Analiza stabilnosti glikozilacije imunoglobulina G tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa

Bubić, Ante

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:147151

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Ante Bubić

Analiza stabilnosti glikozilacije imunoglobulina G tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa

Diplomski rad

Zagreb

2016.

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ante Bubić

Analiza stabilnosti glikozilacije imunoglobulina G tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistra kemije

Zagreb

2016.

Ovaj je diplomski rad izrađen u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o, pod mentorstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca i neposrednim vodstvom Jerka Štambuka, mag. biol. mol.. Nastavnik: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

- Zahvaljujem prof. dr. sc. Gordanu Laucu na pruženoj prilici i mentorstvu prilikom izrade mojega diplomskoga rada.
- Uz veliko poštovanje, neizmjerno zahvaljujem neposrednom voditelju Jerku Štambuku, mag. mol. biol. na pruženoj pomoći i predanom znanju.
- Zahvaljujem dr. sc. Franu Vučkoviću na statističkoj obradi dobivenih rezultata.
- Zahvaljujem svima u tvrtki Genos na razumijevanju, strpljenju i predivnim uvjetima i radnoj okolini.
- Zahvaljujem doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na znanju koje je dala kroz svoj kolegij *Genetičko i proteinsko inženjerstvo* čime me je još više potaknula u ovom smjeru znanosti i štoviše tome što je pristala biti nastavnik mojeg diplomskog rada.
- Zahvaljujem izv. prof. Sandi Rončević na uputama interpretacije dobivenih podataka.
- Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama, koji su bili tu kada je bilo dobro i kada je bilo teško.
- Najveća hvala mojim roditeljima i bližnjima što su mi omogućili sve ovo i bili podrška u svakom trenutku.

Sadržaj

SAŽETAK III

ABSTRACT IV

POPIS KRATICA V

§ 1. UVOD 1

1.1. Cilj i svrha rada 2

§ 2. LITERATURNI PREGLED 3

2.1. Glikozilacija proteina 3

2.1.1. Funkcija i značajnost glikozilacije 3

2.1.2. Vrsta glikozilacije 4

2.2. N-glikozilacija 5

2.2.1. Biosinteza i struktura N-vezanih glikana 5

2.2.2. Prijenos glikana na okosnicu polipeptida 7

2.2.3. Razgradnja glikozidazama u lumenu ER-a 7

2.2.4. Preslagivanje glikana GK glikozidazama i glikotransferazama 8

2.3. Imunoglobulini 11

2.3.1. Topologija protutijela 12

2.3.2. Struktura protutijela 12

2.4. Imunoglobulin G 13

2.4.1. Struktura i funkcija regije Fc ljudskog imunoglobulina G 13

2.4.2. N-glikozilacija regije Fc ljudskog imunoglobulina G 16

2.5. Viskoprotočne metode analize N-glikozilacije imunoglobulina G 16

2.5.1. Tekućinska kromatografija: rpHPLC i rpUHPLC 17

2.5.2. Spektrometrija masa: ESI-TOF-MS 18

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 21

3.1. Materijali 21

3.1.1. Korištene kemikalije 21

3.1.2. Enzimi *21*
3.1.3. Korištene filtar pločice *21*
3.1.4. Korištene pločice *22*
3.1.5. Korišteni ostali pribor i uređaji *22*
3.1.6. Priprema otopina acetonitrila *23*
3.1.7. Priprema otopine Tripsina *23*
3.1.8. Priprema otopine TFA i AF pufera *23*
3.2. Optimizacija predanalitičkog postupka analize N-glikozilacije IgG-a LC-ESI-TOF tehnikom 24
3.2.1. Postupak tripsinizacije *25*
3.2.2. Postupak ekstrakcije glikopeptida *26*
3.2.3. Utjecaj efekta razrjeđenja na ekstrakciju glikopeptida *27*
3.3. Priprema i analiza biološkog uzorka 29
3.3.1. Biološki uzorak *29*
3.3.2. Analiza stabilnosti glikozilacije IgG-a *29*
3.3.3. Parametri instrumenta pri analizi *30*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 32
4.1. Optimizacija predanalitičkog postupka analize N-glikozilacije IgG-a LC-ESI-TOF tehnikom 32
4.1.1. Utjecaj efekta razrjeđenja na ekstrakciju glikopeptida *35*
4.2. Analiza stabilnosti glikozilacije IgG-a 36
§ 5. ZAKLJUČAK 39
§ 6. LITERATURNI IZVORI 40
§ 7. PRILOZI VII
7.1. Popis p vrijednosti za svaku glikoformu pojedinog podrazreda IgG-a.... VII
7.2. Popis aminokiselina IX
7.3. Životopis X

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Analiza stabilnosti glikozilacije imunoglobulina G tekućinskom kromatografijom spregnutom sa sprektrometrijom masa

Ante Bubić

Genos, d.o.o., Laboratorij za glikobiologiju, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

Plazma stanice luče protutijela tj. imunoglobuline. Do danas je poznato pet vrsta imunoglobulina kategoriziranih kao IgA, IgG, IgM, IgD, IgE. Područje interesa ovoga rada je IgG, odnosno *N*-glikozilacija fragmenta Fc imunoglobulina G. Glikozilacija ovog fragmenta je od velike važnosti; najmanja promjena može utjecati na efektorsku ulogu samog IgG-a, a time u konačnici na imunološku reakciju. Prvi dio rada usredotočen je na optimizaciju predanalitičkih koraka već postojeće metode. Drugi dio rada je usredotočen na analizu stabilnosti glikozilacije IgG-a. Analizirana je glikozilacija fragmenta Fc IgG-a kod 8 ispitanika u tri vremenske točke. Dobiveni rezultati ovom metodom (LC-ESI-MS) upućuju na to da postoje promjene u glikozilaciji IgG-a. Promjene su uočene u IgG4 kod dvije glikoforme; G0FN te G1FN u istog ispitanika.

(42 stranica, 19 slika, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

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

Ključne riječi: IgG, tekućinska kromatografija, spektrometrija masa, TOF, *N*-glikozilacija, optimizacija.

Mentor: Prof. dr. sc. Gordan Lauc
Neposredni voditelj: Jerko Štambuk, mag. mol. biol.
Nastavnik: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Rad prihvaćen: 16. veljače 2017.

Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
Izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
Izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
Zamjena: Doc. dr. sc. Marko Močibob

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Thesis Paper

ABSTRACT

Stability Analysis of Immunoglobulin G glycosylation by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry

Ante Bubić

Genos, d.o.o., Glycobiology laboratory, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

Plasma cells secrete antibodies ie. immunoglobulins. Until now, there are five types of immunoglobulins known classified as IgA, IgG, IgM, IgD, IgE. The area of interest in this thesis is IgG, particularly *N*-glycosylation of the Fc fragment of immunoglobulin G. Glycosylation of this fragment is of great importance; the smallest change can affect the effector role of IgG, and thus ultimately the immunological reaction. The first part of the thesis focuses on the optimization of preanalytical steps of existing method. The second part focuses on stability analysis of glycosylation of IgG. Glycosylation of Fc fragment of IgG is analysed in 8 subjects at three time points. The results obtained by this method (LC-ESI-MS) indicate that there are changes in the glycosylation of IgG. Changes are observed in the IgG4 in two glycoforms; G0FN and G1FN in the same subject.

(42 pages, 19 figures, 38 references, original in Croatian)

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

Ključne riječi: IgG, liquid chromatography, mass spectrometry, TOF, *N*-glycosylation, optimization.

Mentor: Gordan Lauc, Ph.D, Professor
Supervisor: Jerko Štambuk, MSc
Instructor: Jasmina Rokov Plavec, Ph.D., Assistant Professor

Thesis accepted: 16th February 2017.

Reviewers: Jasmina Rokov Plavec, Ph.D., Assistant Professor
Sanda Rončević, Ph.D., Associate Professor
Biserka Prugovečki, Ph.D., Associate Professor
Replacement: Marko Močibob, Ph.D., Assistant Professor

POPIS KRATICA

IG – imunoglobulini

IgG – imunoglobulini G

Fab – antigen vezujući fragment (engl. *Fragment Antigen Binding*)

Fc – fragment koji kristalizira (engl. *Fragment Crystallizable*)

LC-MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)

Q - kvadrupol (engl. *Quadrupole*)

ESI – elektrosprej raspršenje (engl. ***E****lectro****s****pray* ***I****onization*)

TOF – analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of Flight*)

GPI – glikozilfosfatidilinozitol - sidra (engl. *Glycosylphosphatidylinositol*, GPI *anchor*)

Dol – dolikol

Dol-P – dolikol-fosfat

ER – endoplazmatski retikulum

GlcNAc-1-P – N-acetilglukozamin-fosfat

UDP-GlcNAc – uridin-5'-difosfat-N-acetilglukozamin

UMP– uridin-5'-monofosfat

GlcNAc-P-P-Dol – dolikol-pirofosfat-N-acetilglukozamin

Man – manoza

Glc – glukoza

GDP-Man – gvanozin-5'-difosfat-manoza

CDG – urođeni poremećaj u glikozilaciji (engl. *Congenital Disorder of Glycosylation*)

OT – oligosaharil-transferaza

GK – Golgijev kompleks

TGN – *trans*-Golgijeva mreža (engl. *trans*-Golgi *Network*)

C_L – laki konstantni lanac (engl. *Constant Light Chain*)

C_H – teški konstantni lanac (engl. *Constant Heavy Chain*)

V_L – laki varijabilni lanac (engl. *Variable Light Chain*)

V_H – teški varijabilni lanac (engl. *Variable Heavy Chain*)

ADCC – stanična toksičnost ovisna o protutijelima (engl. *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*)

CDC – stanična citotoksičnost ovisna o komplementu (engl. *Complement-Dependent Cytotoxicity*)

ITAM – aktivacijski motiv temeljen na tirozinu (engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)

MALDI – matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskog zračenja (engl. *Matrix assisted Ionization/Desorpiton*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liqud Chromatography*).

rpHPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation)*

§ 1. UVOD

Adaptivni imunološki sustav proizvodi imunoglobuline (IG) u svrhu identifikacije i utišavanja, odnosno neutralizacije stranog antigena i/ili patogena kojem je domaćin izložen. Kod ljudi je pronađeno pet različitih vrsta imunoglobulina, te su klasificirani kao IgG, IgM, IgD, IgE, IgA. Isti su pronađeni u različitim varijacijama i količini za vrijeme imunološkog odgovora.[3-5]

Glavni fokus i diskurs unutar imunoloških istraživanja i istraživanja glikozilacije imunoglobulina je imunoglobulin G. U ljudskoj krvi najzastupljeniji među imunoglobulinima je IgG u količini od 10 do 15 mg mL^{-1}. Poznata su četiri različita podrazreda imunoglobulina G koje se kategoriziraju kao IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Izlučuju ih krvne stanice; B-limfociti. Strukturno, IgG se sastoji od dva laka i dva teška lanca koji zajedno daju dva antigen vezujuća fragmenta (engl. *Fragment antigen binding,* Fab) i jedan fragment koji kristalizira (engl. *Fragment crystallizable,* Fc). Kod imunoglobulina G pronađeni su *N*-glikani na domeni C_H2 te na domeni V_L. *N*-glikanske forme koje nastaju na ovim mjestima uvelike utječu na konformaciju samog proteina.[3-5]

Konvencionalni pristup analize glikozilacije regije Fc se temelji na određivanju i kvantifikaciji Fc-glikopeptida tretiranih tripsinom koristeći tehnike tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography coupled with mass spectrometry*, LC-MS). Tekućinska kromatografija razdvaja glikopeptide regije Fc glikoproteina na temelju razlika u aminokiselinskom slijedu, dok spektrometrija masa daje uvid u glikopeptide koji su zastupljeni u analiziranom uzorku. Najčešće korišteni analizatori u spektrometru masa kod MS tehnika za detekciju glikopeptida su kvadrupol (engl. *Quadrupole*, Q), te analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of Flight,* TOF). Kao izvor iona najčešće se koristi sustav ESI (engl. *Electrospray Ionization*).[3-5]

1.1. Cilj i svrha rada

Istraživački je dio diplomskog rada prvenstveno usmjeren optimizaciji visokoprotočne metode za analizu *N*-glikozilacije regije Fc imunoglobulina G (IgG), a drugi dio rada je usmjeren prema analizi *N*-glikozilacijskih profila regije Fc imunoglobulina G izoliranih iz krvne plazme ljudskih uzoraka.

Cilj rada je optimizacija pripreme uzorka za određivanje *N*-glikozilacije imunoglobulina G iz ljudske plazme tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Strukturnim analizama glikoformi dobiva se uvid u glikozilaciju na temelju čega se može stvoriti *N*-glikanski profil. Usporedbom profila na većoj populaciji mogu se uočiti razlike u *N*-glikozilaciji. Ukoliko su te razlike statistički značajne mogu se donijeti zaključci o tome kako promatrani faktor od interesa utječe na glikozilaciju IgG-a. Stvaranje, analiza te usporedba *N*-glikanskih profila svakog podrazreda imunoglobulina G je izuzetno važna za daljnja imunološka i biološka istraživanja raznih poremećaja i bolesti u koje je uključen imunološki odgovor.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Glikozilacija proteina

Glikozilacija proteina jedna je od posttranslacijskih modifikacija kod koje se na okosnicu proteina kovalentno vežu molekule jednostavnih šećera. Sam proces glikozilacije nije diktiran, već je posljedica djelovanja raznih enzima i metabolita koji sudjeluju u tim procesima. Zastupljenost i aktivnost enzima glikozil-transferaza, glikozidaza i drugih šećernih prekursora uvjetuje glikozilaciju proteina. Samim time što redoslijed šećera tj. glikana nije diktiran genetičkim kodom, kao što je to pri sintezi proteina, rezultira izuzetno velikom varijabilnosti glikoproteina. Šećerne komponente kod glikoproteina ne samo da pridonose i uvjetuju pravilno smatanje glikoproteina, već uvelike utječu na njegovu fiziološku ulogu. Glikoproteini sudjeluju u fiziološkim procesima, u imunološkim procesima, procesima prijenosa signala, a također su strukturni elementi stanica. [1]

2.1.1. Funkcija i značajnost glikozilacije

Glikani, odnosno šećerne komponente koje se u glikoproteinu nalaze kao vezane glikoforme imaju veliku važnost u strukturi, a time i funkciji ovih molekula. Šećerne komponente glikoproteina utječu na pravilno smatanje proteina tj. na pravilnu nativnu konformaciju proteina. Glikani koji nastaju u sekrecijskom putu sudjeluju u brojnim regulatornim mehanizmima stanice. Utjecaj glikana na protein-protein interakcije je izrazito značajan, od pravilnog smatanja (nativna konformacija) proteina, unutarstanične regulacije do izvanstaničnih funkcija kao što su aktivacija receptora, endocitoza, komunikacija na razini stanica-stanica (adhezija), prijenos signala te brojne druge. Glikani se vežu za lektine i sterički moduliraju molekularne interakcije te na taj način reguliraju stanične mehanizme. Kod sisavaca glikani sudjeluju u velikom broju funkcijskih i regulacijskih staničnih mehanizama koji pridonose zdravlju ili bolesti. Postoji nekoliko oblika (vrsta) glikozilacije proteina, s obzirom na biokemiju ove kotranslacijske i posttranslacijske modifikacije.[1,7]

2.1.2. Vrsta glikozilacije

Strukturu glikana glikoproteina prvenstveno definira način vezanja šećera na protein. Postoji nekoliko različitih načina vezanja glikana na protein, a rezultat toga su različite vrste glikozilacije, time ujedno i različiti glikoproteini.

i. *N*-glikozilacija – glikani su vezani na okosnicu proteina preko dušikovog atoma bočnog ogranka asparagina, u aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr (konsenzus sekvenca) (X je bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro)). U nekim slučajevima glikani se vežu na asparagin u nekanonskom slijedu aminokiselina, Asn-X-Cys[3,4]. Prepoznaje se prema motivu glikana vezanih na asparagin: Man-*β4*-GlcNAc-*β4*-GlcNAc-*β1*-**N-Asn**.[26, 28]

ii. *O*-glikozilacija – glikani su vezani na okosnicu proteina preko kisikovog atoma molekule serina (Ser) i/ili treonina (Thr). Konkretni aminokiselinski sljedovi, na koje se ovi šećeri kemijski vežu nisu otkriveni. Prepoznaje se prema motivu glikana vezanih na Ser ili Thr: GalNAc-*α1*-**O-Ser/Thr**[26]

iii. *C*-glikozilacija – jedna manoza je vezana C-C α-„glikozidnom“ vezom na ugljikov atom prvog Trp u aminokiselinskom slijedu W-X-X-W (gdje je X bilo koja aminokiselina). Iako baze podataka pokazuju da oko 300-tinjak proteina u stanicama sisavaca ima ovu modifikaciju, njezina biosinteza i funkcija do danas nisu razjašnjeni.[8]

iv. *P*-glikozilacija ili fosfoglikozilacija – glikani su vezani na molekulu fosfoserina, fosfodiesterskom vezom. Ovaj oblik glikozilacije viđen je kod cisteinskih proteaza, u *D. discoideum*, poznatih kao cprD i cprE. Prepoznaje se prema „vezi“ GlcNAc-1-PO_4-Ser.[28]

v. Proteoglikani – proteini koji u strukturi sadrže jedan ili više kovalentno vezanih glikozaminoglikanskih lanaca.[26]

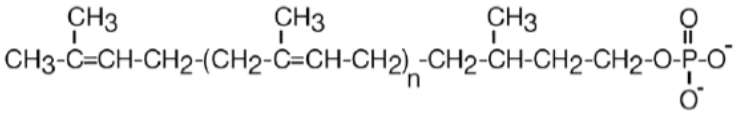
vi. Glikozilfosfatidilinozitol-sidra (engl. *Glycosylphosphatidylinositol*, GPI *anchor*) – membranski proteini, odnosno „sidra“ koji se sastoje od „glikanskog mosta“ između fosfatidilinozitola i etanolamina, koji je vezan amidnom vezom za C-kraj proteina.[26]

2.2. *N*-glikozilacija

N-glikozilacija proteina je vrsta glikozilacije kod koje su oligosaharidne jedinice, odnosno glikani vezani preko atoma dušika (N) bočnog ogranka asparagina unutar aminokiselinskog slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr (konsenzus sekvenca).[28] Jedna od najznačajnijih molekula u ovom biosintetskom putu je dolikol (Dol), poliizoprenoidni lipid. Sastoji se od 14 do 21 linearno povezane izoprenske jedinice, a krajnji dio molekule dolikola sadrži hidroksilnu skupinu.[2-4]

2.2.1. Biosinteza i struktura N-vezanih glikana

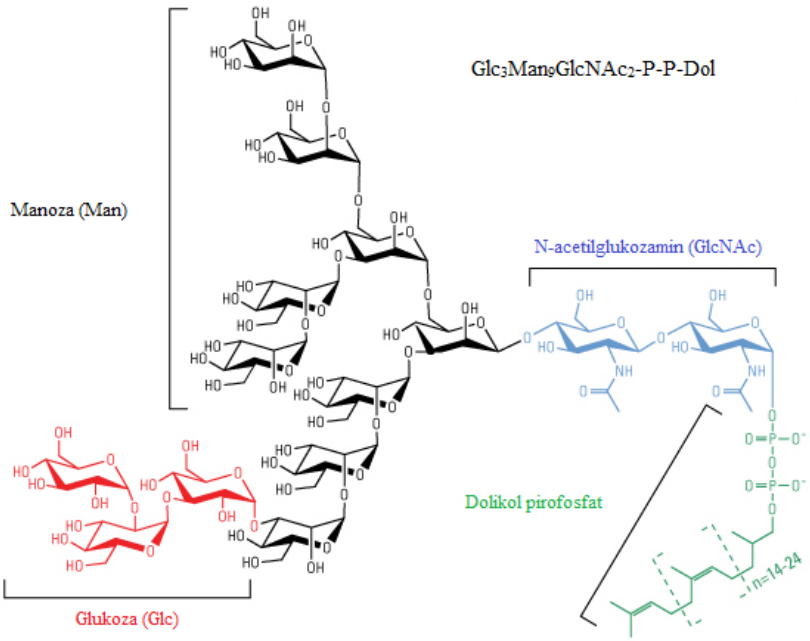
N-glikozilacija započinje s poliizoprenoil lipidnim prekursorom tj. dolikol-fosfatom (Dol-P) (Slika 1.). Adiciju prvih sedam šećera ovoga biosintetskoga puta kataliziraju enzimi i supstrati koji se nalaze na citoplazmatskom dijelu endoplazmatskog retikuluma (ER). Na samom početku ovoga puta N-acetilglukozamin fosfat (GlcNAc-1-P) se prenosi na prekursor Dol-P s uridin-5'-difosfat-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) uz otpuštanje uridin-5'-monofosfata (UMP). Enzim koji katalizira ovu reakciju je GlcNAc-1-fosfo-transferaza. Produkt koji nastaje ovom reakcijom je dolikol pirofosfat-N-acetilglukozamin (GlcNAc-P-P-Dol) i isti se dodatno modificira s još jednom molekulom GlcNAc te s pet molekula manoze (Man) iz gvanozin-5'-difosfat-manoze (GDP-Man). Sve ove prethodne reakcije adiranja glikana na Dol-P, rezultiraju produktom $Man_5GlcNAc_2$-P-P-Dol. Tako formiran kompleks se prebacuje na lumenalnu stranu ER-a, uz pomoć flipaze. Daljnji dovršetak ove uzastopne ekstenzije Dol-P-a se nastavlja na lumenalnoj strani ER-a sve do konačnog glikolipidnog kompleksa $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol. (Slika 2.)[2, 7]



Slika 1. Struktura dolikol-fosfata (Dol-P)[8]

Na citoplazmatskoj strani ER-a molekula Dol-P se modificira manozom iz GDP-manoze ili glukozom iz uridin-5'-difosfat-glukoze (UDP-Glc). Dobiveni dolikol-fosfat-manoza (MPD) i dolikol-fosfat-glukoza (GPD) kompleksi se prebacuju uz pomoć flipaza na lumenalnu stranu ER-a gdje služe kao supstrati enzimima za dodavanje preostalih sedam glikana sve do molekule $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol.[2, 7]

Specifični poredak glikana u strukturi $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol, uključujući način vezanja i steričnost konformacije glikana jest izrazito sačuvan kod većine eukariota i smatra se da su ove karakteristike odlučujuće za samu funkciju glikana, odnosno glikoproteina. Postoje izuzetci kod praživotinja i nekih gljiva zbog sinteze kraćeg motiva glikana vezanih na Dol-P.[1,2]



Slika 2. Struktura kompleksa $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol.[11]

Nedostatak, genetički uvjetovan, u sintezi Dol-P-P vezanih glikana odgovoran je za urođeni poremećaj u glikozilaciji tipa I (engl. *Congenital Disorder of Glycosylation*, CDG). Tip I utječe na sintezu specifičnih glikan-ovisnih transferaza kao i na enzime i faktore koji su uključeni u sintezu njihovih supstrata. CDG tip II utječe na reorganizaciju glikana jednom kada su preneseni na novo sintetizirani protein, vjerojatno zbog poremećaja u procesiranju specifičnih glikozidaza i glikozil-transferaza te nukleotid-šećernih transportera (GDP-Man, UDP-Glc).[2]

2.2.2. Prijenos glikana na okosnicu polipeptida

Glikani kompleksa $Glc_3Man_9GlcNac_2$-P-P-Dol se prenose na novo sintetizirani polipeptidni lanac, a ove reakcije prijenosa se događaju u lumenalnom prostoru ER-a. Ovu reakciju katalizira enzim oligosaharil-transferaza (OT). OT prenosi oligosaharidne jedinice tj. glikane samo na one sterički dostupne asparagine, zadovoljavajući konsenzus sekvencu Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr (gdje je X bilo koja aminokiselina osim Pro). Taj prijenos se uobičajeno zbiva kao kotranslacijski događaj tj. kada polipeptidni lanac, prije nego je njegova sinteza na ribosomu završena, dođe u lumen ER-a.[2, 7]

Posttranslacijski, na moguća akceptorska mjesta proteina, *N*-glikozilacija se također događa, ali u manjoj mjeri. Smatra se da dvije odvojene forme OT-a mogu katalizirati ova dva odvojena događaja. Pretpostavlja se, da se Dol-P-P molekule defosforiliraju i prebacuju natrag na citoplazmatsku stranu ER-a, kako bi se ponovno mogli sintetizirati prekursori $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol, MPD i GPD.[2,7]

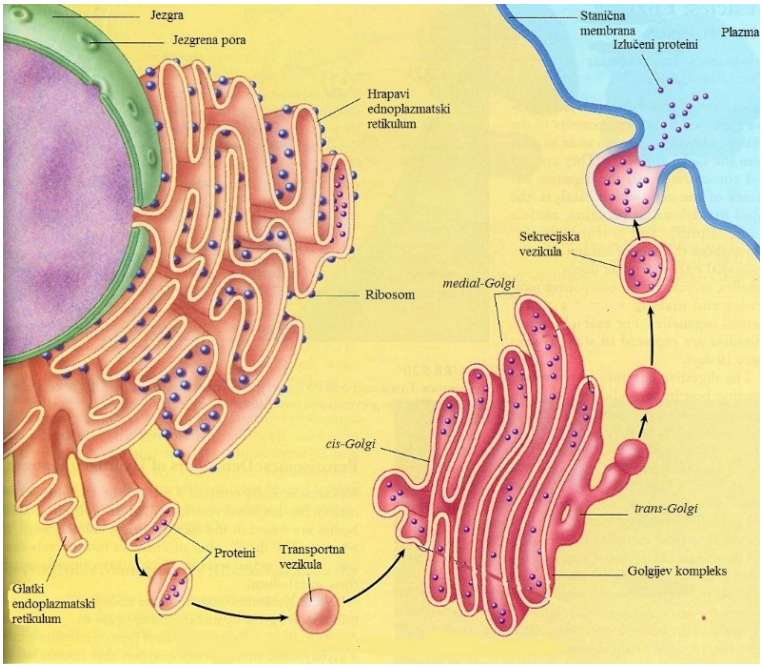
2.2.3. Razgradnja glikozidazama u lumenu ER-a

Nakon prijenosa glikana na protein, započinje razgradnja *N*-vezanih glikana $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Ove procese kataliziraju ER glikozidaze. Sekvencijalno, terminalna glukoza uklanja se ER-glukozidazom I, dok se ostale dvije glukoze uklanjaju ER-glukozidazom II. Jedna manoza uklanja se ER-manozidazom I. Rezultat uzastopnog djelovanja ovih enzima je $Man_8GlcNAc_2$ glikan.[2, 7, 12]

Intermedijeri $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, $Man_9GlcNAc_2$, $Man_8GlcNAc_2$ su ključni za procesiranje i smatanje glikoproteina. Stanična regulacija svih ovih prethodnih koraka razgradnje je na razini aktivacije i inhibicije glikozidaza uključenih u iste. Svi *N*-vezani oligosaharidni intermedijeri unutar ER-a su oligomanozni. Glikoproteini se prenose dalje u Golgijev kompleks (GK) i obično imaju glikane s po osam manoza te nemaju glukozu. Ukoliko su glikoproteini preneseni u GK prije nego što glikozidaze djeluju, unutar GK postoje GK-endomanozidaze. Ti enzimi hidroliziraju glikozidnu vezu tako da uklanjaju bilo koju oligosaharidnu jedinicu zajedno s jednom manozom, npr. Glu-Man.[2, 7, 12]

2.2.4. Preslagivanje glikana GK glikozidazama i glikotransferazama

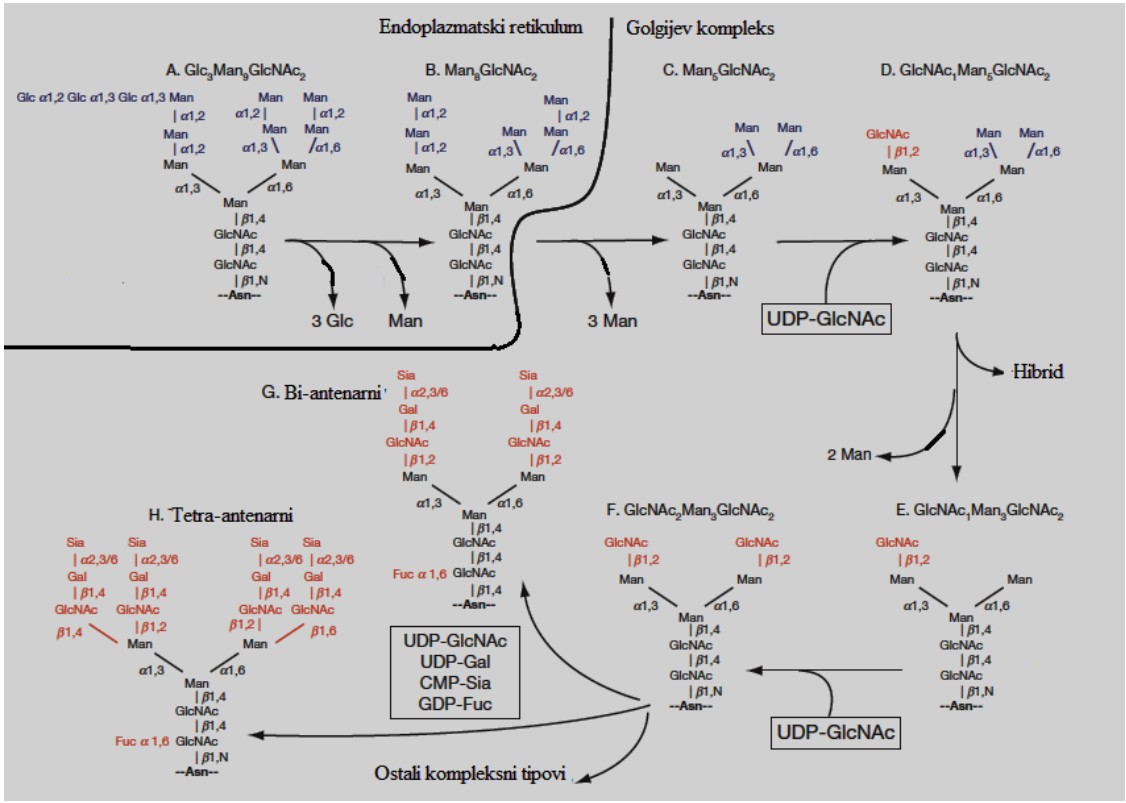
Većina koraka, *N*-glikozilacijskog biosintetskoga puta, do sada objašnjenih su manje-više slični za sve eukariote. Nadalje, ovo poglavlje više je usmjereno glikozilaciji kod sisavaca. GK kod sisavaca s obzirom na strukturu i funkciju se može podijeliti na tri komponente: *cis*-Golgi, medijalni Golgi i *trans*-Golgi (Slika 3.) koji je povezan s *trans*-Golgijevom mrežom (engl. *trans-Golgi Network*, TGN). Unutar GK-a *N*-glikani vezani na protein se slažu s velikom varijabilnošću. Varijacije glikana pojavljuju se između različitih vrsta, različitih organskih sustava pojedine vrste, različitih tipova stanica istoga sustava organa, različitih glikoproteina određenog tipa stanice pa čak i među različitim subpopulacijama (glikoforme) određenog glikoproteina.[2]



Slika 3. Prikaz sekrecije proteina i staničnih komponenti: ER i GK[35]

Tipičan glikan na glikoproteinu koji napušta ER većinom je oblika $Man_8GlcNAc_2$. GK-manozidaza I koja se nalazi u *cis*-Golgiju hidrolizira glikane do $Man_5GlcNAc_2$ glikana (drugačiji izomer nego $Man_5GlcNAc_2$ glikan formiran kao Dol-P-P inermedijer). Dolaskom u medijalni Golgi $Man_5GlcNAc_2$ (Slika 4; struktura C) je modificiran prisutnim glikotransferazama, GlcNAc-transferazom I. GlcNAc-transferaza I za donor glikana koristi šećer iz molekule nukleotid-šećera. GlcNAc-transferaza I prenosi GlcNAc sa UDP-GlcNAc, stvarajući β-1,2-glikozidnu vezu sa manozom, što rezultira $GlcNAc_1Man_5GlcNAc_2$ (Slika 4; struktura D). Kako GlcNAc-transferaza koja se nalazi u medijalnom dijelu GK ne može prepoznati $Man_8GlcNAc_2$ od esencijalne je važnosti prethodna reakcija GK-manozidaze I. Nakon što je GlcNAc prenesen, glikan $GlcNAc_1Man_5GlcNAc_2$ razgrađuje GK manozidaza II koja se također nalazi u medijalnom dijelu GK i daje $GlcNAc_1Man_3GlcNAc_2$ (Slika 4; struktura E) glikan. S obzirom da GK-manozidaza II ne prepoznaje glikan $Man_5GlcNAc_2$ izrazito je važan ovaj prethodni korak koji katalizira GlcNAc-transferaza. Kako su sve ove reakcije u sinergiji prisutnost i pristupačnost svih ovih enzima izuzetno je važna za pravilan razmještaj i aranžman *N*-vezanih glikana na glikoprotein. [2, 7, 12]

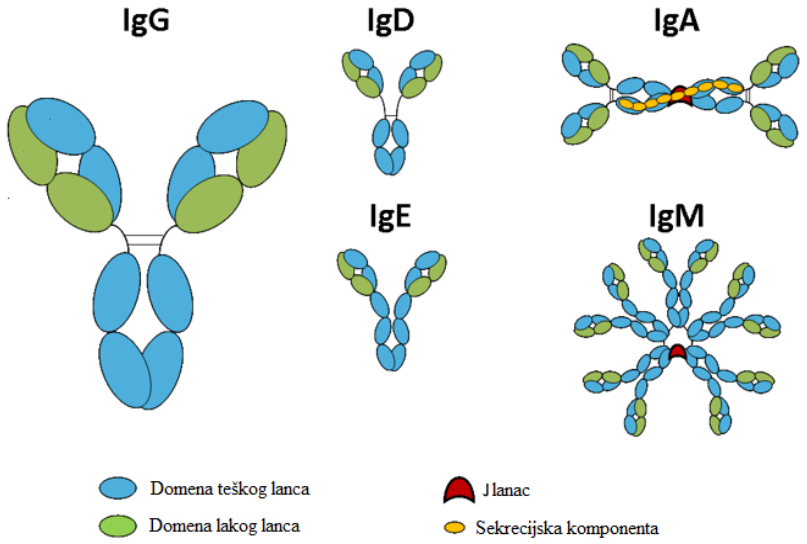
Međutim nisu svi glikoproteini tretirani GK manozidazama, iako prođu sekrecijski put bez dodatnog procesiranja. To može biti zbog različitog sterizma glikana i sukladno tome nemogućnosti djelovanja GK-manozidaza. Razgradnjom $GlcNAc_1Man_3GlcNAc_2$ s GK-manozidazom II dobiva se ključna manoza koja se nadalje nadograđuje GlcNAc komponentom, a tu reakciju katalizira GlcNAc-transferaza II. Prethodna reakcija daje $GlcNAc_2Man3GlcNAc_2$ (Slika 4; struktura F) glikan. Nadalje se šećeri mogu vezati na postojeći glikan preko N-acetilglukozamina, dajući time kompleksne glikanske strukture. Slika 4 pobliže prikazuje djelovanje glikotransferaza i glikozidaza u GK. [2, 7, 12]



Slika 4. Strukture i način vezanja glikana te njihovo procesiranje u Golgijevom kompleksu.[2]

2.3. Imunoglobulini

Plazma stanice nastale diferencijacijom limfocita B luče protutijela, odnosno imunoglobuline (IG) neovisno o prisustvu antigena. Protutijela imaju prirodnu tendenciju vezanja na strane tvari ili organizme koji ugrožavaju domaćina. Vežući se za antigen, IG tvori imunokompleks i na taj način inaktivira antigen. Način inaktivacije ovisi o prirodi protutijela i antigena te o prirodi i načinu interakcije. Imunoglobulini ne mogu izravno uništiti antigen, već posredno inaktiviraju antigen bilo taloženjem, aglutinacijom ili neutralizacijom toksina ukoliko se radi o bakterijama i/ili virusima. U imunološkom sustavu organizma, djeluju neizravno na antigen tj. služe kao biljeg drugim obrambenim mehanizmima koji mogu uništiti antigen. Poznato je pet različitih vrsta imunoglobulina koji se sustavno kategoriziraju kao IgA, IgM, IgD, IgG, IgE (Slika 5). Molekularna masa većine protutijela se je oko 150000 Da. Strukturno, IG se sastoji od dva laka lanca (engl. *Constant light chain*; C_L) i dva teška lanca (engl. *Constant heavy chain*; C_H). Laki i teški lanci se razlikuju prema duljini aminokiselinskog slijeda; laki lanci sadrže oko 220 aminokiselina, dok teški lanci sadrže oko 440 aminokiselina. Lanci su međusobno (dva laka i dva teška lanca) povezani disulfidnim vezama. Iako sva protutijela, odnosno imuoglobulini imaju sličnu tercijarnu strukturu, njihova heterogenost je izuzetno velika. Variranjem primarnog slijeda aminokiselina dobija se veliki broj različitih varijanti, a time i različita specifičnost i učinkovitost protutijela.[14, 16]



Slika 5. Shematski prikaz pet razreda imunoglobulina[13]

2.3.1. Topologija protutijela

Topologija molekule imunoglobulina je dobivena elektronskom mikroskopijom, dok je savijenost lanaca određena rendgenskom kristalografijom. Molekulu se makroskopski može prikazati kao slovo Y. Gornja dva kraka slova Y pripisuju se Fab ulomcima dok se donji krak pripisuje Fc fragmentu. Fab ulomci su savitljivi u području zgloba (engl. *Hinge region*), što omogućuje otkrivanje sterički skrivenih dijelova Fc ulomka.[14]

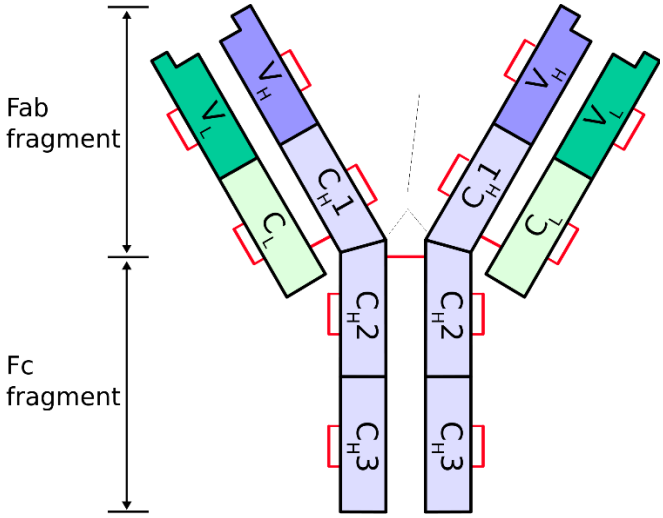
Kod imunoglobulina polipeptidni lanci nisu ravni, već su savijeni, tvoreći kuglaste strukture tj. domene. Laki lanac se sastoji od varijabilne domene (V_L) i konstantne (C_L) domene, dok se teški lanac sastoji od jedne varijabilne domene (V_H) i tri, odnosno četiri konstantne domene (C_H) ovisno o razredu IG-a. Na N-kraju okosnice polipeptidnog lanca tj. Fab ulomku se nalaze V_H i V_L domene.[14]

2.3.2. Struktura protutijela

Strukturno protutijela se sastoje od lakih i teških lanaca (Slika 6). Laki lanac sadrži oko 220 aminokiselina u svom slijedu. Oko 110 aminokiselina od N-kraja čini polovinu lakog lanca, odnosno V_L regiju. Ovaj poredak je različit za svaki promatrani lanac. V_L i V_H zajedno tvore paratop (vezno mjesto za antigen). O obzirom na ostali dio lakog lanca od 110 aminokiselina u slijedu, laki lanci se mogu svrstati u dvije kategorije, odnosno vrste: κ i λ. Taj dio lanca predstavlja konstantnu regiju lakog lanca te posjeduje gotovo stalan slijed aminokiselina za vrstu od interesa. Unutar svih razreda i podrazreda IG-a oba lanca su zastupljena, ali na način da su u istoj molekuli oba lanca jednaka ili κ ili λ.[14, 17]

Frakcije teških lanaca su: λ, γ, δ, ε i μ, međusobno su različiti, a istovremeno posjeduju pravilnost koja se proteže među istima. Također kao i kod lakog lanca, oko 110 aminokiselina od N-kraja je dosta varijabilno te taj dio predstavlja V_H regiju. Ova regija zajedno s V_H regijom tvori specifično mjesto za vezanje antigena, odnosno Fab ulomak. Ostali dio aminokiselinskog slijeda posjeduje manje varijacije i karakterizira ga relativna konstantnost, taj dio predstavlja C_H regiju. Temeljem slijeda aminokiselina u C_H regiji imunoglobuline možemo podijeliti u pet razreda. To su IgA, IgM, IgG, IgD, IgE, no članovi jednog razreda nisu identični.

Npr. kod ljudi, četiri glavna slijeda aminokiselina (oko 330) C_H regije IgG-a su slični, no prema razlikama unutar ta četiri glavna slijeda IgG se dijeli u podrazrede. To su: γ1, γ2, γ3, γ4.[14, 17]



Slika 6. Prikaz varijabilnih (V) i konstantnih dijelova (C) lakog (H) i teškog lanca (H).[15]

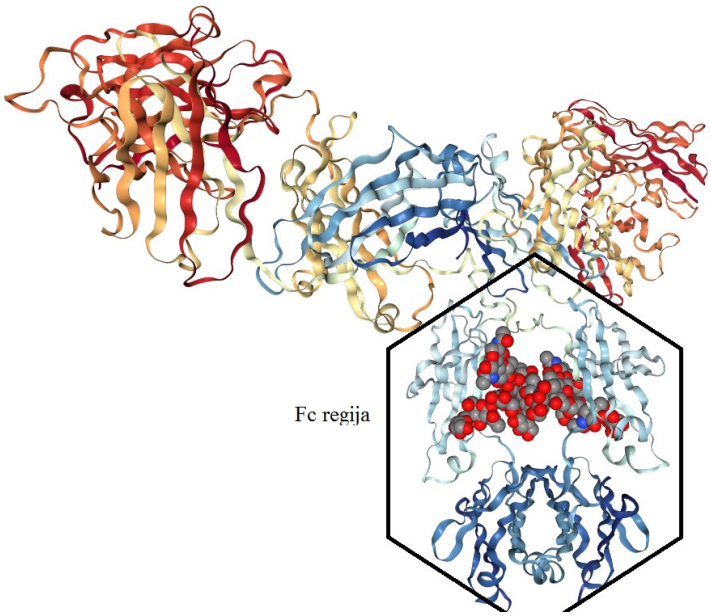
2.4. Imunoglobulin G

Kod IgG-a glikozilacije, odnosno modifikacija proteina je posttranslacijski događaj. Dio molekule IgG-a na kojem su prisutni *N*-vezani glikani je regija Fc. Prostorna interakcija glikana s površinom proteina ograničavajući je faktor kod glikozilacije regije Fc. Glikoforme koje nastaju posjeduju široki spektar efektorskih funkcija. IgG (Slika 7) je najzastupljeniji izotip IG-a u ljudskom serumu, koncentracije oko 12 mg ml^{-1}. [5, 16]

2.4.1. Struktura i funkcija regije Fc ljudskog imunoglobulina G

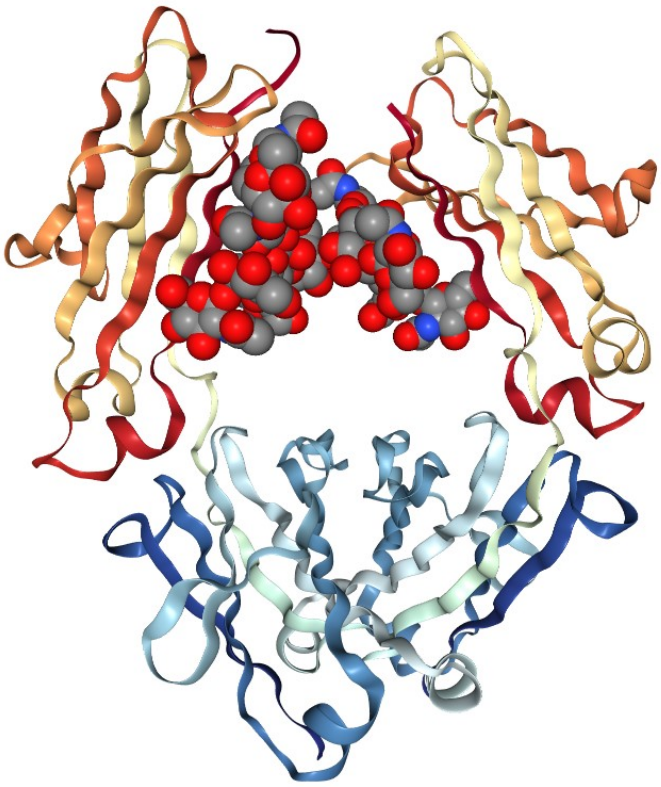
Struktura regije Fc (Slika 8) ljudskog IgG-a nalikuje na potkovu i posjeduje niz efektorskih funkcija, kao što je stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), fagocitoza, stanična citotoksičnost ovisna o komplementu (engl. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC), recikliranje IgG-a i protuupalna aktivnost. Cγ2 i Cγ3 domene svakog teškog lanca stvaraju interlančane disulfidne veze između dvije Cγ2. *N*-

vezani glikani su na protein vezani preko Asn_{297} na Cγ2 domenu, što utječe na otvaranje strukture, a time i na afinitet regije Fc prema specifičnim receptorima (FcγR) i prema komplementu (C1q).[16]



Slika 7. Kristalna struktura čitavog IgG-a, protutijelo b12, označeni dio predstavlja regiju Fc (PDB: 1HZH)[17]

Kao što je već u radu objašnjeno, IgG se može podijeliti u četiri podrazreda, poznata kao γ1, γ2, γ3, γ4 tj. IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4. Svaki podrazred posjeduje različitu specifičnost prema različitim grupama antigena. Npr. IgG_2 se inducira kod ugljikohidratnih antigena, dok se IgG_4 obično inducira kod produžene izloženosti proteinskom antigenu. Područje zgloba (engl. *Hinge region*) posjeduje različitu fleksibilnost, a ista ovisi o duljini i vrsti aminokiselinskog slijeda tog područja protutijela. Relativna fleksibilnost među podrazredima se ponaša na sljedeći način: $IgG_1 = IgG_2 > IgG_3 > IgG_4$.[16]



Slika 8. Kristalna struktura regije Fc ljudskog IgG_1 (PDB: 3AVE) [18]

Regija Fc IgG-a posjeduje efektorsku ulogu protutijela, vezujući se za različite Fc receptore na površini stanice. To su FcγR, C1q i FcRn (engl. *neonatal Fc receptor*). FcγR su jednopropusni transmembranski proteini tipa I. Do sada je poznato šest takvih proteina, a to su FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa i FcγRIIIb.[19] Klasificiraju se kao aktivacijski ili inhibicijski receptori ovisno o tome sadrže li njihove unutarstanične signalne komponente imunoreceptor koji ima aktivacijski motiv zasnovan na tirozinu (engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*, ITAM) ili imunoreceptor koji ima inhibicijski motiv zasnovan na tirozinu (engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*, ITIM). FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa sadrže ITAM i pripadaju skupini FcγR-ITAM, FcγRIIb posjeduje ITIM i pripada skupini FcγR-ITIM, dok je FcγRIIIb GPI-usidreni receptor i posjeduju ga neutrofili. Vrsta eksprimiranog Fcγ receptora na membrani stanice ovisi prvenstveno o tipu stanice i funkciji iste u imunološkom sustavu. Izvanstanične regije FcγR posjeduju sačuvane (konzervirane) strukture. Strukturnim analizama FcγR-a utvrđeno je da svi receptori imaju IG-slične (engl. Ig-like structures) domene koje se nazivaju D_1 i D_2 regijama.[16, 19, 20]

2.4.2. N-glikozilacija regije Fc ljudskog imunoglobulina G

Svi ljudski IgG-ovi su *N*-glikozilirani, ali u različitoj mjeri. Otprilike 2% do 3% molekularne mase IgG-a pripada šećernoj komponenti glikoproteina što je doista mali udio obzirom na ostale razrede IG-a, kod koji se ovaj udio kreće od 12% do 13% za IgM, IgD i IgE. Regija Fc IgG-a posjeduje očuvano *N*-glikozilacijsko mjesto, Asn_{297} obzirom na cijeli podrazred. Oko 20% ukupnog ljudskog IgG-a je glikozilirano na regiji Fab (izrazito mutabilna regija protutijela, nasumična pojava Asn u konsenzus sekvenci za koju je moguća *N*-glikozilacija) što je posljedica somatskih mutacija. Većina *N*-glikozilacije regije Fab se zbiva na izloženim regijama (petljama) i znatno utječe na vezanje antigena i protutijela.[16, 22, 23]

Ukupni ljudski IgG prisutan u serumu uglavnom sadrži biantenarne kompleksne tipove glikana. Udio neutralnih glikoformi je oko 86% obzirom na ukupne glikoforme, dok preostali dio oko 20% predstavlja glikoforme koje su sijalinizirane. Štoviše, oko 30% glikana IgG-a posjeduje razgranatu strukturu s ostatkom GlcNAc, koji je vezan za Man β-1,6-glikozidnom vezom. Između 80% i 92% glikana posjeduje sržnu fukozu u strukturi, koja je vezana α-1,6-glikozidnom vezom za N-vezani sržni GlcNAc-a koji je pak vezan za Asn_{297}. Glikani u regiji Fab i regiji Fc se razlikuju po količini terminalne sijalinizacije na reducirajućim krajevima. Regija Fab može sadržavati glikan izuzetno bogat sijalinskom kiselinom (oko 80% s obzirom na glikan). [16, 21, 23]

2.5. Viskoprotočne metode analize *N*-glikozilacije imunoglobulina G

Glikani imaju veliki potencijal kao dijagnostički markeri (biomarkeri)[24], sukladno tomu potrebne su robusnije tehnike analize istih. Nerijetko se koriste razne izvedbe spektrometrije masa u sprezi s komatografskim tehnikama[25]. Dva najčešća načina ionizacije, izvor iona, kod analize biomakromolekula MS tehnikom su ESI i matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskog zračenja (engl. *Matrix Assisted Ionization/Desorpiton,* MALDI). Kao analizatori se koristi Q i TOF. Od kromatografskih tehnika najčešće se koriste izvedbe LC-a; tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ili tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (Ultra High Performance Liqud Chromatograpy, UPHLC).

2.5.1. Tekućinska kromatografija: rpHPLC i rpUHPLC

Tehnika rpHPLC je razdjelna tekućinska kromatografija obrnutih faza visoke djelotvornosti kod koje se analit, pri radnim uvjetima kromatografa, mora nalaziti u tekućem stanju. Odvajanje sastojaka smjese se temelji na afinitetu sastojaka smjese prema pokretnoj (mobilnoj) i/ili nepokretnoj (stacionarnoj) fazi. Analiza, odnosno odvajanje sastojaka smjese se zbiva unutar analitičke kolone.

Nepokretne faze mogu biti imobilizirane tekućine (voda, trietilen glikol) ili kemijski vezane faze. Imobilizirane tekućine su polarne tekućine vezane fizički na kruti nosač tj. unutrašnje oplošje kolone (fizisorpcija). Ovakav tip imobilizacije nepokretne faze na nosač se koristi kod LC-a normalnih faza. Nasuprot tome kemijski vezane faze se izrađuju tako da je na kruti nosač nanesen silikagel (veličine čestica 3 µm, 5 µm, 10 µm). Na silikagel se kemijski vezuju alkilne skupine (najčešće C-18 ili C-8), na način da dostupne silanolne skupine reagiraju sa alkilklorsilanima pri čemu nastaju siloksani (Si-O-Si) kao kemijski vezane faze. Preostale silanolne skupine koje nisu reagirale mogu utjecati na razdvajanje analita, što se očituje kao razvlačenje pika. Da bismo to izbjegli, te iste silanolne skupine se deaktiviraju trimetil-klorsilanom. Ovakav tip vezanja nepokretne faze koristi se kod LC-a obrnutih faza, štoviše kemijski vezane faze mogu se koristiti i kod LC-a normalnih faza.[29]

UHPLC je izvedena kromatografska tehnika HPLC-a. Razlika HPLC-a i UHPLC-a je u veličini punila (promjer čestice manji od 2 µm ko UPLC-a, do 5 µm kod HPLC-a) (Slika 9.), što dopušta bolje razdvajanje sastojaka analizirane smjese te skraćuje vrijeme analize. Također radni tlakovi kod HPLC-a se kreću do 40 MPa, dok kod UHPLC tlakovi mogu biti i do 100 MPa. Nadasve, smanjenje promjera punila i povećanje tlakova ovu kromatgrafsku tehniku čine izuzetno brzom i efikasnom.

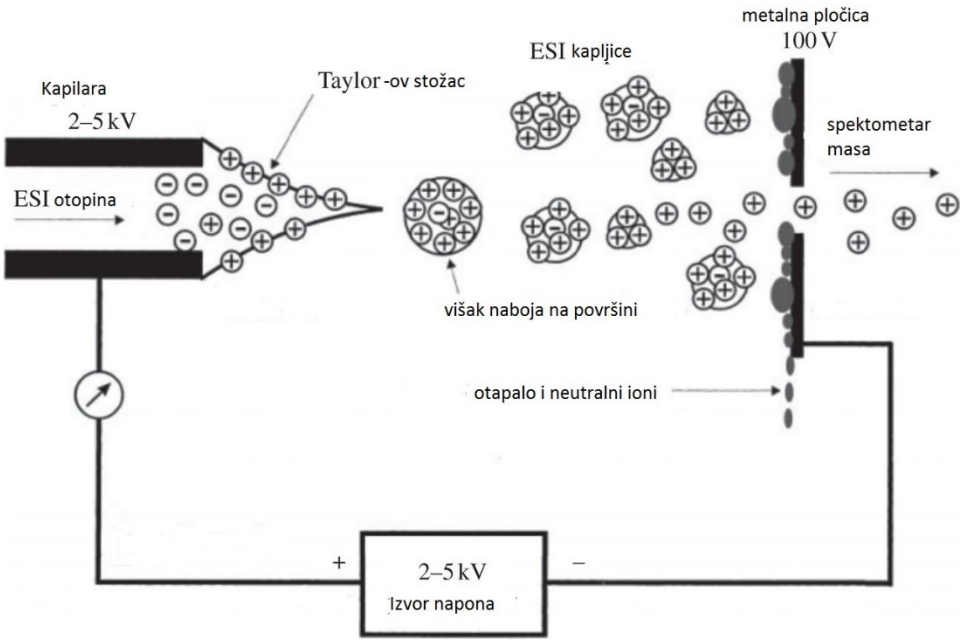
Slika 9. Primjer kolone koja se koristi kod UHPLC-a [36]

2.5.2. Spektrometrija masa: ESI-TOF-MS

Spektrometrija masa je destruktivna analitička tehnika koja se često primjenjuje za strukturnu analizu. Klasična izvedba spektrometra masa sastoji se od ionizacijske ćelije, fragmentacijske ćelije i analizatora masa. Sve ove sastavnice su međusobno povezane u jednu cjelinu koja omogućava analizu ovom tehnikom. Kod analize makromolekula, najčešći izvori iona u spektrometriji masa koji se koriste su ESI i MALDI sustav ionizacije.[30, 32]

ESI – relativno blag način ionizacije, ionizacija neposredno iz otopine što ovoj tehnici ionizacije omogućava analizu molekula velikoga raspona masa. Otopina koja sadrži analit se uvodi u metalnu cijev (kapilaru) na koju je primijenjen atmosferski tlak i visoki napon, što dovodi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja unutar otopine. Ukoliko je kapilara spojena na pozitivni kraj samog izvora, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi te se isti nakupljaju na površini tekućine. Pri kritičnoj točki jakosti električnog polja tekućina se formira u tzv. Taylorov stožac (Slika 10.) unutar kojeg se neprekinuto stvaraju kapljice obogaćene pozitivnim nabojem. Veličina formiranih kapljica ovisi o parametrima kao što su protok i o kemijsko-fizikalnim svojstvima otopine. Postizanjem Rayleigh-ove granice stabilnosti kapljice se dijele

na način da svaka nova kapljica sadrži oko 2% mase i 15% naboja prethodne kapljice. Daljnjim uzastopnim dijeljenjem kapljica, isparavanjem otapala, (dva do tri puta) povećava se omjer pozitivno nabijenih vrsta. Tako nabijene kapljice usmjeravaju se k analizatoru.[30, 32]



Slika 10. Prikaz dijeljenja kapljica i njihovo usmjeravanje u spektrometar masa (analizator)[31]

TOF – uz Q jedan je od najkorištenijih analizatora u spektrometriji masa kod analize glikana i *N*-glikozilacije proteina. Ioni koji su napustili izvor iona posjeduju masu i nabojni broj ubrzavaju se određenim potencijalom (Slika 11) . Izraz za *kinetičku energiju*, E_k može se zapisati na sljedeći način (izraz 1)[30, 32]:

$$E_k = \frac{m \cdot v^2}{2} = z \cdot e \cdot V$$

E_k – kinetička energija iona m – masa iona v – brzina ion

z – nabojni broj iona e – naboj jednog elektrona V – primijenjeni potencijal

Vrijeme koje je potrebno ionu da prijeđe tj. „preleti“ udaljenost može se zapisati na sljedeći način (izraz 2)[30]:

$$t = \frac{s}{v}$$

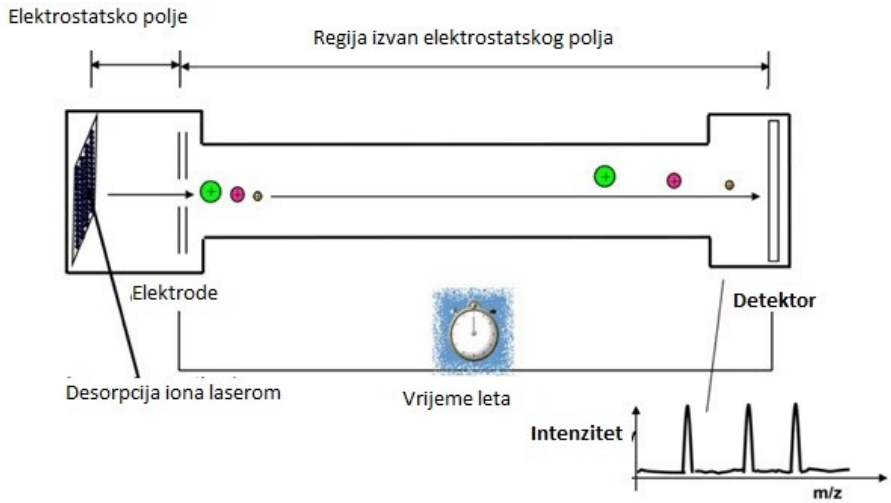
t – vrijeme leta iona s – duljina TOF cijevi v – brzina gibanja iona

Kombiniranjem ova dva prethodna izraza (izraz 1 i izraz 2) dobijemo jednadžbu koja nam opisuje ovisnost vremena „leta“ iona o drugim već gore definiranim parametrima. Isti možemo zapisati na sljedeći način (izraz 3)[30]:

$$t = \sqrt{\frac{m \cdot s^2}{2 \cdot z \cdot V \cdot e}}$$

Kako duljina i primijenjeni potencijal imaju konstantne vrijednosti, a *e* je jedinični naboj elektrona, vrijeme potrebno da ion preleti TOF cijev je direktno proporcionalno drugom korijenu kvocijenta *m/z*.[30, 32]

Kako analizator mjeri vrijeme leta iona, potrebno je da ioni „krenu“ u isto vrijeme. Iz tog razloga ove tehnike često zahtijevaju pulsirajuće tehnike ionizacije. Ukoliko ioni iz ionskog izvora dolaze kontinuirano, nužno je da isti dolaze u pulsevima.[30, 32]



Slika 11. Shematski prikaz analizatora koji mjeri vrijeme leta iona.[33]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene kemikalije

Metanska kiselina (HCOOH) (Merck), trifluoroctena kiselina (TFA) (Sigma), amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (Acros Organic), sorpcijsko sredstvo C-18 ec (Macherey-Nagel), acetonitril (LC-MS grade) (J. T. Baker), propan-2-ol (Sigma), acetonitril (HPLC grade) (Scharlab) mili-Q voda (Merck), argon (Ar) (Messer), trifluoroctena kiselina (TFA) (Chromasolv)

3.1.2. Enzimi

- Tripsin (engl. *Sequencing grade Modified Trypsin*) (Promega) – 100 µg

  (1U – engl. *Unit*- predstavlja količinu enzima koja je potrebna za proizvodnju 1 µmol ΔA_{253} u jednoj minuti koristeći supstrat N_α-benzoil-L-arginin-etil-ester (BAEE). Substrat je otopljen u otopini Tris-HCl koncentracije 50 mmol dm^{-3} i $CaCl_2$ (pH 7,6) koncentracije 1 mmol dm^{-3}, dok je enzim otopljen u octenoj kiselini koncentracije 50 mmol dm^{-3}. [34]

3.1.3. Korištene filtar pločice

0,20 µm GHP AcroPrep (Pall) – filtar pločica s 96 jažica, volumena 1 mL po jažici i hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,20 µm. Korištena je za pročišćavanje tripsiniziranih glikopeptida.

0,10 µm PE Frit (Orochem) – filtar pločica s 96 jažica, volumena 0,70 mL po jažici i hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine 0,10 µm. Korištena je za pročišćavanje tripsiniziranih glikopeptida.

3.1.4. Korištene pločice

1 mL Round Collection Plate (Waters®) – pločice s 96 jažica, volumena 1 mL po jažici. Korištena pri tripsinizaciji uzorka.

200 µL PCR Robotic plate (Thermo scientific) – pločice s 96 jažica, volumena 200 µL po jažici. Korištena pri sakupljanju pročišćenih glikopeptida te za daljnju analizu.

3.1.5. Korišteni ostali pribor i uređaji

LiteTouch™ 1,7 mL Microcentrifuge Tube (Rainin) – tubice volumena 1,7 mL. Korištene za skladištenje uzorka, pripravu pufera te pripravu enzima.

5 mL LTS™ Tips (Rainin) – nastavci (tipse) za automatsku pipetu korištene pri pripravi pufera.

5 mL Eppendorf Tubes® (Eppendorf®) – tubice volumena 5 mL. Korištene za pripravu pufera.

Serological Pipet 50 mL (Falcon®) – serološka pipeta volumena 50 mL korištena za pripremu korištenih otopina.

Pipet-Lite XLS (Rainin) – automatske mikropipete raznih volumnih opsega. Korištene pri radu.

Lab. Incubator (M.R.C.) – inkubator koji je termostatiran na 37 °C. Korišten za dio postupka tripsinizacije.

SpeedVac Concentrator SC210A (Thermo) – uređaj za centrifugu s vakuum otparivačem. Korišten je za sušenje uzorka i pročišćenih glikopeptida.

Magnetic stirer MR 3000 D (Heildoph) – magnetna miješalica korištena za miješanje pri pripravi suspenzije čvrste faze.

MicroSealer (MicroSeal) – uređaj za lijepljenje mirkofolije na pločice čime se hermetički čuvaju uzorci.

3.1.6. Priprema otopina acetonitrila

100 mL otopine acetonitrila (20% ACN, 0,1% TFA) je pripremljeno na način da je pomiješano 80 mL Mili-Q vode i 20 mL ACN-a (J. T. Baker), potom je u digestoru u tako pripremljenu otopinu dodano 100 µL TFA.

3.1.7. Priprema otopine Tripsina

Trypsin (Promega) sadrži liofilizirani tripsin i pripadajući pufer. Otopina je pripravljena tako da je 100 µg tripsina otopljeno u 1 mL pufera.

3.1.8. Priprema otopine TFA i AF pufera

Pola litre otopine trifluoroctene kiseline (0,1% TFA) je pripremljeno na način da je pomiješano 500 mL Mili-Q vode s 0,5 mL TFA.

Amonijev formijat pufer je pripremljen tako što je pomiješan 1 mL 0,1% otopine mravlje kiselina (HCOOH) s 170 µL otopine amonij hidrogen karbonata, koncentracije 1 mol dm^{-3} što daje otopinu amonij formijat pufera, koncentracije 0,1 mol dm^{-3} pH vrijednosti 7.

3.2. Optimizacija predanalitičkog postupka analize *N*-glikozilacije IgG-a LC-ESI-TOF tehnikom

Izvorna metoda je sadržavala već postojeće predanalitičke postupke priprave glikopeptida, koji se nadalje analiziraju u analitičkom postupku same metode. Kako bi se dobio bolji rezultat u smislu robusnosti i osjetljivosti, bilo je potrebno urediti tj. optimizirati već postojeće predanalitičke postupke ove metode za analizu *N*-glikozilacije. Izvorni predanalitički postupak se može podijeliti u nekoliko dijelova: tripsinizacija IgG-a dobivenih iz ljudskog seruma, izdvajanje glikopeptida ekstrakcijom obrnutih faza na čvrstoj fazi, sušenje ekstrahiranih glikopeptida. Detaljnije objašnjeno dalje u tekstu.

i. Tripsinizacija IgG-a dobivenih iz ljudskog seruma – Pipetira se volumen 40 µL pročišćenog IgG-a u svaku jažicu PCR pločicu (96 jažica). Potom se 200 µL enzima pomiješa s 900 µL Mili-Q vode te se iz tako pripremljene otopine enzima dodaje po 10 µL u svaku jažicu na PCR pločici. Neposredno nakon toga se indikatorskim lakmus papirom provjerava pH vrijednost koja treba oko 7. Pločice se zatim hermetički zatvaraju lijepljenjem termalnom folijom i tako pripremljena pločica se potom stavlja u inkubator na 37 °C preko noći.

ii. Izdvajanje glikopeptida ekstrakcijom obrnutih faza na čvrstoj fazi – Pripremi se suspenzija C-18 faze u 80 % ACN-u masene koncentracije 50 mg mL^{-1}. 100 µL tako pripravljene suspenzije se dodaje u svaku jažicu filtar pločice (Orochem). Zatim se C-18 kolone održavaju takvima ispiranjem s 80% ACN-om, potom se ekvilibriraju ispiranjem u 0,1% TFA. Nakon toga dodaju se glikopeptidi koje neposredno prije, zadnjeg ispiranja kolone, razrijedimo 10 puta s 0,1% TFA. Tako razrijeđeni glikopeptidi se dodaju na filtar pločicu još triput ispiru s 0,1% TFA. Nakon zadnjeg ispiranja s 0,1% TFA, filtar pločica se osuši centrifugiranjem. U PCR pločicu eluiramo glikopeptide iz filtar pločice koristeći 20% ACN. Potom se tako dobivena PCR pločica stavlja sušiti u uređaj za centrifugu s vakuum otparivačem.

iii. Sušenje ekstrahiranih glikopeptida – nakon što je provedeno izdvajanje glikopeptida ekstrakcijom na čvrstoj fazi, uzorci se stavljaju sušiti na 8 do 10 sati u uređaj za centrifugu s vakuum otparivačem.

3.2.1. Postupak tripsinizacije

U ovom dijelu postupka gledao se utjecaj AF pufera na efikasnost tripsinizacije. Postupak je dizajniran na sljedeći način. Pipetira se volumen, definiran u tablicama dolje (Tablica 1 i Tablica 2), pročišćenog IgG-a u svaku jažicu na (Round Collection Plate) pločici (96 jažica). Potom se 200 µL enzima pomiješa s 900 µL AF pufera te se iz tako pripremljene otopine enzima dodaje po 10 µL u svaku jažicu na PCR pločici. Neposredno nakon toga se indikatorskim lakmus papirom provjerava pH vrijednost koja treba biti oko 7. Pločice se zatim hermetički zatvaraju lijepljenjem termalnom folijom i tako pripremljena pločica se potom stavlja u inkubator na 37 °C preko noći.

Tablica 1 Dizajn pokusa za promatranje tripsinizacije na (Orochem) pločici. Prikaz volumena smjese pročišćenih IgG-a (engl. *IgG pool,* IgGp), masene koncentracije 0,23 µg μL^{-1} raspodijeljenih po jažicama na pločici (Orochem), (1-6) enzim + Mili-Q voda, (7-12) enzim + AF pufer. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (µL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	5	20	2,5	10	1	40	5	20	2,5	10	1	40
E												
F												
G												
H												

Tablica 2 Dizajn pokusa za promatranje tripsinizacije na GHP (Pall) pločici. Prikaz volumena smjese pročišćenih IgG-a (engl. *IgG pool,* IgGp), masene koncentracije 0,23 µg μL^{-1} raspodijeljenih po jažicama na pločici (Orochem), (1-6) enzim + Mili-Q voda, (7-12) enzim + AF pufer. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (µL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	1	5	2,5	20	10	40	1	5	2,5	20	10	40
E												
F												
G												
H												

Svi ostali dijelovi postupka su isti kao u izvornoj metodi. Ovaj postupak se koristio kako bi je moglo uvidjeti postoji li analitički značajna razlika između dva načina priprave enzima.

3.2.2. Postupak ekstrakcije glikopeptida

U ovom dijelu postupka gledao se utjecaj mase C-18 faze na ekstrakciju glikopeptida. Postupak je dizajniran na sljedeći način. Pipetira se volumen, definiran u tablicama dolje (Tablica 3 i Tablica 4), smjese pročišćenog IgG-a koncentracije 0,23 μg μL^{-1} u svaku jažicu na pločici (Waters®). Tripsinizacija se provela na gore opisan način s tim da je 200 μL enzima pomiješano s 900 μL AF pufera. Korištena je filtar pločica (Orochem) i filtar pločica (Pall). Nanesene su različiti volumeni C-18 faze, koncentracije 50 μg μL^{-1} (Tablica 3 i Tablica 4) svi ostali dijelovi postupka ekstrakcije su zadržani iz izvorne metode.

Tablica 3 Dizajn pokusa za promatranje utjecaja volumena C-18 faze na (Orochem) pločici. Plavo označava volumen IgGp-a, masene koncentracije 0,23 μg μL^{-1} crveno označava volumen C-18 faze, masene koncentracije 50 μg μL^{-1}. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (μL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	10_50	40_100	20_500	20_50	10_200	20_200	10_500	40_200	20_100	10_100	40_500	40_200
E												
F												
G												
H												

Tablica 4 Dizajn pokusa za promatranje utjecaja volumena C-18 faze na GHP (Pall) pločici. Plavo označava volumen IgGp-a, masene koncentracije 0,23 μg μL^{-1} crveno označava volumen C-18 faze, masene koncentracije 50 μg μL^{-1}. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (μL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	10_50	40_100	20_500	20_50	10_200	20_200	10_500	40_200	20_100	10_100	40_500	40_200
E												
F												
G												
H												

3.2.3. Utjecaj efekta razrjeđenja na ekstrakciju glikopeptida

U ovom eksperimentu su korištene dvije vrste filtar pločica: (Orochem) i GHP (Pall) pločice. Eksperiment je dizajniran na način da su uzeti volumeni IgGp-a od 20 µL i 40 µL i potom razrjeđivani 2x; 5x; 7,5x 10x. Uz navedena razrjeđenja nanesen je uzorak od 20 µL IgGp-a i kvazikontrolni uzorak (izvorna metoda) IgGp-a od 40 µL. Ovako pripremljena pločica je stavljena na sušenje. Posušeni uzorci su resuspendirani u AF puferu, potom je dosan volumen IgGp-a od 20 µL i kontrolni uzorak (volumen) IgGp-a od 40 µL i provedena tripsinizacija na gore opisan način (enzim pripremljen u AF puferu). Nakon provedene tripsinizacije, glikopeptidi su ekstrahirani na gore opisan način. Korištene dvije različite filtar pločice i dvije različite količine C-18 faze, volumen faze od 100 µL (Tablica 5 i Tablica 6) i 200 µL (Tablica 7 i Tablica 8) kao kontrola (izvorna metoda).

Tablica 5 Dizajn pokusa za promatranje utjecaja razrjeđenja na GHP (Pall) pločici. Plavo označava volumen IgGp-a, masene koncentracije 0,23 µg μL^{-1}; zeleno označava koliko puta je IgGp razrijeđen. R- razrjeđenje i sušenje, S-sušenje, BS- bez sušenja. Volumen C-18 faze je 100 µL, masene koncentracije 50 µg μL^{-1}. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (µL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A B C D E F G H	IgG S 20	IgG R2 20	IgG R5 40	IgG BS 40	IgG R7.5 20	IgG S 40	IgG R2 40	IgG R10 20	IgG BS 20	IgG R5 20	IgG R10 40	IgG R 7.5 40

Tablica 6 Dizajn pokusa za promatranje utjecaja razrjeđenja na (Orochem) pločici. Plavo označava volumen IgGp-a, masne koncentracije 0,23 μg μL^{-1} zeleno označava koliko puta je IgGp razrijeđen. R- razrijeđenje i sušenje, S-sušenje, BS- bez sušenja. Volumen C-18 faze je 100 μL, masene koncentracije 50 μg μL^{-1}. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (μL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG S 20	IgG R2 20	IgG R5 40	IgG BS 40	IgG R7.5 20	IgG S 40	IgG R2 40	IgG R10 20	IgG BS 20	IgG R5 20	IgG R10 40	IgG R 7.5 40
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tablica 7 Dizajn pokusa za promatranje utjecaja razrjeđenja na GHP (Pall) pločici. Plavo označava volumen IgGp-a, masene koncentracije 0,23 μg μL^{-1} zeleno označava koliko puta je IgGp razrijeđen. R- razrijeđenje i sušenje, S-sušenje, BS- bez sušenja. Volumen C-18 faze je 200 μL, masene koncentracije 50 μg μL^{-1}. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (μL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG S 20	IgG R2 20	IgG R5 40	IgG BS 40	IgG R7.5 20	IgG S 40	IgG R2 40	IgG R10 20	IgG BS 20	IgG R5 20	IgG R10 40	IgG R 7.5 40
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tablica 8 Dizajn pokusa za promatranje utjecaja razrjeđenja na (Orochem) pločici. Plavo označava volumen IgGp-a, masne koncentracije 0,23 μg μL^{-1} zeleno označava koliko puta je IgGp razrijeđen. R- razrijeđenje i sušenje, S-sušenje, BS- bez sušenja. Volumen C-18 faze je 200 μL, masne koncentracije 50 μg μL^{-1}. Navedeni volumeni su u mikrolitrima (μL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG S 20	IgG R2 20	IgG R5 40	IgG BS 40	IgG R7.5 20	IgG S 40	IgG R2 40	IgG R10 20	IgG BS 20	IgG R5 20	IgG R10 40	IgG R 7.5 40
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3.3. Priprema i analiza biološkog uzorka

3.3.1. Biološki uzorak

Uzeta je venska krv iz deset (10) odraslih ljudi koristeći vakutaner s ljubičastim čepom. Grupu od osam ljudi sačinjavaju muškarci i žene u omjeru 1:1. Uzorci 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (zaštita identiteta ispitanika, brojčani prikaz) uzeti su 9. prosinca, 10. prosinca i 18. prosinca 2014. Uzorak 9 (zaštita identiteta ispitanika, brojčani prikaz) uzet je 9. prosinca i dva puta 10. prosinca 2014., dok je uzorak 10 (zaštita identiteta ispitanika, brojčani prikaz) uzet 10. prosinca, 11. prosinca i 19. prosinca 2014. Uzorak 5 uzet 10. prosinca 2014. je korišten za testiranje plazme (ne IgG).

Nakon 2 do 3 sata na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3000 rpm, zatim na 10 minuta na 5000 rpm. Separirana plazma je pipetirana u tubice zapremnine od 5 mL. Iz tako pripravljenih tubica uzeto je 100 µL plazme za izolaciju IgG-a. Preostali uzorci su smrznuti na temperaturu od -20 °C. (*Zaposlenici tvrtke Genos*)

3.3.2. Analiza stabilnosti glikozilacije IgG-a

Modelirana je pločica s biološkim uzorcima na dolje naveden način. (Tablica 9).

Tablica 9. Pločica s biološkim uzorcima za *ultimative test (IgG).* Prvi broj označava ciklus vađenja krvi (1, 2 ili 3), drugi broj označava replikant (1, 2 ili 3), *stand* označava standard, *blank* označava slijepu probu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PP2_2	DRD1_3	VS1_3	IU1_1	stand_03	IU2_2	DRD1_1	OZ3_2	stand_10	TK2_3	TK3_3	VS3_1
B	ZH3_1	ZH3_2	OZ1_3	stand_09	MS2_2	DRD2_2	TK1_2	ZH2_1	ZH3_3	IU2_1	ZH2_2	IU3_2
C	ZH1_3	ZH2_3	stand_01	DRD3_1	VS1_1	PP2_1	OZ3_1	GL2_3	PP1_2	ZH1_2	TK3_1	MS3_2
D	GL3_3	GL1_3	stand_07	blank_1	stand_12	stand_14	ZH1_1	MPB1_1	TK2_1	MPB1_3	IU2_3	VS1_2
E	stand_08	VS2_2	OZ2_1	MPB3_1	VS3_2	stand_13	DRD3_3	stand_06	IU3_3	OZ2_3	OZ2_2	DRD2_1
F	IU1_3	OZ3_3	DRD3_2	GL3_2	DRD2_3	IU1_2	TK3_2	TK2_2	OZ1_1	GL2_1	TK1_3	stand_04
G	VS2_1	stand_05	GL2_2	GL1_1	VS2_3	PP1_3	VS3_3	MPB1_2	stand_02	MS3_1	GL3_1	MS2_3
H	MS3_3	OZ1_2	IU3_1	PP1_1	PP2_3	GL1_2	MS2_1	DRD1_2	TK1_1	MPB3_3	MPB3_2	stand_11

Pipetiran je volumen uzorka od 10 µL (Tablica 9), pročišćenog IgG-a u svaku jažicu na pločici s 96 jažica. Potom se doda 0,2 µg enzima, po uzorku, u svaku jažicu na pločici pripremljenog na način da se 200 µL enzima masene koncentracije 100 µg mL^{-1} razrijedi 5 puta vodom radi pipetiranja. Neposredno nakon toga se indikatorskim lakmus papirom provjerava pH vrijednost koja treba biti oko 7. Pločice se zatim hermetički zatvaraju lijepljenjem termalnom folijom i tako pripremljena pločica se potom stavlja u inkubator na 37 °C preko noći. Nakon ove faze slijedi faza ekstrakcije glikopeptida na sljedeći način.

Pripremi se suspenzija C-18 faze u 80 % ACN-u masene koncentracije 50 mg mL^{-1}. 50 µL tako pripravljene suspenzije se dodaje u svaku jažicu filtar pločice (Orochem). Zatim se C-18 kolone održavaju takvima ispiranjem s 80% ACN-om, potom se ekvilibriraju ispiranjem u 0,1% TFA. Nakon toga dodaju se glikopeptidi koje neposredno prije, zadnjeg ispiranja kolone, razrijedimo 10 puta s 0,1% TFA. Tako razrijeđeni glikopeptidi dodani na filtar pločicu još triput ispiru s 0,1% TFA. Nakon zadnjeg ispiranja s 0,1% TFA, filtar pločica se osuši centrifugiranjem. U PCR pločicu eluiramo glikopeptide iz filtar pločice koristeći 20% ACN. Potom se tako dobivena PCR pločica se stavlja sušiti u uređaj za centrifugu s vakuum otparivačem.

Nakon što su uzorci osušeni resuspendirani su u 10 µL Mili-Q vode te analizirani instrumentom tehnikom LC-ESI-MS.

3.3.3. Parametri instrumenta pri analizi

Glikopeptidi regije Fc IgG-a razdvajaju se Nano *AQUITY* kromatografskim sustavom (Waters) spregnutim s *Maxis Compact* spektrometrom masa (Bruker) koji za izvor iona koristi ESI sustav, dok su analizatori masa Q i TOF. Izlaz kolone je neposredno spojen na izvor iona pomoću raspršivača za kapilarnu elektroforezu (Agilent). Uzorci se resuspendiraju u 10 µL vode prije iniciranja. Volumen injektiranja je 9 µL. Uzorci se nanose i koncentriraju na C-18 SPE *trap* koloni (Dionex, Acclaim PepMap100 5mm x 300 mm) pri protoku od 40 µL min^{-1} u 0,1% TFA. Glikopeptidi se razdvajaju na C-18 *nano* koloni (Halo, 150 x 100 mm) za rpHPLC, kondicionalnoj u 100% otapalu A (0,1% TFA) pri protoku od 1µL min^{-1}. Analitički protok je 1 µL min^{-1}. Gradijent koji se koristi za razdvajanje podrazreda IgG započinje s 18% otapala B (80%ACN, 20% 0,1%TFA) i završava s 25% otapala B. Za pročišćavanje uzoraka se koristi C-

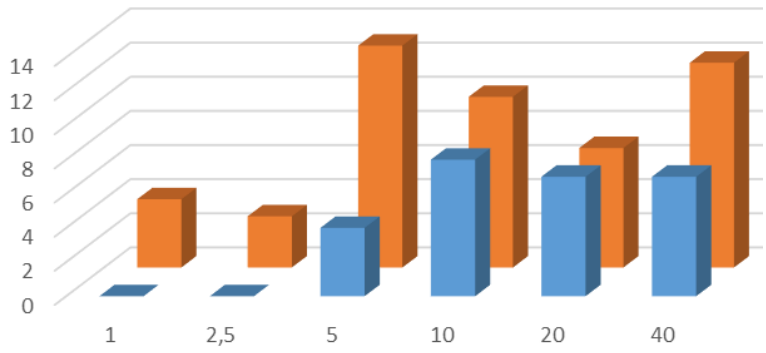
18 *trap* kolona (Thermo, pepmap). Spektri su snimani u pozitivnom ionskom modu u području od 600 m/z do 1800 m/z frekvencijom od 0,5 Hz. Primijenjeni naponi u spektrometru masa su sljedeći: Heksapol, RF Vpp iznosi 600 V; kolizijska ćelija, RF Vpp iznosi 2000 V; TOF cijev, 9000 V; reflektor 2785 V; detektor iznosi 1950 V. Vrijeme prijenosa iona je 110 µs, a skladištenje prije pulsa je 12 µs. Kako bi se smanjio negativan utjecaj TFA na ionizaciju u izvoru iona, neprekidno se u izvor iona dovodi 20% propanska kiselina u 50% propan-2-olu protokom od 2 µL min^{-1}.

Nakon provedene analize dobiveni spektri se pretvaraju u otvoreni *mzxml* format pomoću računalnog programa *DataAnalysis 3.2* (Bruker). Uzorci su kalibrirani izborom 10-15 najboljih kalibranata s predefinirane liste kalibranata. Kvantifikacija je rađena na temelju predefinirane liste analita koja se sastoji od glikopeptida koji sadržavaju 20 najzastupljenijih glikoformi na svakom podrazredu IgG-a. Kvantificiraju se dvostruko i trostruko nabijeni ioni analita te prva 4 najjača signala u izotopnoj raspodjeli. Podatci su procesirani u internom programu *pyHTGlyco8* koji radi na temelju programskog jezika *Phyton V3*.

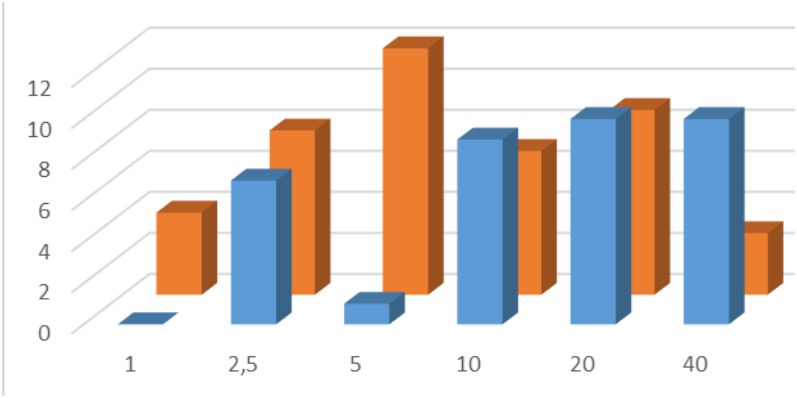
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija predanalitičkog postupka analize *N*-glikozilacije IgG-a LC-ESI-TOF tehnikom

Kako je prilikom optimizacije metode gledano nekoliko parametara, potrebno je bilo to sve uklopiti zajedno u jedan koherentni sustav. Promatrala se efikasnost enzima s obzirom na medij u kojem se nalazi tj. AF pufer ili voda. Promatrala se masa C-18 faze i volumen uzorka pročišćenog IgG-a, te vrsta filtar pločice. Iz dobivenih relativnih intenziteta za svaku pojedinu glikoformu IgG-a, izračunate su relativne standardne devijacije (engl. *Relative Standard Deviation,* RSD). Na temelju analitičke laboratorijske prakse postavljeno je da RSD vrijednost bude manja od 3%. Razmatrao se broj glikoformi koje zadovoljavaju gore navedeni uvjet za definirani analit.

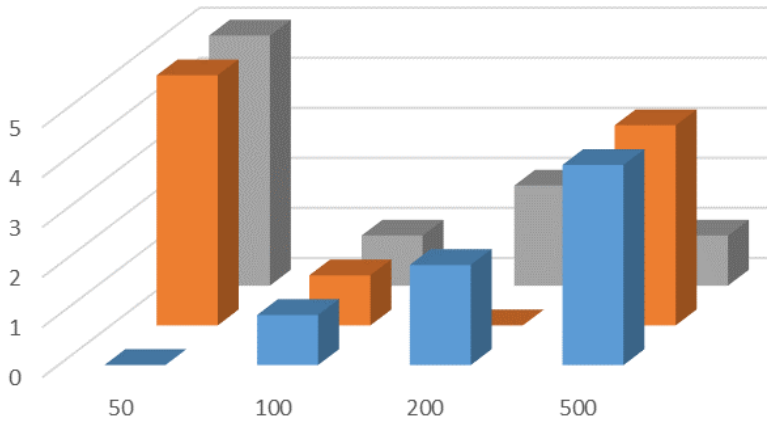


Slika 12. Grafički prikaz broja glikoformi koje imaju RSD < 3% (ordinata) s obzirom na volumen IgGp u mikrolitrima (apscisa), masene koncentracije 0,23 µg μL^{-1}. Plavo označava tripsinizaciju u AF puferu, dok narančasto označava tripsinizaciju bez pufera. Korištena filtar pločica je Orochem.

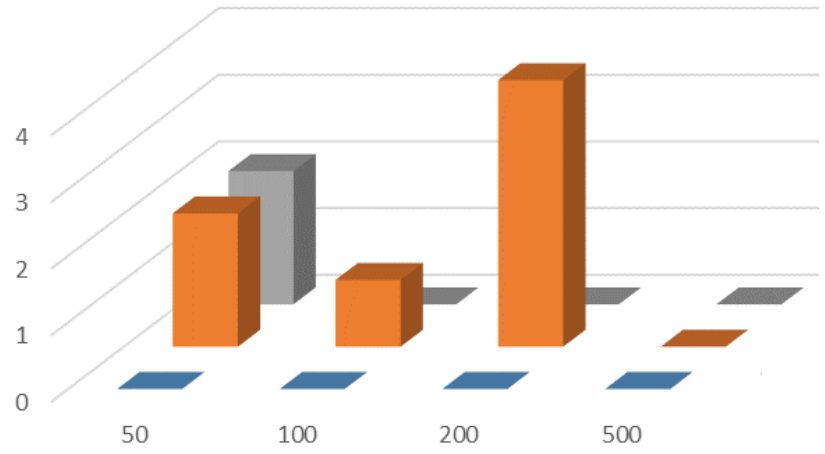


Slika 13. Grafički prikaz broja glikoformi koje imaju RSD < 3% (ordinata) s obzirom na volumen IgGp u mikrolitrima (apscisa), masene koncentracije 0,23 µg µL^{-1}. Plavo označava tripsinizaciju u AF puferu, dok narančasto označava tripsinizaciju bez pufera. Korištena filtar pločica je GHP.

Na temelju dobivenih vrijednosti može se zaključiti da je tripsinizaciju povoljnije provoditi tako što enzim priredimo s Mili-Q vodom. Zastupljeno je više glikoformi čiji relativni intenziteti imaju RSD vrijednost manju od 3%. Također se iz Slika 12. i 13. može zaključiti da je povoljnije koristiti Orochem filtar pločicu za pročišćavanje glikopeptida, štoviše to se može vidjeti na Slika 14. i 15.



Slika 14. Grafički prikaz broja glikoformi koje imaju RSD < 3% (ordinata) s obzirom na volumen C-18 faze u mikrolitrima (apscisa), masene koncentracije 50 µg µL^{-1}. Plavo označava volumen IgGp-a od 40 µL, narančasto označava volumen IgGp-a od 20 µL te sivo označava volumen IgGp-a od 10 µL. Masena koncentracija IgG-a je 0,23 µg µL^{-1}. Korištena filtar pločica je Orochem.



Slika 15. Grafički prikaz broja glikoformi koje imaju RSD < 3% (ordinata) s obzirom na volumen C-18 faze u mikrolitrima (apscisa), masene koncentracije 50 µg µL^{-1}. Plavo označava volumen IgGp-a od 40 µL, narančasto označava volumen IgGp-a od 20 µL te sivo označava volumen IgGp-a od 10 µL. Masena koncentracija IgG-a je 0,23 µg µL^{-1}. Korištena filtar pločica je GHP.

Na temelju dobivenih vrijednosti može se uvidjeti da porast volumena IgGp-a zahtijeva povećanje mase C-18 faze u samom procesu sukladno broju glikoformi čiji relativni intenziteti imaju RSD vrijednost manju od 3%. Ovo se ujedno može objasniti na razini interakcije C-18 faze i glikopeptida. Ukoliko je masa glikopeptida relativno mala, potrebno je relativno malo C-18 faze kako bi rezultat pročišćavanja bio efektivniji, vrijedi i u obrnutom slučaju. Ukoliko se relativno velika masa glikopeptida pročišćava na relativno maloj masi faze može doći do zasićenja kolone, a time i do neefektivnog pročišćavanja. Iz ovih grafikona također se može vidjeti, što je spomenuto u prethodnom paragrafu, da je filtar pločica Orochem povoljniji izbor za pročišćavanje glikopeptida.

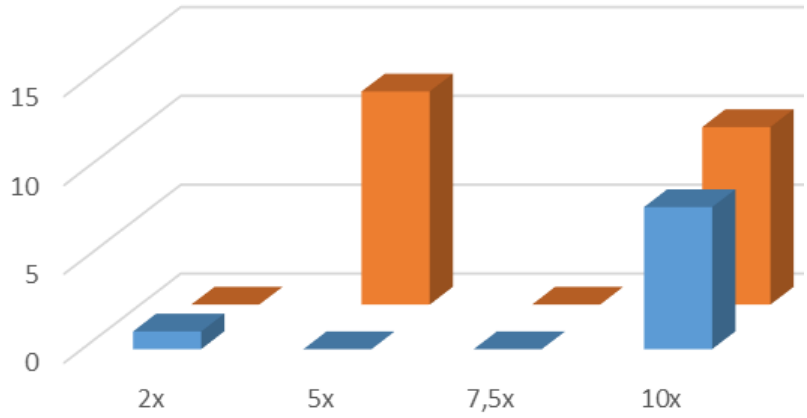
Usporedbom svih dobivenih rezultata, predanalitičkih postupaka analize glikozilacije IgG-a LC-ESI-MS tehnikom te istih prikazanih (Slika 12-14), određeni su sljedeći uvjeti kao optimalni:

- Početni volumen IgG-a od 10 µL, masene koncentracije 0,23 µg µL^{-1}
- Priprema enzima s vodom (trispinizacija)
- Volumen C-18 faze od 50 µL, masene koncentracije 50 µg µL^{-1}

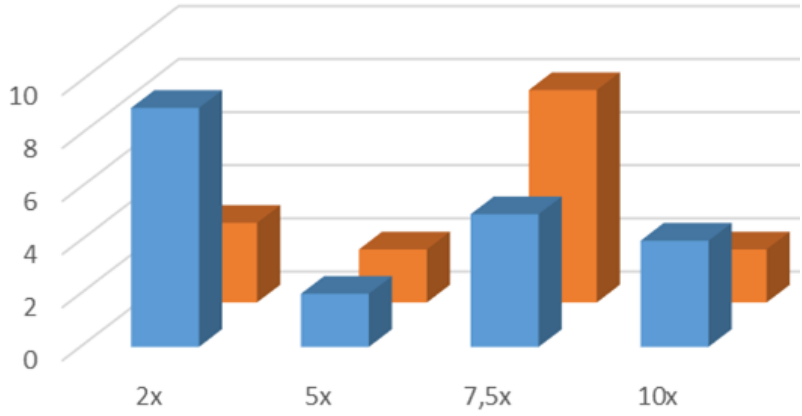
- Filtar pločica Orochem

4.1.1. Utjecaj efekta razrjeđenja na ekstrakciju glikopeptida

Unutar optimizacijskog postupka razmatrao se utjecaj sušenja i razrjeđenja IgG-a prije razgradnje s tripsinom.



Slika 16. . Grafički prikaz broja glikoformi koje imaju RSD < 3% (ordinata) s obzirom na broj razrjeđenja (apcisa). Plavo označava volumen IgGp-a od 40 µL, narančasto označava volumen IgGp-a od 20 µL. Masena koncentracija IgG-a je 0,23 µg μL^{-1}. Volumen C-18 faze je 100 µL, koncentracije 50 µg μL^{-1}. Korištena filtar pločica je Orochem.

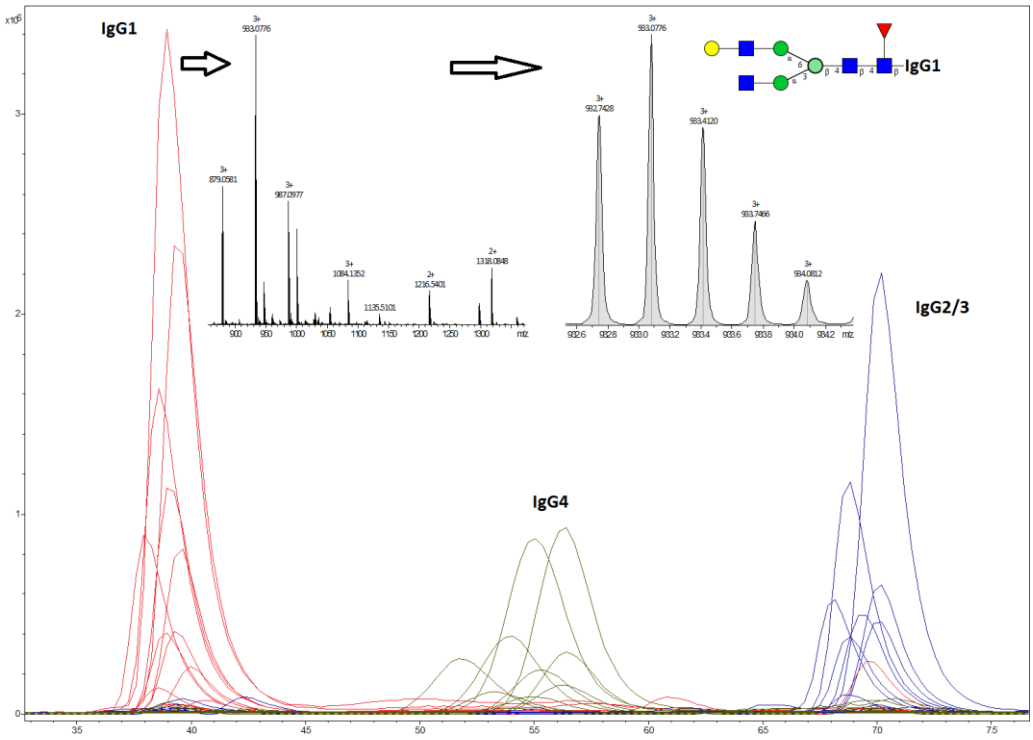


Slika 17. Grafički prikaz broja glikoformi koje imaju RSD < 3% (ordinata) s obzirom na broj razrjeđenja (apcisa). Plavo označava volumen IgGp-a od 40 µL, narančasto označava volumen IgGp-a od 20 µL. Masena koncentracija IgG-a je 0,23 µg μL^{-1}. Volumen C-18 faze je 200 µL, masne koncentracije 50 µg μL^{-1}. Korištena filtar pločica je Orochem.

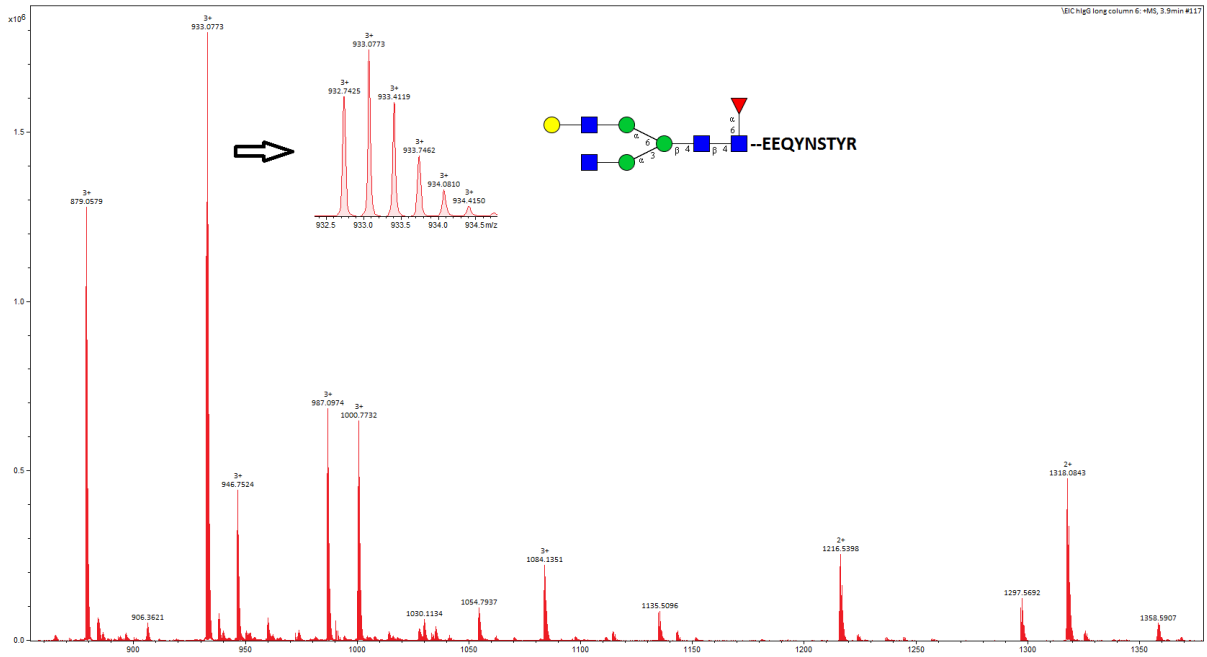
Na temelju dobivenih rezultata ne možemo tvrditi da postoji kauzalnost između razrjeđenja IgG-a i povećanja, odnosno smanjenja broja glikoformi čije su RSD vrijednosti relativnih intenziteta su manje od 3%. Iz ovih grafičkih prikaza možemo samo kazati da postoji nelinearnost s obzirom na razrjeđenje.

4.2. Analiza stabilnosti glikozilacije IgG-a

Na Slici 18. mogu se vidjeti podrazredi IgG-a razdvojeni na C-18 koloni, a na temelju analize spektara masa (Slika 19) dobiveni su intenziteti za svaku glikoformu (od 20 poznatih) svih podrazreda IgG-a. Kako bi se mogli donijeti konkretni zaključi o stabilnosti (promjenjivosti) glikozilacije IgG-a, korišten je statistički model tzv. *miješani model* (engl. *Mixed Model*). S navedenim modelom su izračunate p vrijednosti kako bi se moglo uvidjeti postoji li signifikantna razlika među dobivenim podatcima obzirom na tri vremenske točke (uzorkovanje). Dobivene *p* vrijednosti su korigirane, zbog velikog broja uzoraka, kako bi iste bile reprezentativnije.



Slika 18. Ionski kromatogram elucije IgG-a; svaka linija označava jedan m/z. Apscisa predstavlja vrijeme u minutama, dok ordinata intenzitet. U desnom kutu slike je prikazana struktura glikana G1F. ▼ - fukoza, ● - manoza, ● - galaktoza, ■ - *N*-acetilglukozamin.



Slika 19. Spektar mase Fc regije IgG-a, podrazred IgG1. Apscisa predstavlja omjer *m/z*, dok ordinata intenzitet. Najviši pik predstavlja struktura glikopeptida (G1F), pri vrhu slike prikazana je izotopna raspodjela istog. ▼ - fukoza, ● - manoza, ● - galaktoza, ■ - *N*-acetilglukozamin. Glikan je vezan na asparagin (N).

Miješani model je statistički model koji sadrži nepokretne (engl. *fixed effects)* i nasumične efekte (engl. *Random Effects*). Često se koristi kao model kod longitudinalnih studija, gdje se na istoj jedinici promatraju ponovljena mjerenja kroz definirani vremenski period. Također se može koristiti kod analize podataka gdje su isti grupirani (engl. *Cluster*) te na drugim sličnim statističkim jedinicama. [37]

Dobiveni intenziteti koji pripadaju određenoj glikoformi normalizirani su obzirom na ukupni glikom pojedinog podrazreda IgG-a. (zbroj svih udjela relativnih intenziteta 20 glikoformi daje 100% tj. glikom fragmenta Fc pojedinog podrazreda IgG-a). Tako normalizirani intenziteti su statistički analizirani (miješani model), pri tome da se analiza temeljila na nasumičnim efektima, zbog toga što nije moguće definirati nulto vrijeme jer karakteristični događaj ne postoji. Dobivene p vrijednosti su korigirane *Bonnferoni* korekcijom, kako bi se smanjila pogreška *p* vrijednosti. Prilikom računanja *p* vrijednosti *razina signifikantnosti α* iznosi 0,05.

Bonnferoni korekcija je statistička metoda kod koje se razina značajnosti, α razmatra kao α / n, gdje je *n* broj korištenih testova. Najčešće korišteni pristup pri višestrukim uspoređivanjima.[38]

Iz dobivenih *p* vrijednosti (Prilog, 7.1.) možemo zaključiti da postoji signifikantna razlika između vremenskih intervala (vremenske točke uzorkovanja) za dvije glikoforme; G0FN (IgG4) s pripadajućom *p* vrijednosti od 1,601 x 10^{-3} i G1FN (IgG4) s pripadajućom *p* vrijednosti od 3,406 x 10^{-3}. Na temelju toga možemo zaključiti da je glikozilacija u istom ispitaniku promjenjiva u vremenu. Značajne promjene u glikozilaciji nisu viđene kod drugih podrazreda IgG-a, što također govori da je glikozilacija IgG1 i IgG2/3 stabilna u vremenu tj. u analiziranim vremenskim intervalima. Nadasve, metoda je podložna daljnjoj optimizaciji i poboljšanju što bi u konačnici pridonijelo boljoj slici analize glikozilacije IgG-a.

§ 5. ZAKLJUČAK

Optimizacijom predanalitičkog dijela ove metode analize glikozilacije IgG-a, poboljšani su sami postupci analize. Prilikom optimizacijskog postupka promatralo se nekoliko parametara; efikasnost enzima obzirom na medij u kojem se nalazi tj. AF pufer ili voda, masa C-18 faze i volumen uzorka pročišćenog IgG-a, te vrsta filtar pločice. Na temelju dobivenih intenziteta izračunate su RSD vrijednosti. Granica RSD vrijednosti koja je uzeta, na temelju dosadašnje laboratorijske prakse, za razmatranje dobivenih podataka iznosi 3%. Razmatrani su intenziteti svih glikoformi. Optimalni analitički uvjeti su odabrani na temelju najvećeg broja glikoformi čije RSD su manje od 3% tj. razmatrao se broj glikoformi koji zadovoljava taj uvjet.

Masa enzima dodana po uzorku iznosila je 0,2 µg. Analizom broja glikoformi, čije RSD vrijednosti su manje od 3%, možemo uvidjeti da se najveća zastupljenosti istih pojavljuje u slučajevima gdje je enzim pripravljen s Mili-Q vodom. Također na temelju dobivenih podataka možemo kazati da je veća zastupljenosti glikoformi prilikom korištenja Orochem filtar pločice. Analizom je uočeno da količina C-18 faze ovisi o količini IgG-a u početnom uzorku. Količina C-18 faze raste proporcionalno s količinom prisutnih glikopeptida, odnosno IgG-a izoliranog iz plazme. Uzimajući u obzir sve dobivene rezultate, optimalno je koristiti sljedeće: početna masa IgG-a izoliranog iz plazme u iznosu od 2,3 µg (volumen 10 µL, masene koncentracije 0,23 µg μL^{-1}), masa C-18 faze u iznosu od 2,5 mg (volumen 50 µL, masene koncentracije 50 µg μL^{-1}) po uzorku. Prilikom priprave enzima, enzim treba resuspendirati u Mili-Q vodi, dok pri ekstrakciji glikopeptida pogodniji je izbor koristiti Orochem filtar pločicu. U konačnici metoda se još i dalje može mijenjati kako bi analiza istom bila robusnija i preciznija.

Analiza stabilnosti glikozilacije ukazuje na to da postoji promjena u glikozilaciji, unutar vremenskih točaka uzorkovanja u istog ispitanika, kod dvije glikoforme; G0FN (IgG4) s pripadajućom *p* vrijednosti od 1,601 x 10^{-3} i G1FN (IgG4) s pripadajućom *p* vrijednosti od 3,406 x 10^{-3}. Glikozilacija IgG1 i IgG2/3 stabilna je u vremenu tj. u analiziranim vremenskim intervalima.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. K. Ohtsubo i J. D. Marth, *Cell* **126** (2006) 855–867.
2. M. A. Lehrman, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, (2013) 457-464
3. G. Zauner, M. H. J. Selman, A. Bondt, Y. Rombouts, D. Blank, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Molecular & Cellular Proteomics*, 12 (2013) 856-865.
4. M. H.J. Selmana, R. J.E. Derksa, A. Bondta, M. Palmblada, B. Schoenmakera, C. A.M. Koelemana, F. E. van de Geijnb, R. J.E.M. Dolhainb, A. M. Deeldera, M. Wuhrera, *Jurnal of Proteomics*, **75** (2012) 1318-1329.
5. G. Vidarsson, G. Dekkers i T. Rispens, Frontiers in Immunology, **5** (2014), Article 520.
6. S. Sawant, S. Birhadea, A. Anil, H. Gilbert i A. Lali, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **133** (2016) 161–166.
7. A. N. Murray, W. Chen, A.Antonopoulos, S. R. Hanson, R. L. Wiseman,A. Dell, S.M. Haslam, D.L. Powers, E. T. Powers, J. W. Kelly, *Chemistry & Biology* **22** (2015) 1052-1062.
8. I. Akmačić Trbojević, *Analiza glikozilacije imunoglobulina G u upalnoj bolesti crijeva tekućinskom kromatografijom,* Doktorska disertacija, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet (2015)
9. J. Ruth, *Chemical Review,* **102** (2002) 258-303.
10. J. Krieg, S. Hartmann, A. Vicentini, W. Glasner, D. Hess i J. Hofsteenge, *Molecular Biology of the Cell*, **9** (1998)
11. Biochimej.univ-angers.fr (2016) Struktura kompleksa $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol. Dostupno na:http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/2ModifPOSTtraduc/8Glycosylation/2Figures/8TetradecasaccarylDolichol.png (Pristupljeno: 18. rujna 2016.)
12. E. S. Trombetta, *Glycobiology*, **13** (2003) 77R - 91R
13. absoluteantibody.com (2016) Shematski prikaz pet razreda imunoglobulina. Dostupno na: http://absoluteantibody.com/wp-content/uploads/2014/03/isotypes.png (Pristupljeno: 20. rujna 2016.)
14. I. Andreis, D. Batinić, F. Čulo, D. Grčević, V. Lukinović-Škudar, M. Marušić, M. Taradi i D. Višnjić, *Imunologija*, 7. izdanje, Medicinska naklada Zagreb, 2010.

15. https://upload.wikimedia.org (2016) Prikaz varijabilnih (V) i konstantnih dijelova (C) lakog (H) i teškog lanca (H) Dostupno na: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/bb/AntibodyChains.svg/2000px-AntibodyChains.svg.png (Pristupljeno: 21. rujna 2016.)
16. X. Yu, K. Baruah, C. N. Scanlan i M. Crispin, *Antibody Fc*, 1. izdanje, Elsavier, 2014, str. 179-194
17. http://www.rcsb.org (2016) Kristalna struktura čitavog IgG-a, protutijelo b12 (PDB: 1HZH) Kristalna struktura čitavog IgG-a, protutijelo b12, označeni dio predstavlja regiju Fc (PDB: 1HZH) Dostupno na: http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1HZH (Pristupljeno: 22. rujna 2016.)
18. http://www.rcsb.org (2016) Kristalna struktura regije Fc ljudskog IgG_1 (PDB: 3AVE) Dostupno na: http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3AVE (Pristupljeno: 22. rujna 2016.)
19. J. V. Ravetch i S. Bolland, *Annual Review of Immunology*, **19** (2001) 275-290.
20. R. L. Shields, A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie‖, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox‖ i L. G. Presta, *The Journal of Biological Chemistry,* **276** (2001) 6591-6604.
21. G. R. Guile, P. M. Rudd, D. R. Wing, S. B. Prime i R. A. Dwek, *Analytical Biochemistry,* **240** (1996) 210–226
22. R. Jefferis, *Expert Opinion on Biological Therapy*, **9** (2007) 1401-1413.
23. R. Jefferis, *Biotechnology Progress* **21**, (2005) 11-16.
24. M. Pučić, A. Mužinić, M. Novokmet, M. Škledar, N. Pivac, G. Lauc i O. Gornik, *Glycobiology*, **22** (2012) 975-982
25. Y. Rombouts, H. S. Jónasdóttir, A. L. Hipgrave Ederveen, K. R. Reiding, B. C. Jansen, J. Freysdottir, I. Hardardottir, A, Ioan-Facsinay, M.Giera1 i M. Wuhrer, *Glycoconjugate Journal*, **33** (2016) 457-470
26. A.Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler, *Essential of Glycobiology*, 2. izdanje, Cold Spring Harbor, New York, 2009.

27. M. Mreyen, A. Champion, S. Srinivasan, P. Karuso, K. L. Williams i N. H. Packer, *Journal of Biological Chemistry*, **275** (2000) 12164-12174
28. P. A. Hayens, *Glycobiology*, **8** (1998) 1-5
29. N. Galić i V. Drevenkar, *Kromatografija*, interna skripta za kolegij Instrumentne analitične metode II, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006.
30. N. Galić, *Spektrometrija masa*, interna skripta za kolegij Instrumentne analitične metode II, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2004.
31. http://d1czgh453hg3kg.cloudfront.net (2016) Prikaz dijeljenja kapljica i njihovo usmjeravanje u spektrometar masa (analizator) Dostupno na: http://d1czgh453hg3kg.cloudfront.net/content/royprsa/469/2159/20130458/F9.large.jpg (Pristupljeno: 7. listopada 2016.)
32. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, J. R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, 5. izdanje, Cengage Learning, 2013.
33. http://benthamopen.com (2016) Shematski prikaz analizatora koji mjeri vrijeme leta iona. Dostupno na: http://benthamopen.com/contents/figures/TOMICROJ/TOMICROJ-7-135_F2.jpg (Pristupljeno: 20. listopada 2016.)
34. https://worldwide.promega.com (2016) Dostupno na: https://worldwide.promega.com/products/mass-spectrometry/proteases-and-surfactants/trypsin-for-protein-characterization/trypsin-reagents/sequencing-grade-modified-trypsin/?activeTab=1 (Cat: V5117, LOT: 0000194476) (Pristupljeno: 20. listopada 2016.)
35. http://www.zdravlje.eu (2016) Prikaz sekrecije proteina i staničnih komponenti. Dostupno na: http://www.zdravlje.eu/wp-content/uploads/2011/06/Endoplazmatski-retikulum.jpg (Pristupljeno: 26. studenog 2016.)
36. http://www.selectscience.net (2016) Primjer kolone koja se koristi kod UHPLC-a. Dostupno na: http://www.selectscience.net/images/products/1869_ACQUITY-UPLC-BEH-Columns.jpg.ashx?width=250&height=250&bgcolor=white (Pristupljeno: 26. studenog 2016.)
37. https://en.wikipedia.org (2017) Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Mixed_model (Pristupljeno: 14. siječnja 2017.)
38. D. Zelić, *Višestruko testiranje hipoteza i Soričeva metoda,* Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014.

§ 7. PRILOZI

7.1. Popis *p* vrijednosti za svaku glikoformu pojedinog podrazreda IgG-a

	Varijable	*p* vrijednost	*p* vrijednost korigirana
1	IgG4_G0FN	2,668364e-05	0,001601019
2	IgG4_G1FN	5,774526e-05	0,003406970
3	IgG4_G0	1,292760e-02	0,749800943
4	IgG4_G1NS	3,190490e-02	1,000000000
5	IgG4_G2FN	1,476632e-01	1,000000000
6	IgG2_G2NS	1,678543e-01	1,000000000
7	IgG4_G1	2,340162e-01	1,000000000
8	IgG1_G2FN	3,129519e-01	1,000000000
9	IgG2_G0FN	3,382252e-01	1,000000000
10	IgG2_G2S	3,413430e-01	1,000000000
11	IgG1_G0	3,729052e-01	1,000000000
12	IgG1_G1N	3,824215e-01	1,000000000
13	IgG4_G1F	4,922443e-01	1,000000000
14	IgG4_G0N	4,927218e-01	1,000000000
15	IgG2_G2N	5,123363e-01	1,000000000
16	IgG1_G0N	5,723344e-01	1,000000000
17	IgG2_G1S	7,124208e-01	1,000000000
18	IgG1_G1	7,232759e-01	1,000000000
19	IgG4_G2F	7,799300e-01	1,000000000
20	IgG2_G1FS	8,030757e-01	1,000000000
21	IgG1_G1FNS	8,071276e-01	1,000000000
22	IgG2_G2FS	8,213129e-01	1,000000000
23	IgG2_G2FN	8,675592e-01	1,000000000
24	IgG2_G1FNS	9,064368e-01	1,000000000

	Varijable	*p* vrijednost	*p* vrijednost korigirana
25	IgG4_G0F	9,449343e-01	1,000000000
26	IgG4_G1S	9,734996e-01	1,000000000
27	IgG4_G1FNS	9,999998e-01	1,000000000
28	IgG4_G2N	9,999998e-01	1,000000000
29	IgG1_G0FN	9,999999e-01	1,000000000
30	IgG1_G1S	9,999999e-01	1,000000000
31	IgG2_G1FN	9,999999e-01	1,000000000
32	IgG2_G1N	9,999999e-01	1,000000000
33	IgG2_G1NS	9,999999e-01	1,000000000
34	IgG2_G2F	9,999999e-01	1,000000000
35	IgG1_G0F	1,000000e+00	1,000000000
36	IgG1_G1F	1,000000e+00	1,000000000
37	IgG1_G1FN	1,000000e+00	1,000000000
38	IgG1_G1FS	1,000000e+00	1,000000000
39	IgG1_G1NS	1,000000e+00	1,000000000
40	IgG1_G2	1,000000e+00	1,000000000
41	IgG1_G2F	1,000000e+00	1,000000000
42	IgG1_G2FNS	1,000000e+00	1,000000000
43	IgG1_G2FS	1,000000e+00	1,000000000
44	IgG1_G2N	1,000000e+00	1,000000000
45	IgG1_G2NS	1,000000e+00	1,000000000
46	IgG1_G2S	1,000000e+00	1,000000000
47	IgG2_G0	1,000000e+00	1,000000000
48	IgG2_G0F	1,000000e+00	1,000000000
49	IgG2_G0N	1,000000e+00	1,000000000
50	IgG2_G1	1,000000e+00	1,000000000
51	IgG2_G1F	1,000000e+00	1,000000000

	Varijable	*p* vrijednost	*p* vrijednost korigirana
52	IgG2_G2	1,000000e+00	1,000000000
53	IgG2_G2FNS	1,000000e+00	1,000000000
54	IgG4_G1FS	1,000000e+00	1,000000000
55	IgG4_G1N	1,000000e+00	1,000000000
56	IgG4_G2	1,000000e+00	1,000000000
57	IgG4_G2FNS	1,000000e+00	1,000000000
58	IgG4_G2FS	1,000000e+00	1,000000000
59	IgG4_G2NS	1,000000e+00	1,000000000
60	IgG4_G2S	1,000000e+00	1,000000000

7.2. Popis aminokiselina

Ala	A	alanin	Leu	L	leucin
Arg	R	arginin	Lys	K	lizin
Asn	N	asparagin	Met	M	metionin
Asp	D	aspartat	Phe	F	fenilalanin
Cys	C	cistein	Pro	P	prolin
Gln	Q	glutamin	Ser	S	serin
Glu	E	glutamat	Thr	T	treonin
Gly	G	glicin	Trp	W	triprofan
His	H	histidin	Tyr	Y	tirozin
Ile	I	izoleucin	Val	V	valin

7.3. Životopis

Ime i prezime: Ante Bubić

Datum i mjesto rođenja: 14. ožujka 1993. u Splitu

Obrazovanje:

2014. – 2016.	Sveučilišni diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: Biokemija i Analitička kemija, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu
2011. – 2014.	Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Kemijsko – tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu
2007. – 2011.	Opća gimnazija, Srednja škola Ivana Lucića-Trogir, Trogir

Sudjelovanja:

2015.	Sudjelovao u organizaciji događaja *Noć istraživača* koja se održala u Zagrebu.
2015. – 2016.	Rad na projektu *Graphene/Aunanotemplates for DNA tetrahedra array* na Institutu za fiziku u Zagrebu. Voditelj projekta: dr. sc. Tomislav Vuletić

Druge potvrde:

- Vozačka dozvola: B kategorija