and Medicine Springer, New York
10. Cohen M (2015) Notable Aspects of Glycan-Protein Interactions. *Biomolecules* 5: 2056–2072.

11. Nagae M, Yamaguchi Y (2015) Sugar recognition and protein–protein interaction of mammalian lectins conferring diverse functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 34: 108–115.
12. Sperandio M, Gleissner CA, Ley K (2009) Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev.* 230: 97–113.
13. Diekman AB (2003) Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 298–308.
14. Suzuki Y (2005) Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 399–408.
15. Partridge EA (2004) Regulation of Cytokine Receptors by Golgi N-Glycan Processing and Endocytosis. *Science* (80-.). 306: 120–124.
16. Wide L, Naessén T, Sundström-Poromaa I, Eriksson K (2007) Sulfonation and Sialylation of Gonadotropins in Women during the Menstrual Cycle, after Menopause, and with Polycystic Ovarian Syndrome and in Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 4410–4417.
17. Egrie JC, Browne JK (2001) Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br. J. Cancer* 84: 3–10.
18. Whelan SA, Hart GW (2003) Proteomic Approaches to Analyze the Dynamic Relationships Between Nucleocytoplasmic Protein Glycosylation and Phosphorylation. *Circ. Res.* 93: 1047–1058.
19. Hart GW, Akimoto Y (2009) *Essentials of Glycobiology* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
20. Lewis BA (2013) O-GlcNAcylation at promoters, nutrient sensors, and transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1829: 1202–1206.
21. Freeze HH (2001) Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiology* 11: 129–143.
22. Stowell SR, Ju T, Cummings RD (2015) Protein glycosylation in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 10: 473–510.

23. Thanabalasingham G, Huffman JE, Kattla JJ, Novokmet M, Rudan I, Gloyn AL et al. (2013) Mutations in HNF1A Result in Marked Alterations of Plasma Glycan Profile. *Diabetes* 62: 1329–1337.
24. Hwang H, Zhang J, Chung KA, Leverenz JB, Zabetian CP, Peskind ER et al. (2009) Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. *Mass Spectrom. Rev.* 29: 79–125.
25. Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M et al. (2015) Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol.* 67: 2978–2989.
26. Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J et al. (2015) Inflammatory Bowel Disease Associates with Proinflammatory Potential of the Immunoglobulin G Glycome. *Inflamm. Bowel Dis.* 21: 1237–1247.
27. Taniguchi N, Kizuka Y (2015) Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv. Cancer Res.* 126: 11–51.
28. Ogata S, Shimizu C, Franco A, Touma R, Kanegaye JT, Choudhury BP et al. (2013) Treatment response in Kawasaki disease is associated with sialylation levels of endogenous but not therapeutic intravenous immunoglobulin G. *PLoS One* 8: e81448.
29. Harada Y, Nakajima K, Masahara-Negishi Y, Freeze HH, Angata T, Taniguchi N et al. (2013) Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 19366–71.
30. Rush JS (2015) Role of Flippases in Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Lipid Insights* 8: 45–53.
31. Sanyal S, Frank CG, Menon AK (2008) Distinct flippases translocate glycerophospholipids and oligosaccharide diphosphate dolichols across the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 47: 7937–7946.
32. Schenk B, Imbach T, Frank CG, Grubenmann CE, Raymond G V, Hurvitz H et al. (2001) MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation, designated type If. *J. Clin. Invest.* 108: 1687–1695.
33. Pabst M, Grass J, Toegel S, Liebmingier E, Strasser R, Altmann F (2012) Isomeric

- analysis of oligomannosidic N-glycans and their dolichol-linked precursors. *Glycobiology* 22: 389–399.
34. Li H, Debowski AW, Liao T, Tang H, Nilsson H-O, Marshall BJ et al. (2016) Understanding protein glycosylation pathways in bacteria. *Future Microbiol.* 12: 59–72.
 35. Frey AD, Aebi M (2015) An enzyme-based screening system for the rapid assessment of protein N-glycosylation efficiency in yeast. *Glycobiology* 25: 252–257.
 36. Shrimal S, Cherepanova NA, Gilmore R (2015) Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* 41: 71–78.
 37. Harada Y, Masahara-Negishi Y, Suzuki T (2015) Cytosolic-free oligosaccharides are predominantly generated by the degradation of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells. *Glycobiology* 25: 1196–1205.
 38. Satoh T, Toshimori T, Yan G, Yamaguchi T, Kato K (2016) Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control. *Sci. Rep.* 6: 20575.
 39. Ziegler FD, Gemmill TR, Trimble RB (1994) Glycoprotein synthesis in yeast. Early events in N-linked oligosaccharide processing in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 269: 12527–12535.
 40. Schachter H (2014) Complex N-glycans: the story of the ‘yellow brick road’. *Glycoconj. J.* 31: 1–5.
 41. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) *Immunobiology*, 5th edition Garland Science, New York
 42. Litman GW, Rast JP, Shambloott MJ, Haire RN, Hulst M, Roess W et al. (1993) Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 10: 60–72.
 43. Borghesi L, Milcarek C (2006) From B Cell to Plasma Cell: Regulation of V(D)J Recombination and Antibody Secretion. *Immunol. Res.* 36: 27–32.

44. Buckley RH (1986) Humoral immunodeficiency. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 40: 13–24.
45. Dispenzieri A, Gertz MA, Therneau TM, Kyle RA (2001) Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy. *Mayo Clin. Proc.* 76: 476–487.
46. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL et al. (1999) International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* 31: 929–938.
47. Yamamoto K, Terada R, Okamoto R, Hiasa Y, Abe M, Onji M et al. (2003) A scoring system for primary biliary cirrhosis and its application for variant forms of autoimmune liver disease. *J. Gastroenterol.* 38: 52–59.
48. Sasse EA (1992) Determination of reference intervals in the clinical laboratory using the proposed guideline National Committee for Clinical Laboratory Standards C28-P. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116: 710–713.
49. Maddison SE, Reimer CB (1976) Normative values of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion: a review. *Clin. Chem.* 22: 594–601.
50. Rodríguez-Segade S, Camiña MF, Paz JM, Del Río R (1991) Abnormal serum immunoglobulin concentrations in patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* 203: 135–142.
51. van de Wiel A, van Hattum J, Schuurman HJ, Kater L (1988) Immunoglobulin A in the diagnosis of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 94: 457–462.
52. Lewis M, Miyashiro M, Huton J, Miller L, Sperber K (1998) Immunoglobulin and IgG subclass levels in the African American and Hispanic populations of east Harlem. *Mt. Sinai J. Med.* 65: 139–145.
53. Ichihara K, Itoh Y, Min W-K, Yap SF, Lam CWK, Kong XT et al. (2004) Diagnostic and epidemiological implications of regional differences in serum concentrations of proteins observed in six Asian cities. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42: 800–809.
54. Williams AF, Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 381–405.

55. Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R et al. (2015) Glycans In The Immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A Critical Review. *J. Autoimmun.* 57: 1–13.
56. Parker DC (1993) T Cell-Dependent B Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 331–360.
57. Market E, Papavasiliou FN (2003) V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol.* 1: e16.
58. Diaz M, Casali P (2002) Somatic immunoglobulin hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 235–240.
59. Woof JM, Burton DR (2004) Human antibody–Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 89–99.
60. Underdown BJ, Schiff JM (1986) Immunoglobulin A: Strategic Defense Initiative at the Mucosal Surface. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 389–417.
61. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengtén E et al. (2009) Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell–stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10: 889–898.
62. Karupiah G, Chaudhri G (Nature Publishing Group 2004). *Immunology, Infection, and Immunity. Immunology and Cell Biology* 82:
63. Geisberger R, Lamers M, Achatz G (2006) The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* 118: 429–437.
64. Collin M, Shannon O, Bjorck L (2008) IgG glycan hydrolysis by a bacterial enzyme as a therapy against autoimmune conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 4265–4270.
65. Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, Lellouch AC et al. (1998) The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of N-Glycosylation on Fc Receptor Interactions. *J. Biol. Chem.* 273: 2260–2272.
66. Goding JW (1978) Allotypes of IgM and IgD Receptors in the Mouse: A Probe for Lymphocyte Differentiation. *Contemp. Top. Immunobiol.* 8: 203–243.

67. Stavnezer J, Amemiya CT (2004) Evolution of isotype switching. *Semin. Immunol.* 16: 257–275.
68. Yu K, Raghavan SC (2006) Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst).* 5: 1234–1245.
69. Rispens T, Vidarsson G (2014) Human IgG Subclasses. *Antib. Fc Link. Adapt. Innate Immun.* 159–177.
70. Hamilton RG (1987) Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 33: 1707–1725.
71. Michaelsen TE, Naess LM, Aase A (1993) Human IgG3 is decreased and IgG1, IgG2 and IgG4 are unchanged in molecular size by mild reduction and reoxidation without any major change in effector functions. *Mol. Immunol.* 30: 35–45.
72. Roux KH, Strelets L, Michaelsen TE (1997) Flexibility of human IgG subclasses. *J. Immunol.* 159: 3372–3382.
73. Carrasco B, Garcia de la Torre J, Davis KG, Jones S, Athwal D, Walters C et al. (2001) Crystallohydrodynamics for solving the hydration problem for multi-domain proteins: open physiological conformations for human IgG. *Biophys. Chem.* 93: 181–196.
74. Berkowska MA, Driessen GJA, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A et al. (2011) Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118: 2150–2158.
75. Jefferis R, Kumararatne DS (1990) Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin. Exp. Immunol.* 81: 357–367.
76. Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG (1990) IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 16–24.
77. Hammarström L, Smith CI (1983) IgG2 deficiency in a healthy blood donor. Concomitant lack of IgG2, IgA and IgE immunoglobulins and specific anti-carbohydrate antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 51: 600–604.

78. Kuijpers TW, Weening RS, Out TA IgG subclass deficiencies and recurrent pyogenic infections, unresponsiveness against bacterial polysaccharide antigens. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 20: 28–34.
79. Brezski RJ, Jordan RE (2010) Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases. *MAbs* 2: 212–220.
80. Söderström T, Enskog A, Samuelsson BE, Cedergren B (1985) Immunoglobulin subclass (IgG3) restriction of anti-P and anti-Pk antibodies in patients of the rare p blood group. *J. Immunol.* 134: 1–3.
81. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5: 520.
82. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T (2009) Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin. Exp. Allergy* 39: 469–477.
83. Jutel M, Akdis CA (2011) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 66: 725–732.
84. van Helden PMW, van den Berg HM, Gouw SC, Kaijen PHP, Zuurveld MG, Mauser-Bunschoten EP et al. (2008) IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *Br. J. Haematol.* 142: 644–652.
85. Hart MH, de Vrieze H, Wouters D, Wolbink G-J, Killestein J, de Groot ER et al. (2011) Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *J. Immunol. Methods* 372: 196–203.
86. Takahashi H, Yamamoto M, Suzuki C, Naishiro Y, Shinomura Y, Imai K (2010) The birthday of a new syndrome: IgG4-related diseases constitute a clinical entity. *Autoimmun. Rev.* 9: 591–594.
87. Yamamoto M, Tabeya T, Naishiro Y, Yajima H, Ishigami K, Shimizu Y et al. (2012) Value of serum IgG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Mod. Rheumatol.* 22: 419–425.
88. Jefferis R (2007) Antibody therapeutics: *Expert Opin. Biol. Ther.* 7: 1401–1413.

89. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA (2007) The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 21–50.
90. Jefferis R (2009) Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol. Sci.* 30: 356–362.
91. Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA (1996) A Rapid High-Resolution High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles. *Anal. Biochem.* 240: 210–226.
92. Holland M, Yagi H, Takahashi N, Kato K, Savage COS, Goodall DM et al. (2006) Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760: 669–677.
93. Shibata-Koyama M, Iida S, Okazaki A, Mori K, Kitajima-Miyama K, Saitou S et al. (2009) The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology* 19: 126–134.
94. Takasaki S, Kobata A (1986) Asparagine-linked sugar chains of fetuin: occurrence of tetrasialyl triantennary sugar chains containing the Gal.beta.1 .fwdarw. 3GlcNAc sequence. *Biochemistry* 25: 5709–5715.
95. Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Jefferis R (1996) Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc gamma receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains. *J. Immunol.* 157: 4963–4969.
96. Yamaguchi Y, Kato K, Shindo M, Aoki S, Furusho K, Koga K et al. (1998) Dynamics of the carbohydrate chains attached to the Fc portion of immunoglobulin G as studied by NMR spectroscopy assisted by selective ¹³C labeling of the glycans. *J. Biomol. NMR* 12: 385–394.
97. Rademacher TW, Williams P, Dwek RA (1994) Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 6123–6127.

98. Jassal R, Jenkins N, Charlwood J, Camilleri P, Jefferis R, Lund J (2001) Sialylation of Human IgG-Fc Carbohydrate by Transfected Rat α 2,6-Sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 243–249.
99. Stewart R, Thom G, Levens M, Güler-Gane G, Holgate R, Rudd PM et al. (2011) A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Eng. Des. Sel.* 24: 671–678.
100. Voynov V, Chennamsetty N, Kayser V, Helk B, Forrer K, Zhang H et al. (2009) Dynamic Fluctuations of Protein-Carbohydrate Interactions Promote Protein Aggregation. *PLoS One* 4: e8425.
101. Sazinsky SL, Ott RG, Silver NW, Tidor B, Ravetch J V, Wittrup KD (2008) Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 20167–20172.
102. Baruah K, Bowden TA, Krishna BA, Dwek RA, Crispin M, Scanlan CN (2012) Selective deactivation of serum IgG: A general strategy for the enhancement of monoclonal antibody receptor interactions. *J. Mol. Biol.* 420: 1–7.
103. Mimura Y, Church S, Ghirlando R, Ashton P., Dong S, Goodall M et al. (2000) The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol. Immunol.* 37: 697–706.
104. Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I et al. (2011) Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc γ RIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 12669–12674.
105. Mori K, Iida S, Yamane-Ohnuki N, Kanda Y, Kuni-Kamochi R, Nakano R et al. (2007) Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies. *Cytotechnology* 55: 109–114.
106. Jefferis R (2009) Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8: 226–234.
107. Wuhrer M, Porcelijn L, Kapur R, Koeleman CAM, Deelder AM, de Haas M et al. (2009)

Regulated Glycosylation Patterns of IgG during Alloimmune Responses against Human Platelet Antigens. *J. Proteome Res.* 8: 450–456.

108. Houde D, Peng Y, Berkowitz SA, Engen JR (2010) Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol. Cell. Proteomics* 9: 1716–1728.
109. Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, Rademacher T (1988) Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J. Exp. Med.* 167: 1731–1736.
110. Parekh R, Isenberg D, Rook G, Roitt I, Dwek R, Rademacher T (1989) A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J. Autoimmun.* 2: 101–114.
111. Rook GAW, Steele J, Brealey R, Whyte A, Isenberg D, Sumar N et al. (1991) Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *J. Autoimmun.* 4: 779–794.
112. Alavi A, Axford J (1995) Beta 1,4-galactosyltransferase variations in rheumatoid arthritis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 376: 185–192.
113. Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sørensen SF, Petersen J et al. (2000) Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *J. Rheumatol.* 27: 26–34.
114. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M et al. (2012) Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat. Med.* 18: 1401–1406.
115. Kaneko Y (2006) Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* (80-.). 313: 670–673.
116. Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cai AN, Raju TS (2007) Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol.* 44: 1524–1534.
117. Oefner CM, Winkler A, Hess C, Lorenz AK, Holecska V, Huxdorf M et al. (2012)

- Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129: 1647–1655.
118. Gelfand EW (2012) Intravenous Immune Globulin in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *N. Engl. J. Med.* 367: 2015–2025.
 119. Ramakrishna C, Newo ANS, Shen Y-W, Cantin E (2011) Passively Administered Pooled Human Immunoglobulins Exert IL-10 Dependent Anti-Inflammatory Effects that Protect against Fatal HSV Encephalitis. *PLoS Pathog.* 7: e1002071.
 120. Kanda Y, Yamada T, Mori K, Okazaki A, Inoue M, Kitajima-Miyama K et al. (2007) Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* 17: 104–118.
 121. Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, Shah B, Lee E, Bondarenko P V et al. (2011) High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* 21: 949–959.
 122. Chen X, Liu YD, Flynn GC (2009) The effect of Fc glycan forms on human IgG2 antibody clearance in humans. *Glycobiology* 19: 240–249.
 123. Wright A, Sato Y, Okada T, Chang K, Endo T, Morrison S (2000) In vivo trafficking and catabolism of IgG1 antibodies with Fc associated carbohydrates of differing structure. *Glycobiology* 10: 1347–1355.
 124. Pomin VH (2012) Unravelling Glycobiology by NMR Spectroscopy. *Glycosylation* 63–98.
 125. Duncan AR, Winter G (1988) The binding site for C1q on IgG. *Nature* 332: 738–740.
 126. Hodoniczky J, Zheng YZ, James DC (2005) Control of Recombinant Monoclonal Antibody Effector Functions by Fc N-Glycan Remodeling in Vitro. *Biotechnol. Prog.* 21: 1644–1652.
 127. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB (1995) Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat. Med.* 1: 237–243.

128. Huffman JE, Pu i -Bakovi M, Klari L, Hennig R, Selman MHJ, Vu kovi F et al. (2014) Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Mol. Cell. Proteomics* 13: 1598–1610.
129. Stavenhagen K, Hinneburg H, Thaysen-Andersen M, Hartmann L, Silva DV, Fuchser J et al. (2013) Quantitative mapping of glycoprotein micro-heterogeneity and macro-heterogeneity: an evaluation of mass spectrometry signal strengths using synthetic peptides and glycopeptides. *J. Mass Spectrom.* 48: 627–639.
130. Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C et al. (2009) Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *J. Proteome Res.* 8: 694–701.
131. Versini M, Jeandel P-Y, Bashi T, Bizzaro G, Blank M, Shoenfeld Y (2015) Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. *BMC Med.* 13: 81.
132. Kawai T, Akira S (2011) Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34: 637–650.
133. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ (2013) Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2: 168.
134. de Jong SE, Selman MHJ, Adegnika AA, Amoah AS, van Riet E, Kruize YCM et al. (2016) IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Sci. Rep.* 6: 28207.
135. Selman MHJ, Derks RJE, Bondt A, Palmblad M, Schoenmaker B, Koeleman CAM et al. (2012) Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. *J. Proteomics* 75: 1318–1329.
136. Lim SS, Allen K, Bhutta ZA, Dandona L, Forouzanfar MH, Fullman N et al. (2016) Measuring the health-related Sustainable Development Goals in 188 countries: a baseline analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388: 1813–1850.

137. Bondt A, Haan N De, Rombouts Y, Wuhrer M (2016) Recent advances in clinical glycoproteomics of immunoglobulins. *15*: 2217–2228.
138. Project Consortium G, Author C, Committee S, Group P, College of Medicine B, Institute of MIT B et al. (2011) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061–1073.
139. Legrain P, Aebersold R, Archakov A, Bairoch A, Bala K, Beretta L et al. (2011) The human proteome project: current state and future direction. *Mol. Cell. Proteomics* 10: M111.009993.
140. Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM (2008) GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics* 24: 1214–1216.
141. Trbojević-Akmačić I, Vilaj M, Lauc G (2016) High-throughput analysis of immunoglobulin G glycosylation. *Expert Rev. Proteomics* 13: 523–534.
142. Ruhaak LR, Uh H-W, Beekman M, Hokke CH, Westendorp RGJ, Houwing-Duistermaat J et al. (2011) Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *J. Proteome Res.* 10: 1667–1674.
143. Reiding KR, Ruhaak LR, Uh H-W, el Bouhaddani S, van den Akker EB, Plomp R et al. (2017) Human Plasma *N* -glycosylation as Analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-MS Associates with Markers of Inflammation and Metabolic Health. *Mol. Cell. Proteomics* 16: 228–242.
144. de Jong SE, Selman MHJ, Adegnika AA, Amoah AS, van Riet E, Kruize YCM et al. (2016) IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Sci. Rep.* 6: 28207.
145. Wuhrer M, Stam JC, van de Geijn FE, Koeleman CAM, Verrips CT, Dolhain RJEM et al. (2007) Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics* 7: 4070–4081.
146. Vestrheim AC, Moen A, Egge-Jacobsen W, Bratlie DB, Michaelsen TE (2013) Different Glycosylation Pattern of Human IgG1 and IgG3 Antibodies Isolated from Transiently as well as Permanently Transfected Cell Lines. *Scand. J. Immunol.* 77: 419–428.

147. Tishkoff SA, Kidd KK (2004) Implications of biogeography of human populations for 'race' and medicine. *Nat. Genet.* 36: 21–27.
148. Pezer M, Stambuk J, Perica M, Razdorov G, Banic I, Vuckovic F et al. (2016) Effects of allergic diseases and age on the composition of serum IgG glycome in children. *Sci. Rep.* 6: 33198.
149. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beccheli I et al. (2014) Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69: 779–789.
150. Boyle MH, Racine Y, Georgiades K, Snelling D, Hong S, Omariba W et al. (2006) The influence of economic development level, household wealth and maternal education on child health in the developing world. *Soc. Sci. Med.* 63: 2242–2254.
151. Anwar MA, Rampling MW (1994) Comparative hemorheology of five healthy, ethnically diverse groups: Results of a pilot study. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 14: 697–707.
152. Fischbacher CM, Bhopal R, Blackwell CC, Ingram R, Unwin NC, White M et al. (2003) IgG is higher in South Asians than Europeans: Does infection contribute to ethnic variation in cardiovascular disease? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 703–704.
153. Povall SL, Haigh FA, Abrahams D, Scott-Samuel A (2014) Health equity impact assessment. *Health Promot. Int.* 29: 621–633.
154. Werner S, Malaspina D, Rabinowitz J (2006) Socioeconomic Status at Birth Is Associated With Risk of Schizophrenia: Population-Based Multilevel Study. *Schizophr. Bull.* 33: 1373–1378.
155. Bradley RH, Corwyn RF (2002) Socioeconomic Status and Child Development. *Annu. Rev. Psychol.* 53: 371–399.

8 Popis kratica

2-AB 2-aminobenzamid

2-PB 2-pikolin boran

ADCC stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (eng. antibody-dependent cellmediated cytotoxicity)

CDG nasljedni poremećaji glikozilacije (eng. congenital disorders of glycosylation)

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

CV koeficijent varijacije (eng. coefficient of variation)

Dol-P dolikol fosfat

Dol-P-P dolikol pirofosfat

DTT ditiotreitol

ER endoplazmatski retikulum

EU jedinica emisije (eng. emission unit)

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

Fc fragment koji kristalizira (eng. fragment crystallizable)

GDP gvanozin-5'-difosfat

GK Golgijev kompleks

GP glikanski pik

GPI glikozilfosfatidilinozitolno sidro

GU jedinica glukoze (eng. glucose unit)

GuHCl gvanidin hidroklorid

GWAS cijelogenomske asocijacijske studije (eng. genome-wide association studies)

IAA jodoacetamid

IL interleukin

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

IgG imunoglobulin G

LC tekućinska kromatografija (eng. liquid chromatography)

MALDI matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (eng. matrixassisted laser desorption/ionization)

MBL manoza-vezujući lektin (eng. mannose-binding lectin)

MS spektrometrija masa (eng. mass spectrometry)

OST oligosaharil-transferaza

PBS fosfatni pufer (eng. phosphate buffered saline)

PNGaza F peptidil-N-glikozidaza F

PVDF poliviniliden fluorid

SD standardna devijacija

SDS natrijev dodecil-sulfat (eng. sodium dodecyl sulphate)

SPE ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. solid phase extraction)

TCEP tris(2-karboksietil) fosfin

TEAB trietilamonijev bikarbonat

TNF faktor tumorske nekroze (eng. tumor necrosis factor)

Tris tris(hidroksimetil)aminometan

UDP uridin-5'-difosfat

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

9 Životopis

Jerko Štambuk je rođen 4. svibnja 1987. godine u Zagrebu gdje je pohađao osnovnu i srednju školu. Završio je diplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2011. godine s radom na temu „Utjecaj nedostatka proteina FADD na aktivnost kaspaza“. Doktorski studij biologije na Biološkom odjeku PMF-a upisao je 2012. godine.

Od prosinca 2012 godine zaposlen je kao doktorand-istraživač u glikobiološkom laboratoriju Genos d.o.o gdje je radio na FP7 projektu Painomics. Znanstveno se usavršavao u Sveučilišnom medicinskom centru u Leidenu, Nizozemska i Kraljevskom koledžu u Londonu, UK.

Koautor je devet znanstvenih radova objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom. Sudjelovao je na nekoliko znanstvenih skupova s posterskim izlaganjima.