

Glikozilacija imunoglobulina G u osoba s Downovim sindromom

Cindrić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:978119>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Cindrić

**Glikozilacija imunoglobulina G u osoba s
Downovim sindromom**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Genos d.o.o., pod vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Damjana Franjevića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem prof. Gordanu Laucu na pruženoj prilici i mentorstvu. Također zahvaljujem dr. sc. Jasminki Krišić za svo preneseno znanje i korisne savjete.

Hvala prof. Damjanu Franjeviću na svemu – Vaša je potpora tijekom studija bila od velikog značaja.

Mojoj obitelji, a posebno mami Enisi, tati Ivici i sestri Andrei, hvala na strpljenju i bezuvjetnoj podršci.

Svim mojim prijateljima, a posebno Tei, hvala na druženju, savjetima, putovanjima i svemu ostalom. Proteklih nekoliko godina su zahvaljujući vama bile za pamćenje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G U OSOBA S DOWNOVIM SINDROMOM

Ana Cindrić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glikozilacija je posttranslacijska modifikacija koja utječe na strukturu i funkciju proteina. Promjene u glikozilaciji imunoglobulina G (IgG), važne efektorske molekule imunološkog sustava, usko koreliraju s kronološkom dobi, a uočene su i kod brojnih bolesti. Jedan od simptoma Downovog sindroma je preuranjeno starenje, koje se posebno očituje u promjenama središnjeg živčanog sustava i imunološkog sustava. Cilj istraživanja bio je utvrditi imaju li osobe s Downovim sindromom različit profil glikozilacije IgG-a u odnosu na njihove zdrave vršnjake te, ukoliko imaju, u smislu IgG-a kao biomarkera starenja, ustanoviti očitava li se preuranjeno starenje karakteristično za osobe s Downovim sindromom u njihovom glikolizacijskom profilu IgG-a. Također, zbog prisutnosti treće kopije gena *B3GALT5* u osoba s Downovom sindromom, istraženo je imaju li glikani IgG-a osoba s Downovim sindromom u svom sastavu galaktozu vezanu β -1,3 vezom. Analizom tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti otkriveno je da u osoba s Downovim sindromom postoje značajne razlike u udjelu pojedinih glikana IgG-a u odnosu na zdrave kontrole, te je ustanovljeno da te razlike odražavaju postojanje preuranjenog starenja u osoba s Downovim sindromom. Nadalje, pomoću digestija glikozidazama u osoba s Downovim sindromom unatoč prisutnosti treće kopije gena *B3GALT5* nisu opažene mjerljive količine glikana IgG-a u čijem je sastavu galaktoza vezana β -1,3 vezom.

(42 stranice, 15 slika, 7 tablica, 17 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: glikani, profil glikozilacije, preuranjeno starenje, *B3GALT5*

Voditelj: Prof. dr. sc. Gordan Lauc, prof.

Suvoditelj: Dr. sc. Damjan Franjević, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Damjan Franjević, izv. prof., Prof. dr. sc. Sven Jelaska, prof., Dr. sc. Inga

Marijanović, izv. prof.

Rad prihvaćen: 13.2.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

IMMUNOGLOBULIN G GLYCOSYLATION IN PEOPLE WITH DOWN SYNDROME

Ana Cindrić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Glycosylation is a posttranslational modification that impacts the structure and function of proteins. Changes in immunoglobulin G (IgG) glycosylation correlate to age and the onset of many diseases. An important symptom of Down syndrome (DS) are premature signs of aging, which have notable consequences for the central nervous system and the immune system. The goal of this research was to determine whether people with DS show a different IgG glycan composition to their healthy peers and, if so, using IgG glycans as biomarkers of age, to see if these changes are connected to the symptom of premature aging. Also, due to the presence of a third copy of the *B3GALT5* gene in DS, the existence of β -1,3 linked galactose in DS IgG glycans was researched. Ultra performance liquid chromatography analysis of IgG glycans of people with DS and their healthy peers clarified that there are significant differences in the composition of their IgG glycans, and also that these differences in composition correlate to premature aging. Furthermore, despite the presence of the third copy of the *B3GALT5* gene, the use of glycosidase digestions did not detect measurable quantities of glycans containing β -1,3 linked galactose.

(42 pages, 15 figures, 7 tables, 17 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: glycans, glycoprofile, premature aging, *B3GALT5*

Supervisor: PhD Gordan Lauc, Prof.

Cosupervisor: PhD Damjan Franjević, Assoc. Prof.

Reviewers: PhD Damjan Franjević, Assoc. Prof., PhD Sven Jelaska, Prof., PhD Inga

Marijanović, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 13th 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Glikozilacija	1
1.1.1. Strukture glikana vezanih na proteine	1
1.1.2. Biosinteza glikoproteina	2
1.1.3. Biološka uloga glikozilacije proteina	2
1.2. Imunoglobulin G	3
1.2.1. Glikozilacija imunoglobulina G	4
1.3. Downov sindrom	6
1.3.1. Glikozilacija u Downovom sindromu.....	6
1.4. Cilj istraživanja	7
2. MATERIJALI I METODE	8
2.1. Ispitivana i kontrolna skupina	8
2.2. Izolacija IgG-a	9
2.3. Deglikozilacija IgG-a u otopini	11
2.4. Obilježavanje glikana IgG-a u otopini	12
2.5. Analiza obilježenih glikana IgG-a tekućinskom kromatografijom	13
2.6. Statistička obrada podataka	14
2.7. Digestija egzoglikozidazama	16
2.7.1. Optimizacija uvjeta reakcija na glikanima fetuina	16
2.7.1.1. Digestija obilježenih glikana fetuina sijalidazom	16
2.7.1.2. Pročišćavanje glikana fetuina dobivenih enzimskim digestijama	17
2.7.1.3. Digestija obilježenih glikana fetuina β -1,3 i β -1,4-galaktozidazama.....	17
2.7.1.4. Analiza glikana fetuina tekućinskom kromatografijom	18
2.7.2. Digestije glikana IgG-a egzoglikozidazama	20
3. REZULTATI	21
3.1. Izolacija IgG-a	21
3.2. Usporedba glikozilacije IgG-a osoba s Downovim sindromom s kontrolnom skupinom ...	22
3.3. Enzimska digestija glikana IgG-a β-1,3 i β-1,4 galaktozidazama	30
3.3.1. Optimizacija uvjeta reakcije na glikanima fetuina	30
3.3.2. Enzimске digestije glikana IgG-a ispitivane skupine	31
4. RASPRAVA	35
4.1. Potencijalan utjecaj treće kopije gena <i>B3GALT5</i> na glikozilaciju IgG-a u Downovom sindromu	37
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURA	39
7. PRILOZI	42

KRATICE:

- ACN - acetonitril
- Asn, N – asparagin
- DS – Downov sindrom
- GalNAc – *N*-acetilgalaktozamin
- GlcNAc – *N*-acetilglukozamin
- IgG – imunoglobulin G
- KOR – zdravi pojedinci opće populacije Korčule
- Man – manoza
- ORCA – zdravi pojedinci opće populacije otočja Orkney u Škotskoj
- PCR – eng. *Polymerase Chain Reaction*, lančana reakcija polimerazom
- Ser – serin
- SPL – zdravi pojedinci opće populacije Splita
- Thr – treonin
- UPLC – eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
- VIS – zdravi pojedinci opće populacije Visa

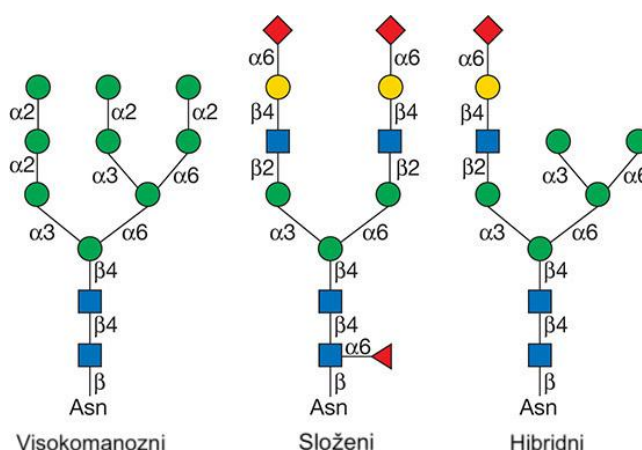
1. UVOD

1.1. Glikozilacija

Glikobiologija, znanost o glikanima, bavi se proučavanjem strukture, biosinteze, degradacije i biološke funkcije kompleksnih ugljikohidratnih struktura koje se nazivaju glikani. Glikozilacija, proces kovalentnog vezanja glikana na supstrat (proteini i masti), je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija proteina koja bitno utječe na njihovu strukturu i funkciju (Varki i sur. 2017).

1.1.1. Strukture glikana vezanih na proteine

Ugljikohidrati vezani na protein najčešće se dijele na dvije skupine: N-glikane i O-glikane. N-glikani eukariota su na polipeptidnu okosnicu vezani glikozidnom vezom između *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) glikana i asparagina (Asn) polipeptida, obično u motivu Asn-X-Ser/Thr. Svi N-glikani imaju zajedničku sržnu strukturu te se mogu podijeliti u tri osnovne skupine: visokomanozni tip, složeni tip i hibridni tip (Slika 1). Na sržnu strukturu visokomanoznog tipa vezane su samo manoze, dok se kod složenog tipa na sržnu strukturu nastavljaju „antene“ koje počinju s GlcNAc-om. Hibridni je tip kombinacija visokomanoznog i složenog tipa glikana, odnosno na jednu antenu ($\text{Man}\alpha 1-6$ ruka) nastavljaju se samo manoze, a na drugu ($\text{Man}\alpha 1-3$ ruka) jedan ili dva GlcNAc-a (Varki i sur. 2017).



Slika 1. Tipovi N-glikana. Kvadrati predstavljaju *N*-acetilglukozamine, zeleni krugovi manoze, žuti krugovi galaktoze, rombovi sijalinske kiseline, a trokut fukozu. (Modificirano iz Varki i sur. 2017)

O-glikani su na hidroksilnu skupinu serina ili treonina polipeptida najčešće vezani preko *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc). Pokazuju veću strukturnu varijabilnost sržne regije te se ne dijele na skupine poput *N*-glikana (Varki i sur. 2017).

1.1.2. Biosinteza glikoproteina

Glikozilacija proteina odvija se s unutarnje strane endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tijela. Donori ugljikohidrata su aktivirani oblici monosaharida (najčešće šećeri vezani na nukleotide, npr. uridin difosfat galaktoza), a sinteza i prijenos glikana na supstrat katalizirani su enzimima koji se zovu glikoziltransferaze. Raznolikost glikana prati velik broj različitih enzima koji pripadaju enzimskoj obitelji glikoziltransferaza. Većini je glikoziltransferaza zajedničko sekvencijalno djelovanje, što znači da je produkt jednog enzima preferencijalni supstrat sljedećeg enzima. Takvim sekvencijalnim djelovanjem glikoziltransferaza nastaju glikoproteini s visoko očuvanim linearnim i/ili razgranatim glikanskim strukturama. Činjenica da se na specifičnim glikozilacijskim mjestima brojnih glikoproteina nalaze predvidive strukture glikana ukazuje na kompleksan mehanizam kontrole sastava glikana. Taj je mehanizam još uvijek pun nepoznanica, međutim dosadašnja saznanja pokazuju na važnost sekvencijalnog djelovanja glikoziltransferaza u mehanizmu kontrole sastava glikana glikoproteina (Varki i sur. 2017).

1.1.3. Biološka uloga glikozilacije proteina

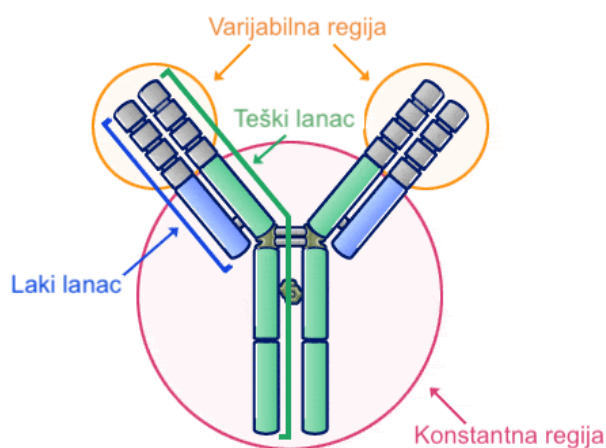
Biološka uloga glikozilacije proteina može se podijeliti na: 1) strukturalnu i modulatornu ulogu i 2) ulogu u specifičnim interakcijama s proteinima koji prepoznaju i vežu glikane. Neovisno o tome koju od navedenih uloga pojedini glikoprotein vrši, posljedice izostanka ili modifikacije glikana vrlo su varijabilne – promijenjena glikozilacija može uzrokovati relativno suptilne, pa čak i neprimjetne promjene, ali isto tako može imati značajan negativan utjecaj na rast, razvoj i preživljavanje organizma. Promjene glikozilacije proteina karakteristične su za brojna ljudska patološka stanja, a u nekim je slučajevima upravo promijenjena glikozilacija identificirana kao glavni uzrok bolesti (Varki i sur. 2017).

Pristupi istraživanju uloge glikozilacije uključuju inhibiciju glikozilacije, modifikacije procesiranja glikana te enzimsku ili kemijsku deglikozilaciju izoliranih glikana. Zbog prethodno opisane varijabilnosti glikana i njihovih raznolikih uloga, u većini je slučajeva teško predvidjeti posljedice manipulacije glikanima te je potencijalnu ulogu glikozilacije ili pojedinog glikana potrebno eksperimentalno odrediti (Varki i sur. 2017).

1.2. Imunoglobulin G

Imunoglobulin G (IgG) jedan je od najzastupljenijih glikoproteina ljudskog seruma te je vrlo važna efektorska molekula imunološkog sustava. Sastoji se od dva teška i dva laka polipeptidna lanca, međusobno vezana disulfidnim vezama. Pola lakih i četvrtina teških lanaca čine antigen-vezujuću varijabilnu regiju, dok ostatak čini konstantnu regiju antitijela (Slika 2) (Janeway i sur. 2001).

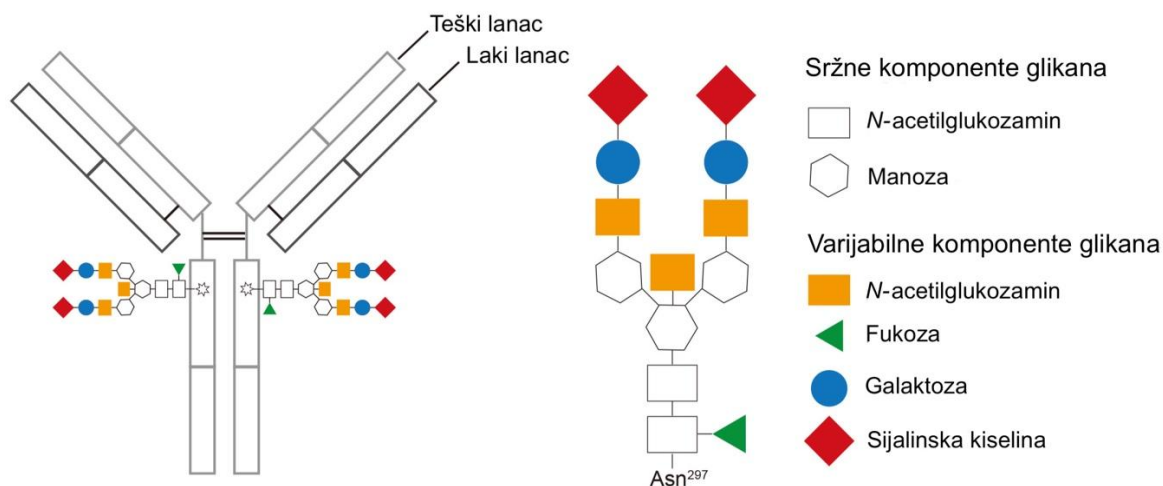
IgG je ključna komponenta humoralne imunosti, te prepoznavanjem i vezanjem brojnih patogena štiti organizam od infekcije. Postoji nekoliko mehanizama kroz koje IgG djeluje, npr. aglutinacija, aktivacija komponenti komplementa, neutralizacija toksina te poticanje stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima. Gotovo svaka promjena IgG-a koja dovodi do djelomične ili potpune inhibicije nekog od nabrojanih mehanizama ima štetne posljedice za organizam (Janeway i sur. 2001).



Slika 2. Shema strukture imunoglobulina G (Modificirano s microbiologyinfo.com 2015).

1.2.1. Glikozilacija imunoglobulina G

Glikoprotein IgG sastoji se od 82-96% proteina i 4-18% ugljikohidrata. Većinski postotak ugljikohidrata IgG-a čine visoko očuvani glikani vezani na specifično glikozilacijsko mjesto N297 teškog lanca IgG-a (Slika 3). Kod nekih je antitijela glikoziliran i određen postotak varijabilne regije (Vidarsson i sur. 2014).



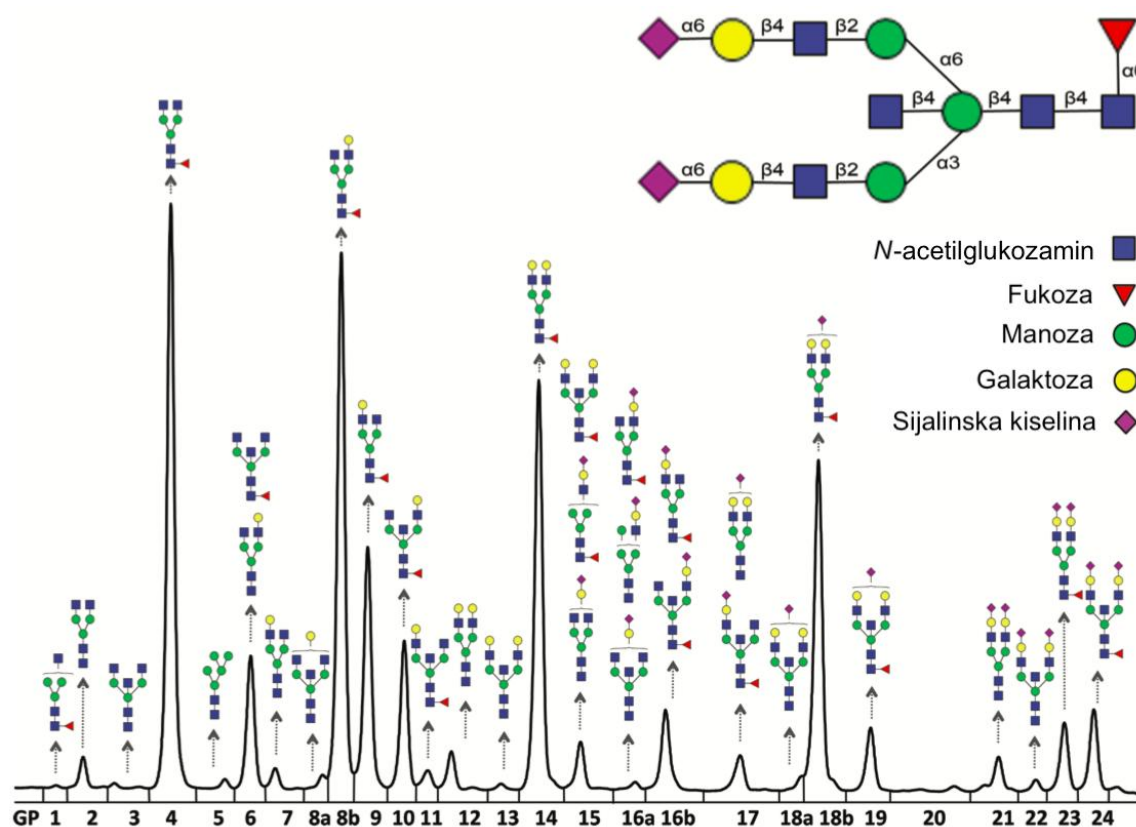
Slika 3. N-glikan na poziciji N297 imunoglobulina G. Shematski prikaz IgG-a s dva vezana N-glikana (lijevo) i prikaz sastava N-glikana (desno) (Modificirano iz Quast i sur. 2016).

Na glikozilacijsko mjesto N297 IgG-a mogu biti vezani različiti glikani. Analiza tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (eng. *Ultra performance liquid chromatography*, UPLC) razdvaja N-glikane vezane na IgG u 24 kromatografska vrška (eng. *glycan peaks*, GP). Udio površine pojedinog kromatografskog vrška odgovara udjelu odgovarajućeg glikana u ukupnom glikomu (ukupnost svih glikana) IgG-a (Slika 4).

Sastav N-glikana vezanih za IgG bitan je za pravilnu funkciju IgG-a. Na primjer, nedostatak sržne fukoze povećava terapijsku efikasnost monoklonskih antitijela omogućavanjem vezanja na receptore bitne za staničnu citotoksičnost ovisnu o antitijelima (Masuda i sur. 2007).

Promjene u glikozilaciji IgG-a povezane su sa starosnom dobi osobe. Pokazano je da tijekom starenja raste udio agalaktoziliranih glikana (glikana bez galaktoze) IgG-a, dok udio galaktoziliranih glikana pada, te da su glikani IgG-a vrlo dobri biomarkeri kronološke i biološke dobi (Krištić i sur. 2014).

Osim sa starosnom dobi osobe, promjene u glikozilaciji IgG-a povezane su i s raznim bolestima. Na primjer, kod autoimune bolesti reumatoidnog artritisa porast udjela agalaktoziliranih glikana IgG-a povezan je s kliničkim parametrima bolesti (npr. s ozbiljnošću bolesti). Udio agalaktoziliranih glikana IgG-a kod reumatoidnog artritisa također može služiti za predviđanje odgovora na terapiju. Također, te se promjene u glikozilaciji karakteristične za bolest javljaju čak i do nekoliko godina prije same bolesti te se stoga potencijalno mogu koristiti za ranije uspostavljanje dijagnoze. Ovo je samo jedan od brojnih primjera potencijalne uporabe N-glikana IgG-a u kliničkom kontekstu (Gudelj i sur. 2018). Budući da se ovo istraživanje fokusira na N-glikane, u daljnjem se tekstu radi jednostavnosti općenitiji pojam „glikani“ odnosi na N-glikane.



Slika 4. UPLC analiza glikana IgG-a. Glikani IgG-a odvojeni u 24 kromatografska vrška, od kojih su svakom pridruženi odgovarajući glikani (Modificirano iz Krištić i sur. 2014).

1.3. Downov sindrom

Downov sindrom, odnosno trisomija 21. kromosoma, uključuje velik broj simptoma, jedan od kojih su preuranjeni znakovi starenja. Oni se očituju u brojnim posljedicama, npr. javljanje problema sa sluhom i vidom te kognitivna deterioracija i demencija u dobi ranijoj od prosjeka (Roizen i Patterson 2003), a nedavno istraživanje ukazuje i na preuranjeno epigenetičko starenje (Horvath i sur. 2015). Dokazano je da je starenje u Downovom sindromu atipično, odnosno da ne zahvaća jednakom mjerom sve organe i tkiva. Od posebnog su značaja središnji živčani sustav te imunološki sustav, čije progresivno slabljenje uzrokuje veću pojavnost infekcija te autoimunih i hematoloških malignih bolesti (Zigman, 2013).

1.3.1. Glikozilacija u Downovom sindromu

Nedavno je otkriveno da se preuranjeno starenje kod Downovog sindroma očituje i u profilu glikozilacije ukupnih proteina plazme. Na primjer, u osoba s Downovim sindromom detektirana je hipogalaktozilacija karakteristična za starenje (Borelli i sur. 2015). Kao što je ranije spomenuto, jedan od proteina plazme čija se glikozilacija dokazano mijenja s dobi je IgG (Krištić i sur. 2014). Ipak, glikozilacija IgG-a u Downovom sindromu dosad nije proučavana.

Među brojnim genima koji se nalaze na 21. kromosomu, a koji se u Downovom sindromu javljaju u tri kopije, nalazi se i *B3GALT5*, gen koji kodira enzim beta-1,3-galaktoziltransferazu 5. Ovaj je enzim zanimljiv u kontekstu istraživanja jer sudjeluje upravo u glikozilaciji. Enzim *B3GALT5* katalizira prijenos galaktoze na *N*-acetilglukozamin, pri čemu galaktozu veže β -1,3 glikozidnom vezom. Iako preferencijalno glikozilira O-glikane i glikolipide, moguće je da kada je prisutan u suvišku sudjeluje i u biosintezi N-glikana (Gardiner i Davisson 2000). Zasad je poznato da glikani IgG-a imaju galaktozu vezanu samo β -1,4 glikozidnom vezom (Pučić i sur. 2011), međutim nije istraženo kakva je glikozilacija IgG-a u osoba s Downovim sindromom, tj. kod pojačane ekspresije galaktoziltransferaze *B3GALT5*.

1.4. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je usporediti profil glikozilacije IgG-a osoba s Downovim sindromom i njihovih zdravih vršnjaka kako bi se odredilo postoje li kod osoba s Downovim sindromom razlike u glikozilaciji IgG-a u odnosu na zdrave kontrole. Nadalje, u kontekstu glikana IgG-a kao biomarkera starenja, cilj je vidjeti očituju li se znakovi preuranjenog starenja karakteristični za osobe s Downovim sindromom i u profilu glikozilacije IgG-a, te ima li glikozilacijski profil IgG-a u osoba s Downovim sindromom neke posebne karakteristike koje nisu uočene kod zdravih pojedinaca iste dobi, te koje se ne očituju ni u glikozilacijskom profilu IgG tijekom starenja u općoj (zdravoj) populaciji.

Enzimski digestija galaktozidazama kojom će se odrediti imaju li glikani IgG-a u osoba s Downovim sindromom galaktozu vezanu β -1,3 glikozidnom vezom služi kako bi se ustanovilo ima li treća kopija gena *B3GALT5* (te time vrlo vjerojatno i veća količina enzima B3GALT5) potencijalnu ulogu u glikozilaciji IgG-a u osoba s Downovim sindromom.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Ispitivana i kontrolna skupina

Ispitivanu skupinu sačinjavalo je 13 osoba s Downovim sindromom poznate dobi i spola (podaci o ispitanicima nalaze se u Tablici 1). Početni materijal bio je krvna plazma osoba s Downovim sindromom prikupljena u Bosni i Hercegovini 2012. godine uz suglasnost svih pojedinaca, odnosno njihovih skrbnika.

Zdravi pojedinci opće populacije Splita sačinjavali su kontrolnu skupinu. Početni materijal kontrola bio je imunoglobulin G (IgG) prethodno izoliran iz krvne plazme. Za svaki je uzorak iz ispitivane skupine, ovisno o dostupnosti, odabrano najmanje pet kontrola istog spola i što sličnije dobi.

Tablica 1. Popis uzoraka ispitivane skupine. Popis uključuje oznake po brojevima korištene radi nepristranosti, spol, godinu rođenja, te dob u trenutku vađenja krvi. Napomena: uzorka 11 nije bilo, a uzorak 8 pripada osobi koja je u trenutku vađenja krvi bila dobi od jedne godine te za taj uzorak nije bila dostupna odgovarajuća kontrola, pa su ti uzorci izbačeni iz daljnje analize.

Oznaka	Spol	Godina rođenja	Dob u trenutku vađenja krvi
1	M	1986.	26
2	M	1974.	38
3	M	1980.	32
4	M	1972.	40
5	Ž	1971.	41
6	M	1965.	47
7	Ž	1971.	41
9	M	1995.	17
10	M	1990.	22
12	M	1975.	37
13	M	1993.	19
14	Ž	1995.	17
15	Ž	1995.	17

2.2. Izolacija IgG-a

Budući da za kontrolne uzorke početni materijal nije bio krvna plazma, nego već izolirani protein IgG, izolacija IgG-a provedena je samo na uzorcima iz ispitivane skupine.

Prilikom izolacije IgG-a korišteni su sljedeći puferi:

- Pufer za nanošenje uzorka: 1× PBS (Merck, Njemačka), pH 7,4
- Neutralizacijski pufer: 10× PBS (Merck, Njemačka), pH 6,6-6,8
- Pufer za eluciju: 0,1 M mravlja kiselina (Merck, Njemačka), pH 2,5
- Pufer za neutralizaciju eluata: 1 M amonijev bikarbonat (Merck, Njemačka)
- Pufer za pohranu Protein G pločice: 20% (v/v) etanol (Honeywell, SAD) u 20 mM Tris-u (Thermo Fisher Scientific, SAD) + 0,1 M NaCl (Merck, Njemačka), pH 7,4

Pri svakom radu s plazmom korišteni su nastavci za mikropipetu s filterom, a sve površine koje su došle u dodir s mikrotubicama koje su sadržavale plazmu su nakon postupka prebrisane 70% etanolom.

Protein G pločica (BIA Separations, Slovenija) služi za izolaciju IgG-a na principu afinitetne kromatografije. Pločica ima 96 jažica u kojima se nalazi monolit koji predstavlja stacionarnu fazu. Na monolit je vezan protein G koji veže konstantni dio antitijela te na taj način razdvaja IgG od ostalih proteina plazme.

Prije postupka izolacije Protein G pločica i svi prethodno nabrojani puferi stavljeni su na sobnu temperaturu na 30 min. Odmrznuti uzorci plazme vorteksirani su i centrifugirani 3 min pri 12 045× g (MiniSpin Centrifuge, Eppendorf, Njemačka). IgG je izoliran iz 90 µl standardnih uzoraka plazme (standardni uzorak plazme čine objedinjeni uzorci plazme više zdravih pojedinaca, a služe kao pozitivna kontrola te za kontrolu preciznosti korištene metode) i iz 70 µl uzoraka plazme osoba s Downovim sindromom. Raspored uzoraka i standarada na Protein G pločici napravljen je randomizacijom u programu Microsoft Excel 2016 (verzija 15. 13.3, Microsoft, SAD) (Slika 5).

Plazma je razrijeđena sa 700 µl 1× PBS-a, pa prebačena u čistu pločicu za filtraciju s porama promjera 0,45 µm (1 ml AcroPrep GHP 0,45 µm, Pall Corporation, SAD). Plazma je pomoću vakuum uređaja za pločice (Pall Corporation, SAD) sakupljena u čistu pločicu s 96 jažica zapremnine 2 ml, pri čemu je tlak vakuuma bio maksimalan. Pločica s uzorcima ostavljena je na miješalici (GFL, Njemačka) do ponovne upotrebe, odnosno dok Protein G pločica nije bila spremna za nanošenje uzoraka.

	1	2	3	4
A	7	1_D	STAND_2	10
B	STAND_3	10_D	STAND_1	14_D
C	9	STAND_4	15_D	BLANK_2
D	4_D	5_D	12_D	6
E	12	1	5	9_D
F	3_D	4	STAND_5	2
G	7_D	6_D	13_D	13
H	BLANK_1	14	15	3

Slika 5. Prikaz rasporeda uzoraka na protein G pločici prilikom izolacije IgG-a iz krvne plazme. Brojevi predstavljaju oznake uzoraka, „broj_D“ označava duplikat pojedinog uzorka, STAND označava standardni uzorak plazme, a BLANK označava negativnu kontrolu (jažice u koje nije dodan uzorak). Napomena: 2_D nije prisutan u tablici jer u tom uzorku nije bilo dovoljno krvne plazme za duplikat, pa je umjesto duplikata dodana još jedna negativna kontrola tj. BLANK.

Protein G pločica prvo je pripravljena za izolaciju. Pufer za pohranu Protein G pločice uklonjen je primjenom vakuuma. Svaka jažica pločice isprana je s 2 ml ultra čiste vode (Milli-Q, Millipore Corporation), zatim s 2 ml 1× PBS-a i 1 ml 0,1 M mravlje kiseline. Jažice su neutralizirane s 2 ml 10× PBS-a te pripravljene za nanošenje uzoraka ispiranjem s 4 ml 1× PBS-a. Tijekom pripreme Protein G pločice maksimalni tlak vakuuma iznosio je do 17 inHg.

Zatim je provedeno nanošenje uzoraka i ispiranje Protein G pločice. Profiltrirana plazma je s miješalice prebačena u Protein G pločicu. Prolazak plazme kroz Protein G pločicu omogućen je primjenom vakuuma, čiji je maksimalni tlak iznosio do 10 inHg. Jažice Protein G pločice isprane su sa 6 ml 1× PBS-a, pri čemu je maksimalni tlak vakuuma iznosio do 17 inHg.

Nakon toga je provedena elucija. U cijelu čistu pločicu s 96 jažica zapremnine 2 ml dodano je 170 µl neutralizacijskog pufera, nakon čega je na nju stavljena Protein G pločica. IgG je eluiran s 1 ml pufera za eluciju te je pomoću vakuuma skupljen u pločicu s neutralizacijskim puferom. Uzorci su resuspendirani mikropipetom, a pločica je pokrivena aluminijskom folijom i ostavljena na miješalici do mjerenja koncentracije izoliranog IgG-a. Tijekom elucije maksimalni tlak vakuuma iznosio je do 10 inHg.

Slijedila je regeneracija i pohrana Protein G pločice, pri čemu je maksimalni tlak vakuuma iznosio do 17 inHg. Svaka jažica Protein G pločice isprana je s 2 ml pufera za

eluaciju, 2 ml neutralizacijskog pufera, 4 ml pufera za nanošenje uzorka i 1 ml pufera za pohranu Protein G pločice. U jažice je dodan 1 ml pufera za pohranu Protein G pločice, nakon čega je Protein G pločica pohranjena na 4°C.

Koncentracija izoliranog IgG-a izmjerena je pomoću spektrofotometra (NanoDrop 8000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, SAD), pri čemu je korišten program ND-8000 v2.2.1 (Thermo Fisher Scientific, SAD).

U svrhu kasnije analize glikana IgG-a, u pločicu s 96 jažica zapremnine 1 ml alikvotirano je po 300 µl eluata IgG-a uzoraka iz ispitivane i kontrolne skupine. Eluati IgG-a osušeni su pomoću vakuum centrifuge (Thermo Scientific Savant SpeedVac® System, Thermo Fisher Scientific, SAD) i pohranjeni na -20°C do deglikozilacije.

U svrhu provjere kvalitete izolata IgG-a provedena je SDS-elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Analiziran je nasumično odabran dio uzoraka. Uzorci su pripremljeni miješanjem 10 µl uzorka s 5 µl 3× koncentriranog pufera za nanošenje uzorka (7,6 g/L Tris (Thermo Fisher Scientific, SAD), 23 g/L SDS (Merck, Njemačka), 0,5 g/L bromfenol plavo (Thermo Fisher Scientific, SAD), u 10% glicerolu (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska), pH 6,8), nakon čega je slijedila inkubacija od 5 min pri 95°C uz miješanje (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka).

Elektroforeza je provedena na 200 V, 35 min. Korišten je uređaj NuPAGE SureLock Mini cell system (Thermo Fisher Scientific, SAD). Komercijalni gel (NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 4-12%, 1 mm, 12 jažica, Thermo Fisher Scientific, SAD) je nakon elektroforeze tri puta ispran Milli-Q vodom uz miješanje. Svako je ispiranje trajalo 5 min. Gel je bojan bojom Gel Code Blue Safe Protein Stain (Thermo Fisher Scientific, SAD) 1h uz miješanje. Nakon bojanja gel je ispran malom količinom Milli-Q vode te stavljen na odbojavanje u 150 ml Milli-Q vode na 3h uz miješanje.

2.3. Deglikozilacija IgG-a u otopini

Pločica s osušanim eluatima IgG-a odmrznuta je te je svaki uzorak pomoću mikropipete resuspendiran u 30 µl 1,33% SDS-a. Uzorci su zatim inkubirani 10 min na temperaturi od 65°C, nakon čega su 30 min ostavljeni na sobnoj temperaturi. Svakom je uzorku dodano 10 µl 4% Igepala (Merck, Njemačka) uz resuspendiranje mikropipetom. Pločica je zatim stavljena na miješalicu na 15 min.

Otopina enzima pripremljena je miješanjem 10 µl 5× PBS-a s 1,2 enzimske jedinice (eng. *Unit*) PNGase F (Promega Corporation, SAD) po uzorku. U svaki je uzorak dodano 9,8 µl

otopine enzima uz resuspendiranje mikropipetom. Uzorci su inkubirani na 37°C u trajanju od 18h.

2.4. Obilježavanje glikana IgG-a u otopini

Otopina za obilježavanje glikana za jedan uzorak sadržavala je:

- 25 µl 30% octene kiseline (Honeywell, SAD) u DMSO-u (Merck, Njemačka)
- 0,48 mg 2-aminobenzamida (2-AB, Merck, Njemačka)
- 1,12 mg 2-pikolin borana (PB, Merck, Njemačka)

Za cijelu je pločicu pripremljeno ukupno 3 ml otopine za obilježavanje glikana. Smjesa DMSO-a i octene kiseline dodana je u falcon tubicu s prethodno izvaganih 57,6 mg 2-AB-a. Tubica je vorteksirana dok se 2-AB nije otopio i njen je sadržaj prebačen u falcon tubicu s prethodno izvaganih 134,4 mg PB-a. Otopina je vorteksirana dok nije postala homogena.

Postupak obilježavanja uzoraka proveden je u digestoru. Svakom je uzorku dodano 25 µl otopine za obilježavanje glikana uz resuspendiranje mikropipetom te je pločica pokrivena samoljepljivom prozirnom folijom. Pločica je nakon 10 min miješanja stavljena na 65°C na 2h. Po završetku inkubacije uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 min.

Prije analize glikana tekućinskom kromatografijom, fluorescentno obilježene glikane je potrebno pročistiti od viška fluorescentne boje i suviška reagensa. Za pročišćavanje je korištena GHP pločica (1 ml AcroPrep GHP pločica za filtraciju, pore promjera 0,2 µm, Pall Corporation, SAD) koja je prvo je pripremljena za pročišćavanje, tijekom čega je maksimalan tlak vakuuma iznosio 2 inHg. Svaka jažica GHP pločice isprana je s 200 µl 70% etanola, zatim s 200 µl Milli-Q vode, te na kraju s 200 µl 96% acetonitrila (ACN, Honeywell) ohlađenog na 4°C. GHP pločica tada je bila spremna za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana.

Svakom je uzorku dodano 700 µl 100% ACN-a ohlađenog na 4°C uz resuspendiranje mikropipetom te je korištenjem istih nastavaka čitav volumen svakog uzorka pažljivo prenesen u odgovarajuće jažice GHP pločice. Uzorci su u dodanom ACN-u inkubirani 2 min, nakon čega je tekuća faza iz jažica uklonjena primjenom vakuuma.

Uzorci su zatim očišćeni od suviška otopine za obilježavanje glikana ispiranjem pet puta s po 200 µl 96% ACN-a ohlađenog na 4°C. U prva četiri ispiranja ACN je uklonjen primjenom vakuuma, a nakon dodavanja zadnjeg volumena ACN-a GHP pločica je stavljena na stalak te je ACN uklonjen centrifugiranjem 5 min pri 164× g (Eppendorf Centrifuge 5804, Eppendorf, Njemačka).

Nakon pročišćavanja uzoraka glikana od suviška boje i reagensa provedena je elucija glikana. GHP pločica stavljena je na čistu pločicu za PCR (ABgene, Thermo Fisher Scientific, SAD) te je u svaki uzorak dodano 90 µl Milli-Q vode. Spojene pločice su stavljene na miješalicu na 15 min te su zatim centrifugirane 5 min pri 164× g kako bi se u pločicu za PCR sakupila prva frakcija eluata. Postupak je ponovljen s još 90 µl Milli-Q vode, te se u pločici za PCR na kraju nalazilo 180 µl eluata obilježenih glikana IgG-a. Pločica za PCR pohranjena je na -20°C do analize kromatografijom.

2.5. Analiza obilježenih glikana IgG-a tekućinskom kromatografijom

Provedena je analiza tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC).

Za analizu je korišten Waters Acquity UPLC H class stroj (Waters, SAD) koji se sastoji od četiri dijela: Quarternary Solvent Manager, Sample Manager, FLR Detector i Column Manager.

Svi su uzorci osim vode pripremljeni za analizu miješanjem obilježenih glikana sa 100% ACN-om (Honeywell, SAD) u omjeru 1:4.

Priprema uzoraka za analizu tekućinskom kromatografijom napravljena je na sljedeći način:

- Uzorci: 10 µl eluata obilježenih glikana + 40 µl ACN-a
- Dekstran: 4 µl dekstrana + 16 µl ACN-a
- Standard IgG-a: 16 µl standarda IgG-a + 64 µl ACN-a
- Voda: 100 µl Milli-Q vode

Svi su uzorci pripremljeni u vijalama. Injektirano je 40 µl uzoraka, 30 µl standarda plazme, 5 µl dekstrana i 10 µl Milli-Q vode.

Otapala korištena za analizu glikana tekućinskom kromatografijom bila su:

- Otapalo A: 100 mM amonijev formijat (Merck, Njemačka), pH 4,4
- Otapalo B: 100% acetonitril (ACN, za LC-MS, Honeywell, SAD)
- Otapalo C i D: 20% acetonitril (20% ACN, za HPLC, Honeywell, SAD)

Početni uvjeti za analizu glikana tekućinskom kromatografijom bili su:

- Protok: 0,4 ml/min
- Udio otapala: A: 25%, B: 75%
- Temperatura kolone: 60°C
- Temperatura uzoraka: 10°C

Za razdvajanje IgG glikana korištena je kolona Acquity UPLC BEH Glycan (Waters, SAD) duljine 100 mm i unutarnjeg promjera 2,1 mm te veličine čestica 1,7 μm .

Postavljanje i mijenjanje uvjeta analize te kasnija integracija dobivenih kromatograma provedeni su u programu Empower 3 (v3471, Waters, SAD).

Prije početka glikoprofiliranja uvjeti su postavljeni na početne, a protok je postepeno dizan za 0,1 ml/min. Razlika maksimalnog i minimalnog tlaka je prije svakog dizanja protoka bila manja od 10 psi.

Razdvajanje pojedinog uzorka trajalo je do 27. minute. Tijekom razdvajanja protok je bio stalan (0,4 ml/min), dok se omjer otapala postepeno mijenjao uz linearni gradijent, tako da je na kraju udio otapala A bio 38%, a otapala B 62% (početni uvjeti bili su 25% otapala A i 75% otapala B). U 28. minuti udio otapala A povišen je na 100%, a nakon toga uvjeti su vraćeni na početne.

Kao otapalo za ispiranje kromatografskog sustava (eng. seal wash) korišten je 20% acetonitril.

Valna duljina ekscitacije detektora iznosila je 250 nm, a valna duljina emisije detektora iznosila je 428 nm.

Dobiveni kromatogrami obrađeni su automatskom integracijom koja je za svaki uzorak ručno doradena. Podaci o udjelu površine pojedinog kromatografskog vrška uneseni su u Microsoft Excel 2016 (verzija 15.13.3, Microsoft, SAD).

2.6. Statistička obrada podataka

Vrijednosti udjela površine svakog kromatografskog vrška uprosječene su za uzorke u analizirane duplikatu. Uzorcima iz ispitivane skupine pridružene su odgovarajuće kontrole. Od prosječnih vrijednosti udjela površine kromatografskih vršaka uzoraka oduzete su prosječne vrijednosti odgovarajućih kontrola. Za svaki je kromatografski vršak T-testom ustanovljeno razlikuje li se udio njegove površine značajno između ispitivane i kontrolne skupine. Napravljena je i korekcija na broj T-testova množenjem dobivene p-vrijednosti s brojem provedenih T-testova. Značajnom razlikom smatrana je ona čija je p-vrijednost nakon korekcije iznosila manje od 0,05 te su udjeli površine kromatografskih vršaka koji su se pokazali značajno različitim između ispitivane i kontrolne skupine prikazani grafički. Za sve analizirane uzorke izračunata su derivirana svojstva (Tablica 2). Derivirana svojstva opisuju svojstva glikana koja su zajednička obilježja više različitih pojedinačnih glikana IgGa, poput sijalinizacije (prisutnosti sijalinske kiseline), fukozilacije (prisutnosti sržne fukoze), prisutnosti račvujućeg GlcNAc-a itd. Za svako derivirano svojstvo je T-testom ustanovljeno

razlikuje li se značajno između ispitivane i kontrolne skupine. Napravljena je korekcija na broj T-testova.

Osim zdravih pojedinaca opće populacije Splita (SPL), uvedene su još tri kontrolne skupine – zdravi pojedinci opće populacije Korčule (KOR), Visa (VIS) i otočja Orkney u Škotskoj (ORCA). Vrijednosti udjela površine kromatografskih vršaka kontrolnih skupina KOR, VIS i ORCA poznate su otprije (Pučić i sur. 2011, Krištić i sur. 2014). Svakom je uzorku ispitivane skupine pridruženo u prosjeku 7 kontrola iz svake kontrolne skupine. Unutar svake skupine od po 7 izabranih kontrola po uzorku iz ispitivane skupine izračunate su srednje vrijednosti udjela površina za svaki pojedini kromatografski vršak.

Za svaki kromatografski vršak čiji se udio površine pokazao značajno različitim između ispitivane i kontrolne skupine (SPL), kao i za svako derivirano svojstvo koje se pokazalo značajno različitim između ispitivane i kontrolne skupine (SPL), napravljen je grafički prikaz u kojem je ispitivana skupina uspoređena sa sve četiri kontrolne skupine.

Tablica 2. Derivirana svojstva. Navedena su derivirana svojstva te im je pridružen opis i način računanja. GP predstavlja udio površine pojedinog kromatografskog vrška, a N predstavlja ukupan broj kromatografskih vršaka.

Derivirano svojstvo	Opis deriviranog svojstva	Način računanja deriviranog svojstva
G0	Udio agalaktoziliranih glikana u ukupnom glikomu IgG-a	$(GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP6) / N * 100$
G1	Udio monogalaktoziliranih glikana u ukupnom glikomu IgG-a	$(GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11) / N * 100$
G2	Udio digalaktoziliranih glikana u ukupnom glikomu IgG-a	$(GP12 + GP13 + GP14 + GP15) / N * 100$
S	Udio mono- i disijaliniziranih glikana u ukupnom glikomu IgG-a	$(GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24) / N * 100$
F	Udio glikana koji sadrže sržnu fukožu u ukupnom glikomu IgG-a	$(GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24) / N * 100$
B	Udio glikana s račvujućim GlcNAc u ukupnom glikomu IgG-a	$(GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24) / N * 100$

2.7. Digestija egzoglikozidazama

2.7.1. Optimizacija uvjeta reakcija na glikanima fetuina

Prije provedbe eksperimenta na glikanima IgG-a enzimi su testirani na glikanima fetuina (liofilizirani fetuin iz fetalnog goveđeg seruma, Merck, Njemačka) kako bi se odredilo u kojim se uvjetima reakcije postiže najefikasnija digestija. Glikani fetuina odabrani su jer je fetuin protein s dobro okarakteriziranim glikozilacijskim profilom te je poznato da ima galaktozu vezanu i β -1,3 i β -1,4 glikozidnom vezom (Green i sur. 1988).

2.7.1.1. Digestija obilježenih glikana fetuina sijalidazom

Sastav reakcijskih smjesa naveden je u Tablici 3. Kao početni materijal korišteni su alikvotifluorescentno obilježeni slobodnih glikana fetuina ukupnog volumena 180 μ l, a koji su dobiveni deglikozilacijom 300 μ g fetuina djelovanjem 5 enzimskih jedinica PNGaze F (Promega Corporation, SAD). Korištena je sijalidaza α 2-3,6,8,9 Neuraminidaza A (P0722L, New England Biolabs Inc., SAD) uz odgovarajući pufer (GlycoBuffer 1, 10 \times , B1727L, New England Biolabs Inc., SAD). Tubice u kojima su postavljene reakcije vorteksirane su i stavljene na 37°C preko noći.

Tablica 3. Digestija glikana fetuina sijalidazom – sastav reakcijskih smjesa. F2_Sia i F4_Sia su uzorci u koje je dodan enzim, a CTRL_F2_Sia i CTRL_F4_Sia su kontrole u koje je umjesto enzima dodan odgovarajući volumen Milli-Q vode. Uzorci F2_Sia i F4_Sia napravljeni su u duplikatima.

Uzorak	F2_Sia	F4_Sia	CTRL_F2_Sia	CTRL_F4_Sia
Glikani fetuina	6 μ l	6 μ l	6 μ l	6 μ l
Pufer	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Sijalidaza	40 jedinica (2 μ l)	80 jedinica (4 μ l)	/	/
Milli-Q voda	3 μ l	3 μ l	5 μ l	7 μ l
Ukupan volumen	12 μ l	14 μ l	12 μ l	14 μ l

2.7.1.2. Pročišćavanje glikana fetuina dobivenih enzimskim digestijama

Korištena je pločica za filtriranje s 96 jažica s porama koje propuštaju samo molekule manje molekularne mase od 10 kDa (AcroPrepTM Advance, 10K Omega, Pall Corporation, SAD). Postupak pročišćavanja proveden je uz maksimalni tlak vakuuma.

U svrhu pripreme pločice za pročišćavanje jažice su isprane s po 200 μ l Milli-Q vode. U svaku je tubicu s uzorkom dodano po 20 μ l Milli-Q vode te je sadržaj promiješan resuspendiranjem pomoću mikropipete, nakon čega je prebačen u pločicu za filtriranje. Uzorci su iz jažica skupljeni u čistu pločicu za PCR (ABgene, Thermo Fisher Scientific, SAD) uz pomoć vakuuma. Zatim je u svaku tubicu dodano još po 20 μ l Milli-Q vode te je sadržaj prebačen u istu 10K pločicu i zatim skupljen pomoću vakuuma u PCR pločicu. Konačni volumen glikana u svakoj jažici PCR pločice nakon pročišćavanja iznosio je ~45 μ l. PCR pločica s uzorcima zaleđena je do analize kromatografijom. Opisani postupak pročišćavanja proveden je nakon svake digestije.

2.7.1.3. Digestija obilježenih glikana fetuina β -1,3 i β -1,4-galaktozidazama

Sastav reakcijskih smjesa naveden je u Tablicama 4 i 5. Kao početni materijal korišteni su fluorescentno obilježeni slobodni glikani fetuina prethodno tretirani sijalidazom. Korištena je β -1,3-galaktozidaza (P0726S, New England Biolabs Inc., SAD) uz odgovarajući pufer (GlycoBuffer 1, 10 \times , B1727S, New England Biolabs Inc., SAD) i albumin goveđeg seruma (BSA 100 \times , B9001S, New England Biolabs Inc., SAD), te β -1,4-galaktozidaza (P0745S, New England Biolabs Inc., SAD) uz isti pufer. Tubice u kojima su postavljene reakcije vorteksirane su i stavljene na 37°C preko noći. Nakon digestije slijedilo je pročišćavanje glikana fetuina opisano u poglavlju 2.6.2.

Tablica 4. Digestija glikana fetuina β -1,3-galaktozidazom – sastav reakcijskih smjesa.

F16_B13 i F8_B13 su uzorci u koje je dodan enzim, a CTRL_F16_B13 i CTRL_F8_B13 su kontrole u koje je umjesto enzima dodan odgovarajući volumen Milli-Q vode.

Uzorak	F16_B13	F8_B13	CTRL_F16_B13	CTRL_F8_B13
Glikani fetuina	16 μ l	8 μ l	16 μ l	8 μ l
Pufer	2 μ l	1 μ l	2 μ l	1 μ l
BSA	2 μ l	1 μ l	2 μ l	1 μ l
Milli-Q voda	/	/	2 μ l	2 μ l
β -1,3-galaktozidaza	20 jedinica (2 μ l)	20 jedinica (2 μ l)	/	/
Ukupan volumen	22 μ l	12 μ l	22 μ l	12 μ l

Tablica 5. Digestija glikana fetuina β -1,4-galaktozidazom – sastav reakcijskih smjesa.

F18_B14 i F9_B14 su uzorci u koje je dodan enzim, a CTRL_F18_B14 i CTRL_F9_B14 su kontrole u koje je umjesto enzima dodan odgovarajući volumen Milli-Q vode.

Uzorak	F18_B14	F9_B14	CTRL_F18_B14	CTRL_F9_B14
Glikani fetuina	18 μ l	9 μ l	18 μ l	9 μ l
Pufer	2 μ l	1 μ l	2 μ l	1 μ l
Milli-Q voda	/	/	2 μ l	2 μ l
β -1,4-galaktozidaza	16 jedinica (2 μ l)	16 jedinica (2 μ l)	/	/
Ukupan volumen	22 μ l	12 μ l	22 μ l	12 μ l

2.7.1.4. Analiza glikana fetuina tekućinskom kromatografijom

Nakon svake enzimske digestije svaki je od uzoraka podvrgnut UPLC analizi. UPLC uređaj koji je korišten za analizu opisan je u poglavlju 2.5.

Svi su uzorci osim vode pripremljeni za analizu miješanjem obilježenih glikana sa 100% ACN-om u omjeru 1:3.

Priprema uzoraka za analizu tekućinskom kromatografiju napravljena je na sljedeći način:

- Uzorci: 15 μ l eluata obilježenih glikana + 45 μ l ACN-a
- Dekstran: 5 μ l dekstrana + 15 μ l ACN-a
- Standard plazme: 10 μ l standarda plazme + 30 μ l ACN-a
- Voda: 100 μ l Milli-Q vode

Svi su uzorci pripremljeni u vijalama. Injektirano je 40 μ l uzoraka, 20 μ l standarda plazme, 5 μ l dekstrana i 10 μ l Milli-Q vode.

Otapala koja su korištena za analizu tekućinskom kromatografijom opisana su u poglavlju 2.5.

Početni uvjeti za analizu glikana fetuina tekućinskom kromatografijom bili su:

- Protok: 0,561 ml/min
- Udio otapala: A: 30%, B: 70%
- Temperatura kolone: 25°C
- Temperatura uzoraka: 10°C

Za razdvajanje glikana fetuina korištena je kolona Acquity UPLC BEH Glycan (Waters, SAD) duljine 150 mm i unutarnjeg promjera 2,1 mm te veličine čestica 1,7 μ m.

Postavljanje i mijenjanje uvjeta analize te kasnija integracija dobivenih kromatograma provedeni su u programu Empower 3 (v3471, Waters, SAD).

Prije početka glikoprofiliranja uvjeti su postavljeni na početne, a protok je postepeno dizan za 0,1 ml/min. Razlika maksimalnog i minimalnog tlaka je prije svakog dizanja protoka bila manja od 10 psi.

Razdvajanje pojedinog uzorka trajalo je 24.81 minuta. Tijekom razdvajanja protok je bio stalan (0,4 ml/min), dok se omjer otapala postepeno mijenjao uz linearni gradijent, tako da je na kraju udio otapala A bio 47%, a otapala B 53% (početni uvjeti bili su 30% otapala A i 70% otapala B). U 25,50. minuti protok je smanjen s 0,561 ml/min na 0,25 ml/min, a udio otapala A povišen je na 100%. U 29. minuti udjeli otapala vraćeni su na početne (A: 30%, B: 70%), a u 32,50. minuti protok je ponovno povišen na 0,561 ml/min.

Kao otapalo za ispiranje kromatografskog sustava (eng. seal wash) korišten je 20% acetonitril.

Valna duljina ekscitacije detektora iznosila je 250 nm, a valna duljina emisije detektora iznosila je 428 nm.

Dobiveni kromatogrami uspoređeni su međusobnim preklapanjem i obrađeni automatskom integracijom koja je za svaki uzorak ručno doradana. Podaci o udjelu površine pojedinog kromatografskog vrška uneseni su u Microsoft Excel 2016 (verzija 15.13.3, Microsoft, SAD). Izračunati su udjeli površine svakog kromatografskog vrška uzoraka kao postotak od ukupne površine svih kromatografskih vršaka prisutnih u kromatogramu te su udjeli površine svakog kromatografskog vrška uspoređeni s drugim uzorcima i kontrolama kako bi se odredila efikasnost digestije.

2.7.2. Digestije glikana IgG-a egzoglikozidazama

Budući da su uvjeti enzimske reakcije optimizirani na glikanima fetuina, sve su digestije glikana IgG-a provedene na isti način kao i digestije glikana fetuina, opisane u poglavlju 2.7. (Tablice 3, 4 i 5). Svakoj je digestiji glikana IgG-a osim negativne kontrole u koju je umjesto enzima dodan odgovarajući volumen Milli-Q vode dodana i kontrola digestije u koju je umjesto glikana IgG-a dodan isti volumen glikana fetuina.

Osim istih digestija koje su provedene na glikanima fetuina, na glikanima IgG uzoraka prethodno tretiranih sialidazom i β -1,4-galaktozidazom provedena je i digestija β -1,3-galaktozidazom. Korišteni su isti volumeni, enzimi i puferi navedeni u poglavlju 2.7.1.3. te u Tablici 4.

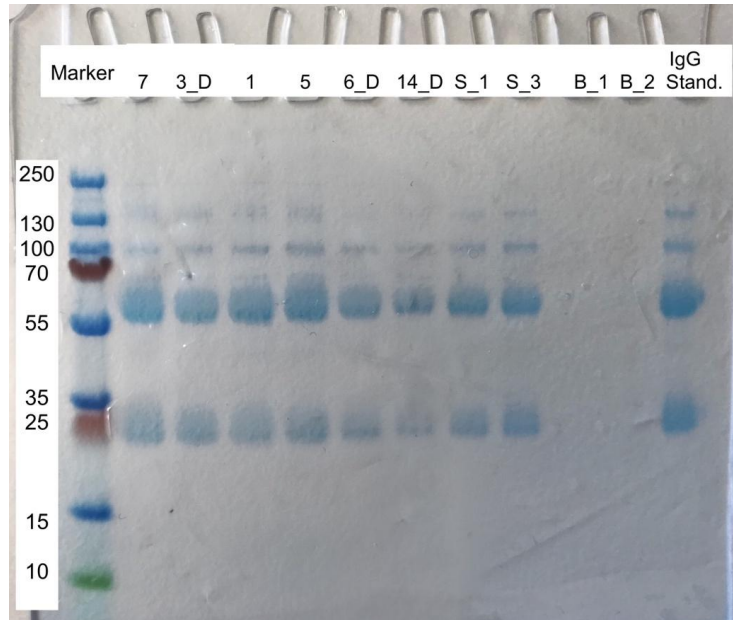
Pročišćavanje glikana IgG-a dobivenih enzimskim digestijama jednako je onom opisanom u poglavlju 2.7.1.2.

Analiza pročišćenih glikana IgG-a kromatografijom provedena je na isti način kao ona opisana u poglavlju 2.5., osim obrade podataka dobivenih analizom, koja je bila ista kao ona opisana u poglavlju 2.7.1.4.

3. REZULTATI

3.1. Izolacija IgG-a

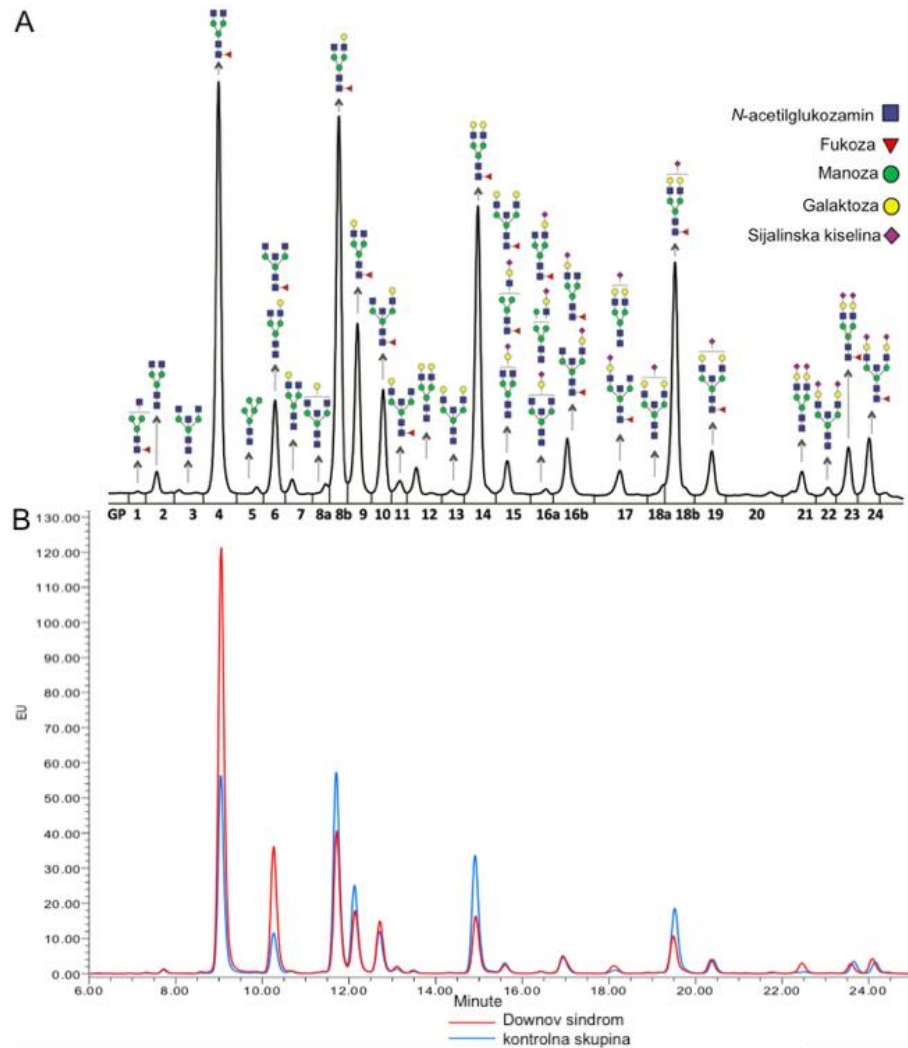
IgG je uspješno izoliran iz uzoraka plazme osoba s Downovim sindromom (Slika 6). Koncentracija izoliranog IgG-a je u prosjeku iznosila 0,62 mg/ml.



Slika 6. Gel nakon SDS-PAGE. Označene su molekularne mase markera (u kDa) te se iznad svake jažice nalazi oznaka odgovarajućeg uzorka. U jažicama 7 – 14_D nalazi se IgG izoliran iz krvne plazme osoba s Downovim sindromom. U svim su spomenutim jažicama dvije vrpce jakog intenziteta, jedna mase približno 55 kDa, druga približno 25 kDa, što odgovara molekularnim masama teškog i lakog lanca IgG-a. Vrpce slabijeg intenziteta i veće molekularne mase u ovim jažicama predstavljaju oblike nepotpuno reduciranog IgG-a. S_1 i S_3 su standardi IgG-a koji služe kao provjera uspješnosti izolacije. B_1 i B_2 su kontrole u koje nije dodan uzorak. U ovim jažicama nema dovoljno proteina da bi se mogao detektirati korištenom metodom, što potvrđuje da nije došlo do kontaminacije. U zadnjoj se jažici nalazi standardni uzorak prethodno izoliranog IgG-a koji služi kao provjera kvalitete metode elektroforeze. Budući da izgled jažica S_1, S_3 i IgG Stand. odgovara izgledu jažica 7 – 14_D može se zaključiti da su elektroforeza i izolacija IgG-a iz uzoraka ispitivane skupine bile uspješne.

3.2. Usporedba glikozilacije IgG-a osoba s Downovim sindromom s kontrolnom skupinom

Provedena je UPLC analiza glikana IgG-a u svrhu usporedbe profila glikozilacije IgG-a kontrolne (SPL) i ispitivane skupine (Downov sindrom) (Slika 7) te je nakon integracije napravljena statistička obrada podataka (Tablica 6).



Slika 7. UPLC analiza glikana IgG-a. A: fluorescentno obilježeni glikani IgG-a preuzeti i modificirani iz Krištić i sur. 2014. B: usporedba fluorescentno obilježenih glikana IgG-a ispitivane (Downov sindrom, crvena linija) i kontrolne skupine (plava linija).

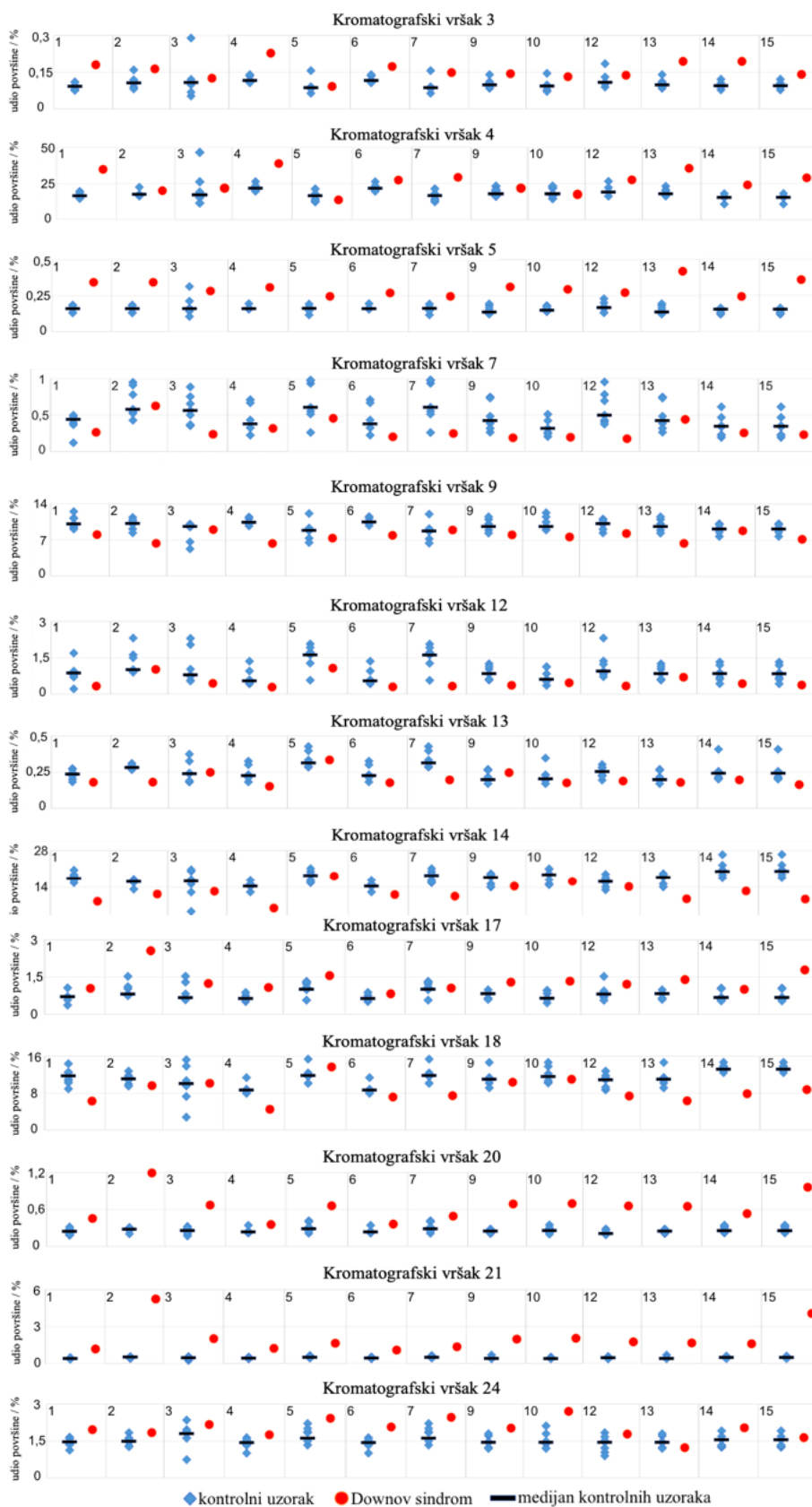
Tablica 6. Srednja vrijednost udjela površine svih kromatografskih vršaka uzoraka ispitivane (Downov sindrom, DS) i kontrolne (SPL) skupine i njihova razlika (DS – SPL), te p-vrijednost dobivena T-testom i korigirana na broj provedenih T-testova. Ispitivana skupina sastoji se od 13 uzoraka, svakom od kojih je pridruženo u prosjeku 7 kontrolnih uzoraka. Statistički značajne razlike ($p < 0.05$) između ispitivane i kontrolne skupine označene su podebljanim brojevima („boldom“).

Kromatografski vršak	DS / %	SPL / %	DS -SPL / %	Korigirana p-vrijednost
1	0,08	0,07	0,01	1,00
2	0,30	0,57	-0,28	0,19
3	0,16	0,11	0,05	0,00
4	26,30	18,85	7,45	0,04
5	0,30	0,16	0,14	0,00
6	5,96	4,27	1,69	0,26
7	0,30	0,49	-0,19	0,00
8	18,44	20,21	-1,77	0,39
9	7,74	9,89	-2,15	0,00
10	4,57	4,53	0,04	1,00
11	0,63	0,59	0,04	1,00
12	0,50	0,96	-0,46	0,00
13	0,20	0,25	-0,05	0,02
14	11,90	16,84	-4,94	0,00
15	1,36	1,69	-0,32	0,13
16	2,68	3,02	-0,33	0,47
17	1,342	0,79	0,55	0,00
18	8,53	10,95	-2,42	0,05
19	1,71	1,61	0,11	1,00
20	0,65	0,26	0,39	0,00
21	2,07	0,46	1,62	0,01
22	0,15	0,14	0,01	1,00
23	2,02	1,79	0,23	1,00
24	2,01	1,50	0,51	0,01

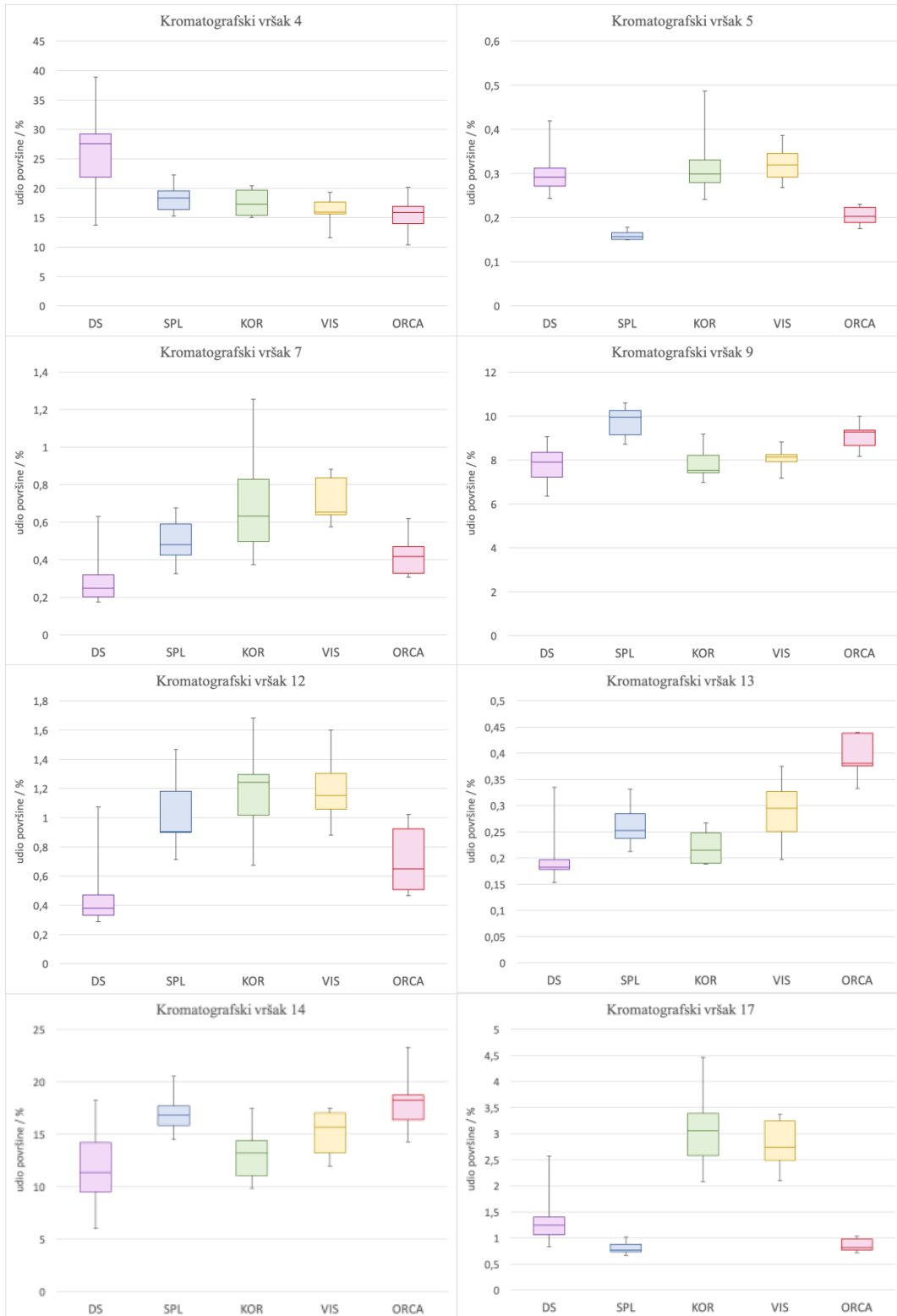
Uspoređeni su profili glikozilacije IgG-a ispitivane i kontrolne skupine, te su razlike u udjelu površine nekih kromatografskih vršaka uočene već iz preklapljenih kromatograma (Slika 7B). Statistička analiza pokazala je kako su udjeli površine velikog broja kromatografskih vršaka, točnije njih 13 od 24, značajno različiti između skupine osoba s Downovim sindromom i kontrolne skupine (Tablica 6). Od 13 kromatografskih vršaka koji su se pokazali statistički značajno različitim između ispitivane i kontrolne skupine, udjeli površine tri kromatografska vrška koji odgovaraju glikanima IgG-a bez galaktoze i četiri kromatografska vrška koji odgovaraju glikanima IgG-a sa sijalinskom kiselinom bili su veći, dok su udjeli površina pet kromatografskih vršaka koji odgovaraju glikanima IgG-a s jednom ili dvije galaktoze te udio površine jednog kromatografskog vrška koji odgovara glikanu IgG-a sa sijalinskom kiselinom bili manji kod osoba s Downovim sindromom nego kod zdravih kontrola (Slika 7 i Tablica 6).

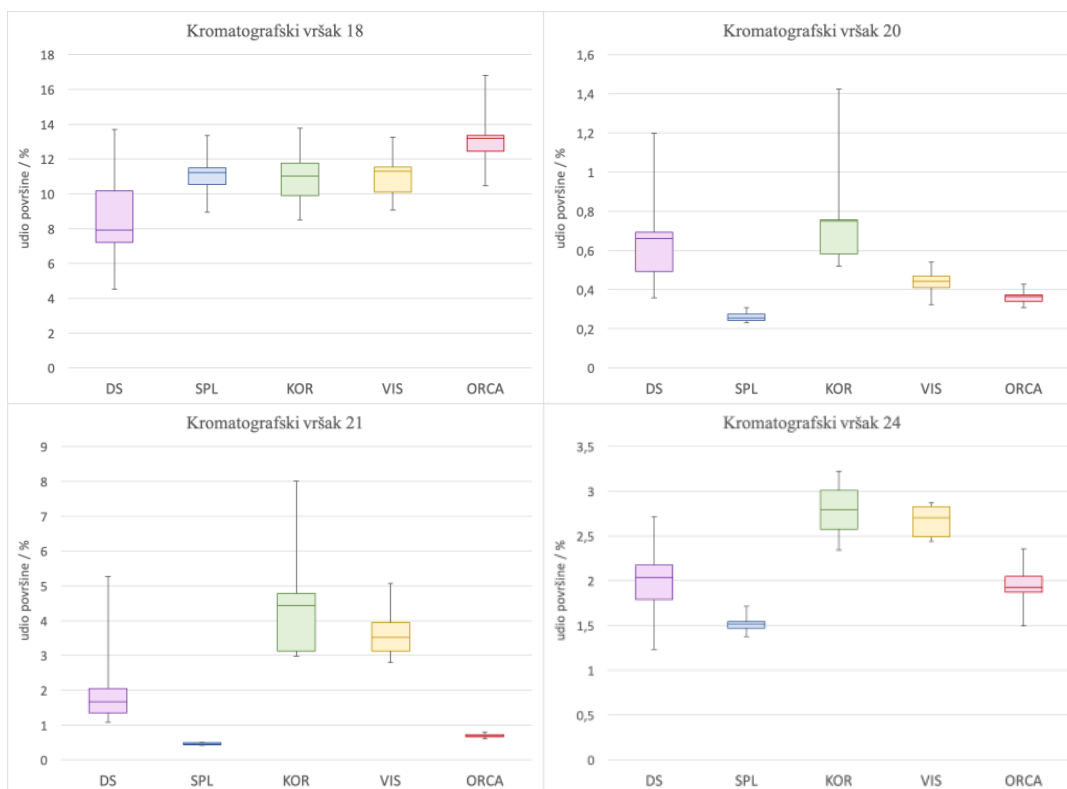
Zatim je za svaki kromatografski vršak čiji se udio površine pokazao značajno različitim između ispitivane i kontrolne (SPL) skupine napravljen grafički prikaz (Slika 8). Na grafovima se vidi kako većina uzoraka prati trend na koji ukazuje statistika, međutim postoje odstupanja. Točnije, dok većina uzoraka ispitivane skupine pokazuje smanjenje udjela površine u odnosu na kontrolnu skupinu, neki uzorci ispitivane skupine pokazuju povećanje udjela (npr. uzorak 5 za kromatografski vršak 13) i obratno (npr. uzorak 5 za kromatografski vršak 4), dok se neki uzorci iz ispitivane skupine svojim udjelima ne razlikuju značajno od kontrola (npr. uzorak 3 za kromatografski vršak 18).

S obzirom da kontrolna skupina nije bila idealna radi različite geografske lokacije osoba iz kontrolne i ispitivane skupine te radi različitog početnog uzorka s kojim se kretalo u analizu (uzorci plazme kod ispitivane skupine i izolirani IgG kod kontrolne skupine), zbog dodatne usporedbe i provjere rezultata u istraživanje su dodane još tri kontrolne skupine – zdravi pojedinci opće populacije Korčule (KOR), Visa (VIS) i otočja Orkney u Škotskoj (ORCA). Podaci o dodatnim kontrolnim skupinama dostupni su iz Krištić i sur. (2014) i Pučić i sur. (2011). Za svaki kromatografski vršak čiji se udio površine pokazao značajno različitim između ispitivane i kontrolne (SPL) skupine napravljen je grafički prikaz koji uspoređuje ispitivanu skupinu sa svim kontrolnim skupinama (Slika 9). Usporedba udjela površine pojedinačnih kromatografskih vršaka pokazuje kako dodatne kontrole u nekim slučajevima prate isti trend kao primarna kontrolna skupina SPL, a u nekim ne. Kontrolna skupina ORCA u većini slučajeva prati isti trend kao SPL, dok KOR i VIS odskaku (npr. kromatografski vršci 17 i 21).



Slika 8. Grafički prikaz usporedbe vrijednosti udjela površine pojedinog kromatografskog vrška svih uzoraka ispitivane skupine (Downov sindrom) s odgovarajućim kontrolnim uzorcima (SPL). Prikazani su samo oni kromatografski vršci čiji se udio površine značajno razlikovao između ispitivane i kontrolne skupine. U gornjem lijevom kutu svakog grafa nalazi se oznaka (broj) ispitivanog uzorka. Ukupan broj uzoraka ispitivane skupine (Downov sindrom) iznosi N=13.



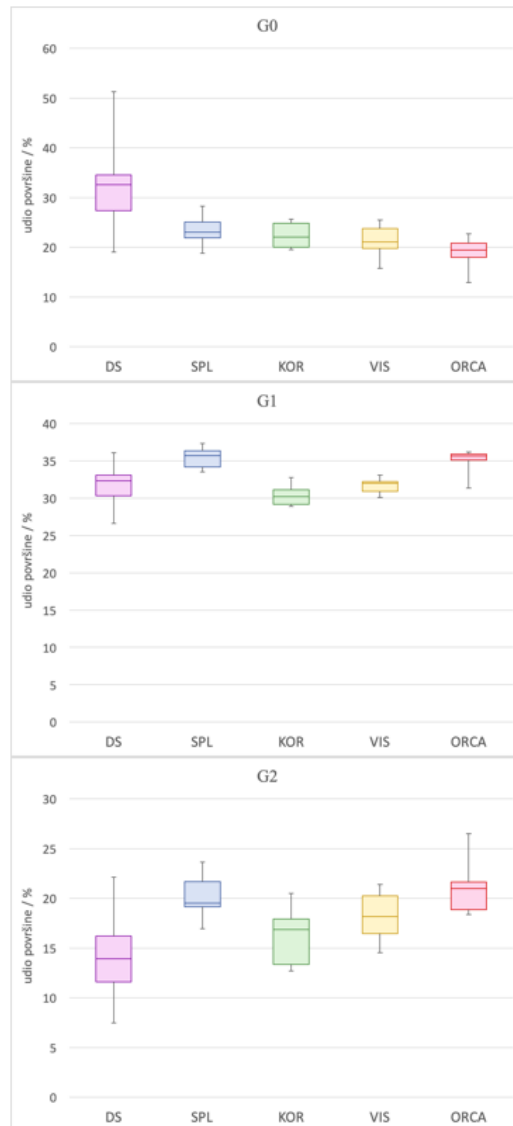


Slika 9. Usporedba vrijednosti udjela površine pojedinih kromatografskih vršaka profila glikozilacije IgG-a ispitivane skupine (Downov sindrom, DS) s odgovarajućim kontrolama (SPL, KOR, VIS, ORCA). Prikazani su samo oni kromatografski vršci čiji se udio površine značajno razlikovao između ispitivane i kontrolne skupine (SPL). Vršak 3 nije prisutan budući da za KOR, VIS i ORCA nema podataka o njegovom udjelu površine. Ukupan broj uzoraka ispitivane skupine (DS) iznosi N=13, a svakom je uzorku ispitivane skupine pridruženo u prosjeku 7 kontrola iz svake kontrolne skupine (tj. srednje vrijednosti 7 kontrola).

Za sve su uzorke izračunata derivirana svojstva, te je provedena statistička analiza koja je pokazala kako se derivirana svojstva G0, G1 i G2 značajno razlikuju između kontrolne i ispitivane skupine (Tablica 7). G0, tj. udio agalaktoziliranih glikana, kod osoba s Downovim sindromom povećan je u odnosu na kontrole, dok su vrijednosti G1, udio monogalaktoziliranih glikana, i G2, udio digalaktoziliranih glikana, smanjene u odnosu na kontrole. Za ona derivirana svojstva koja su se pokazala značajno različitim između ispitivane i kontrolne skupine SPL (G0, G1 i G2) napravljen je grafički prikaz koji uspoređuje ispitivanu skupinu sa primarnom i dodatnim kontrolnim skupinama (Slika 10). Na grafovima je vidljivo da dodatne kontrolne skupine u velikoj većini slučajeva prate statistički značajni trend koji je pokazala primarna kontrolna skupina SPL.

Tablica 7. Srednja vrijednost deriviranih svojstava svih uzoraka ispitivane (Downov sindrom, DS) i kontrolne (SPL) skupine i njihova razlika (DS – SPL), te p-vrijednost dobivena T-testom i korigirana na broj provedenih T-testova. Ispitivana skupina sastoji se od 13 uzoraka, svakom od kojih je pridruženo u prosjeku 7 kontrolnih uzoraka. Statistički značajne razlike ($p < 0.05$) između ispitivane i kontrolne skupine označene su podebljanim brojevima („boldom“).

Derivirano svojstvo	DS / %	SPL / %	DS – SPL / %	Korigirana p-vrijednost
G0	32,78	23,40	9,38	0,04
G1	31,73	35,51	-3,77	0,02
G2	13,98	20,12	-6,14	0,00
S	20,55	20,54	0,01	1,00
F	94,10	95,78	-1,67	0,11
B	16,63	14,84	1,80	0,13

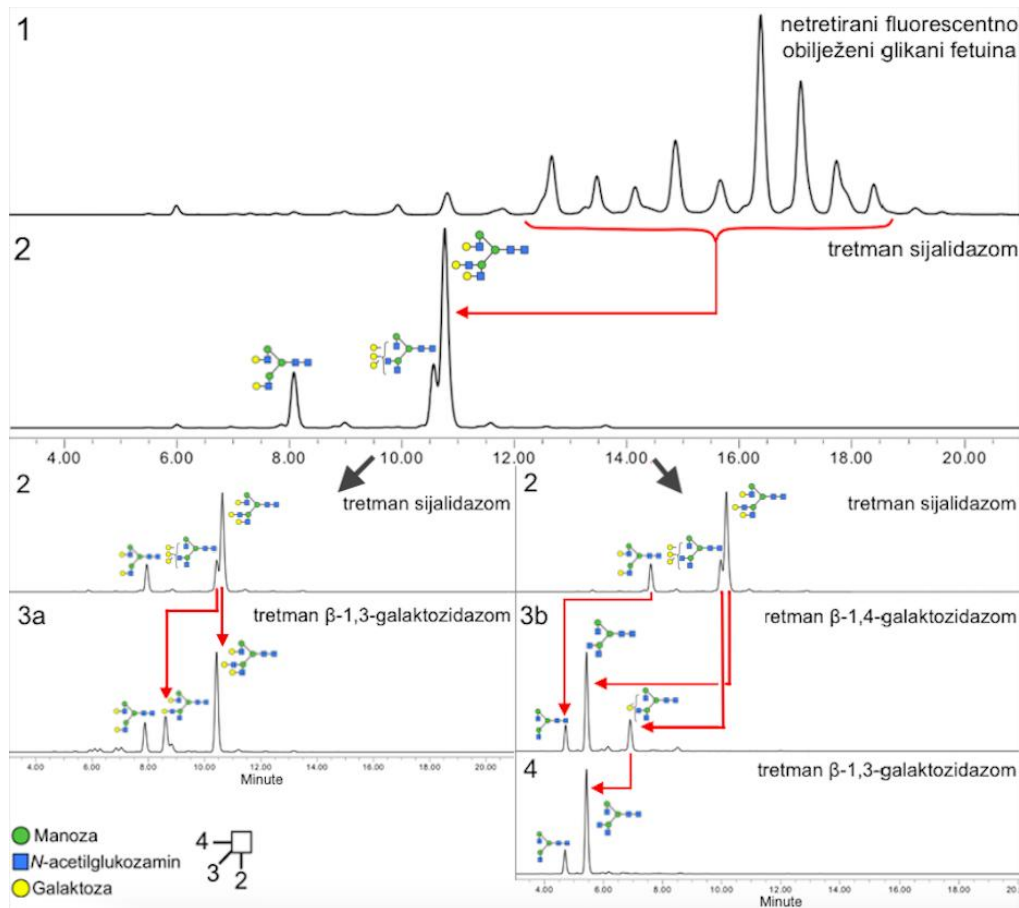


Slika 10. Usporedba vrijednosti deriviranih svojstava ispitivane skupine (DS) s odgovarajućim kontrolama (SPL, KOR, VIS, ORCA). Prikazana su samo ona derivirana svojstva čije su se vrijednosti značajno razlikovale između ispitivane i kontrolne skupine (SPL). G0 predstavlja udio agalaktoziliranih glikana, G1 udio monogalaktoziliranih glikana, a G2 udio digalaktoziliranih glikana u ukupnom glikomu IgG-a. Ukupan broj uzoraka ispitivane skupine (DS) iznosi N=13, a svakom je uzorku ispitivane skupine pridruženo u prosjeku 7 kontrola iz svake kontrolne skupine (njihove srednje vrijednosti).

3.3. Enzimska digestija glikana IgG-a β -1,3 i β -1,4 galaktozidazama

3.3.1. Optimizacija uvjeta reakcije na glikanima fetuina

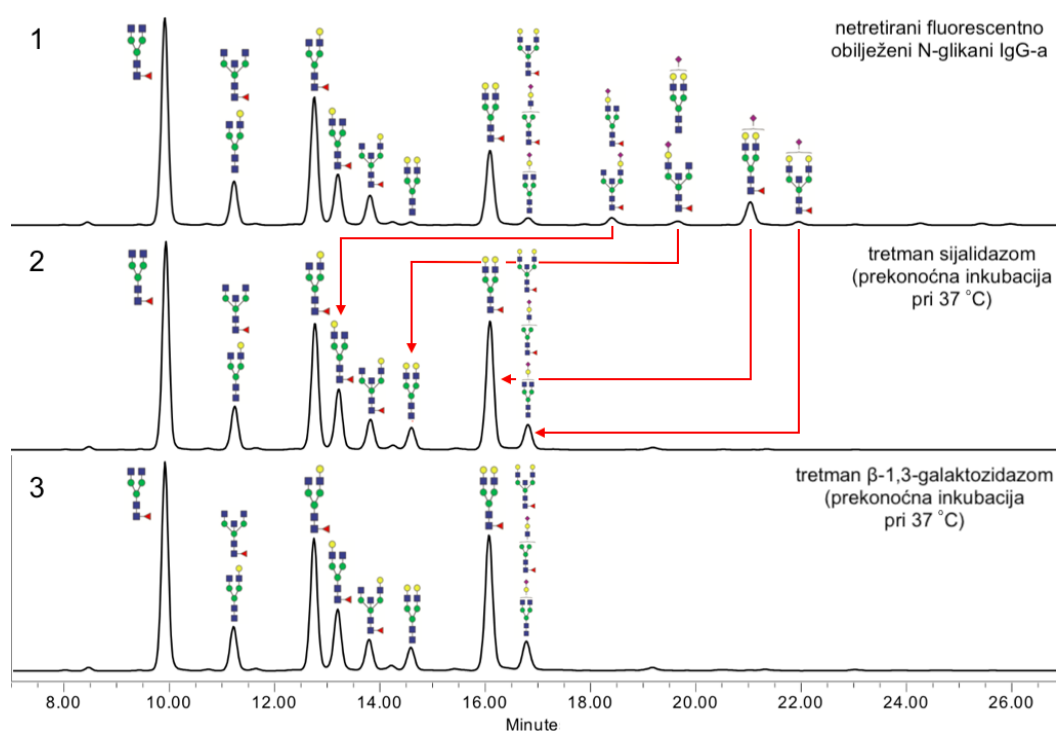
Provedena je UPLC analiza glikana fetuina dobivenih digestijom sijalidazom te β -1,3- i β -1,4-galaktozidazom u svrhu optimizacije uvjeta reakcije za svaki od enzima (Slika 11). Dobiveni kromatogrami pokazali su da su u uvjetima prekonoćne inkubacije na 37 °C enzimске digestije sijalidazom i galaktozidazama bile potpune i specifične.



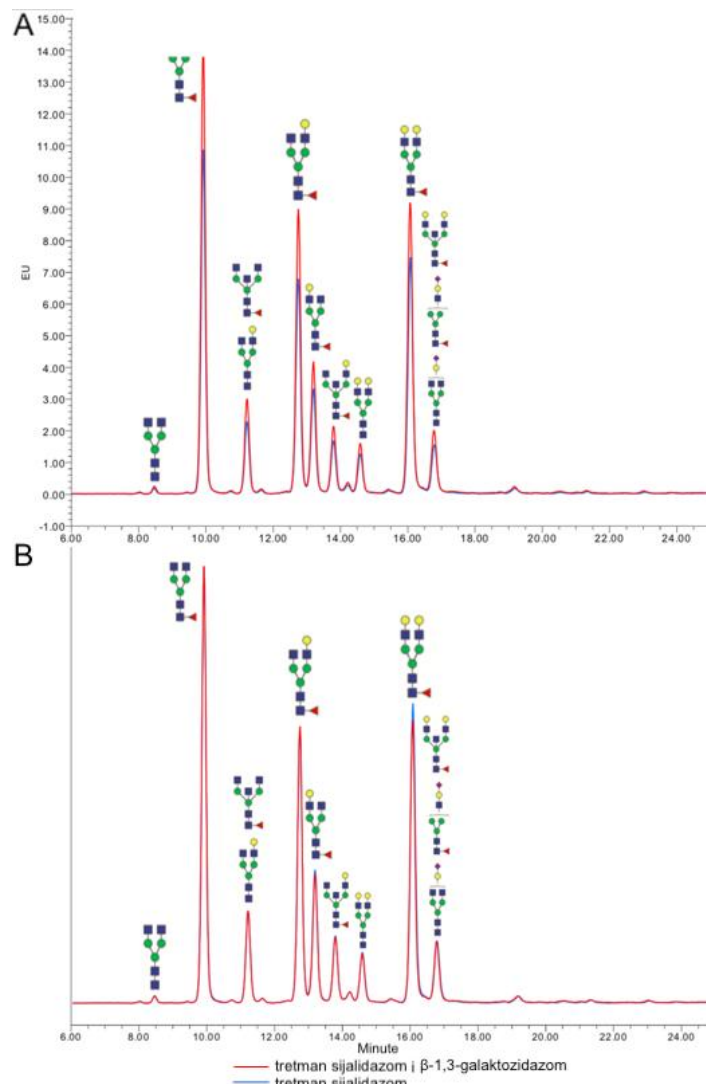
Slika 11. UPLC analiza produkata sekvencijalnih digestija glikana fetuina glikozidazama. 1: Netretirani fluorescentno obilježeni glikani fetuina, 2: glikani fetuina tretirani sijalidazom, 3a: glikani fetuina tretirani sijalidazom, te zatim β -1,3-galaktozidazom, 3b: glikani fetuina tretirani sijalidazom, te zatim β -1,4-galaktozidazom, 4: glikani fetuina tretirani sijalidazom, β -1,4-galaktozidazom, te zatim β -1,3-galaktozidazom. Svaki se tretman enzimom odvijao preko noći pri 37°C. Crvenim su strelicama označeni prijelazi/pomaci pojedinih kromatografskih vršaka nakon tretmana enzimom.

3.3.2. Enzimske digestije glikana IgG-a ispitivane skupine

Provedena je UPLC analiza glikana IgG-a ispitivane skupine dobivenih digestijom β -1,3-galaktozidazom u svrhu provjere postojanja galaktoze vezane β -1,3 vezom. Budući da su korišteni enzimi egzoglikozidaze, što znači da cijepaju samo terminalni šećer, s glikana IgG-a osoba s Downovim sindromom prvo je sijalidazom uklonjena sijalinska kiselina, nakon čega je proveden tretman β -1,3-galaktozidazom (Slika 12). Dobiveni profili glikozilacije prije i poslije tretmana β -1,3-galaktozidazom uspoređeni su te se gotovo u potpunosti preklapaju (Slika 13), a njihovom je integracijom utvrđeno da se kromatogrami prije i poslije tretmana β -1,3-galaktozidazom razlikuju u gotovo zanemarivom postotku (Prilog I).

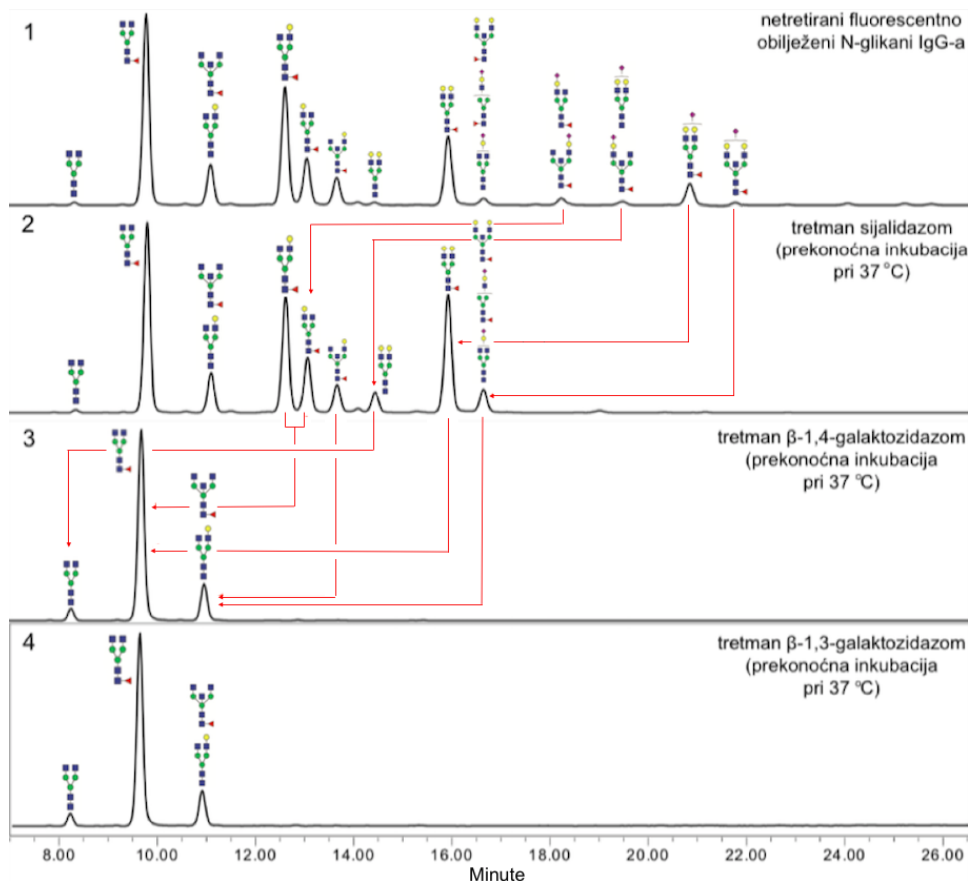


Slika 12. UPLC analiza produkata sekvencijalnih digestija glikana IgG-a ispitivane skupine (osoba s Downovim sindromom) egzoglikozidazama. 1: Netretirani fluorescentno obilježeni glikani IgG-a, 2: glikani IgG-a tretirani sijalidazom, 3: glikani IgG-a tretirani sijalidazom, te zatim β -1,3-galaktozidazom. Crvenim su strelicama označeni prijelazi (pomaci) pojedinih kromatografskih vršaka nakon tretmana enzimom.

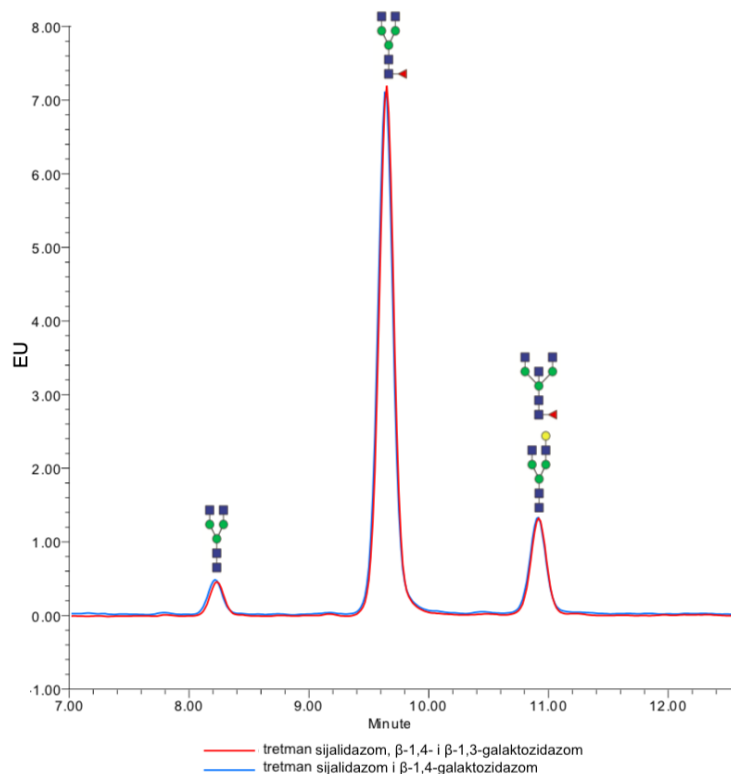


Slika 13. Usporedba glikana IgG-a ispitivane skupine tretiranih sialidazom prije (plava linija) i poslije (crvena linija) tretmana β -1,3-galaktozidazom. A: Nenormaliziran prikaz u kojem je vidljiva razlika u intenzitetima fluorescencije uzoraka, B: prikaz normaliziran u odnosu na najviši kromatografski vršak. Svaki se tretman enzimom odvijao preko noći pri 37°C.

U specifikacijama enzima β -1,3-galaktozidaze navedeno da unatoč visokoj specifičnosti u uvjetima veće koncentracije enzima s nižim stupnjem specifičnosti može cijepati i galaktozu vezanu β -1,6 i β -1,4 vezom. Iz tog je razloga u svrhu dodatne provjere postojanja galaktoze vezane β -1,3 vezom provedena UPLC analiza glikana IgG-a ispitivane skupine dobivenih digestijom β -1,3-galaktozidazom uz prethodnu digestiju sialidazom i β -1,4-galaktozidazom (Slika 14). Profili glikozilacije prije i poslije tretmana β -1,3-galaktozidazom uspoređeni su te je uočeno da se u potpunosti preklapaju (Slika 15).



Slika 14. UPLC analiza produkata sekvencijalnih digestija glikana IgG-a ispitivane skupine glikozidazama. 1: Netretirani fluorescentno obilježeni glikani IgG-a, 2: glikani IgG-a tretirani sialidazom, 3: glikani IgG-a tretirani sialidazom, te zatim β -1,4-galaktozidazom, 4: glikani IgG-a tretirani sialidazom, β -1,4-galaktozidazom, te zatim β -1,3-galaktozidazom. Crvenim su strelicama označeni prijelazi (pomaci) pojedinih kromatografskih vršaka nakon tretmana enzimom.



Slika 15. Usporedba glikana IgG-a ispitivane skupine tretiranih sialidazom i β -1,4-galaktozidazom prije (plava linija) i nakon (crvena linija) tretmana β -1,3-galaktozidazom. Svaki se tretman enzimom odvijao preko noći pri 37°C.

Sve su enzimске digestije u svrhu kontrole provedene i na glikanima IgG-a kontrolne skupine (SPL) te se dobiveni kromatogrami nalaze u prilogu (Prilog II. – Prilog V). Rezultati digestija uzoraka kontrolne skupine bili isti kao i rezultati dobiveni digestijama uzoraka ispitivane skupine. Dakle, nakon tretmana β -1,3-galaktozidazom nije došlo do pomaka pojedinih kromatografskih vršaka (nestajanja pojedinih vršaka i nastajanja novih vršaka), a ni značajnijih promjena u udjelu površina kromatografskih vršaka prisutnih u kromatogramu.

4. RASPRAVA

Poznato je kako su glikani vezani za IgG bitni za njegovo pravilno funkcioniranje (Masuda i sur. 2007) te da su promjene u glikozilaciji IgG-a vrlo dobar biomarker kronološke i biološke dobi osobe (Krištić i sur. 2014). Također se zna da u Downovom sindromu dolazi do preuranjenog starenja koje se očituje u brojnim posljedicama, jedna od kojih je oslabljena funkcija imunološkog sustava (Zigman 2013). Ipak, glikozilacija IgG-a u Downovom sindromu dosad nije istražena.

Usporedbom profila glikozilacije IgG-a ispitivane i kontrolne skupine uočeno je da postoje razlike u udjelu površina pojedinih kromatografskih vršaka (u ukupnoj površini svih kromatografskih vršaka) između osoba s Downovim sindromom i njihovih zdravih vršnjaka. Osim samog broja kromatografskih vršaka čiji se udjeli razlikuju, bitno je obratiti pozornost na sastav glikana kojeg pojedini vršak predstavlja te raste li njegov udio ili se smanjuje. Praćenje udjela određene vrste glikana olakšavaju derivirana svojstva. Rezultati pokazuju kako se agalaktozilirani glikani (glikani bez galaktoze, G0), monogalaktozilirani glikani (glikani s jednom galaktozom, G1) i digalaktozilirani glikani (glikani s dvije galaktoze, G2) značajno razlikuju između osoba s Downovim sindromom i kontrolne skupine, točnije vrijednost G0 je veća, a vrijednosti G1 i G2 su manje u odnosu na kontrolnu skupinu. Iste promjene u glikozilaciji IgG-a uočene su i tijekom starenja, gdje udio agalaktoziliranih glikana (G0) raste, dok udio digalaktoziliranih glikana (G2) pada s dobi (Krištić i sur. 2014). Dakle, analiza rezultata i usporedba s literaturom ukazuju na to da profil glikozilacije IgG-a osoba s Downovim sindromom odgovara onom zdravih osoba starijih od njihove kronološke dobi. Od ranije je poznato da se preuranjeno starenje u Downovom sindromu očituje u profilu glikozilacije ukupnih proteina plazme (Borelli i sur. 2015), a ovo istraživanje pokazuje kako se simptom preuranjenog starenja karakterističan Downovom sindromu očituje i u profilu glikozilacije IgG-a.

Iako je većina uzoraka iz ispitivane skupine pokazivala isti smjer promjena u odnosu na kontrole, ipak je kod pojedinačnih uzoraka moguće uočiti razlike u stupnju u kojem se razlikuju od kontrola – uzorci različiti od medijana kontrolne skupine i uzorci koji su se potpuno odvojili od kontrolne skupine. Osim toga, umjesto smanjenja udjela površine u odnosu na kontrolnu skupinu neki uzorci su pokazivali povećanje i obratno, dok se neki nisu razlikovali značajno od kontrola. Ipak, poznato je kako se simptomi Downovog sindroma javljaju u različitoj dobi i u čitavom spektru jačina, te obilježja bolesti stoga često variraju od pojedinca do pojedinca. Također, svi se simptomi ne javljaju kod svake osobe (Roizen i

Patterson 2003). Iz navedenih razloga nije za očekivati da profil glikozilacije IgG-a bude potpuno uniforman kod svih osoba s Downovim sindromom. Uz to, unatoč trudu da se svakom uzorku ispitivane skupine pridruže uzorci kontrolnih skupina koji mu u potpunosti odgovaraju po kronološkoj dobi, za neke su uzorke manja odstupanja bila neizbježna.

Budući da opća populacija Splita nije bila idealna kontrola, radi dodatne usporedbe i provjere rezultata u istraživanje su dodane tri nove kontrolne skupine – zdravi pojedinci opće populacije Korčule (KOR), Visa (VIS) i otočja Orkney u Škotskoj (ORCA). Većina je dodatnih kontrolnih skupina pokazivala isti smjer promjena u odnosu na primarnu kontrolnu skupinu (SPL), što je potvrdilo rezultate istraživanja. Međutim, postoje odstupanja koja se mogu objasniti različitim geografskim lokacijama kontrolnih skupina. Naime, poznato je kako geografska lokacija ima utjecaj na profil glikozilacije IgG-a (Mahan i sur. 2016), iz kojeg razloga opća populacija Splita nije bila idealna kontrolna skupina. Isti se problem javio kod dodanih kontrolnih skupina, koje su s još udaljenijih geografskih lokacija, dapače, sve su otočne populacije te su izolirane od kopna, pa geografski manje odgovaraju ispitivanoj skupini od SPL.

Također, ispitivana se skupina sastojala od svega 13 uzoraka, te je moguća statistička greška tipa 2, odnosno da radi malog broja uzoraka dođe do izostanka efekta koji bi se jasno vidio na velikoj populaciji.

Idealno bi bilo provesti veće istraživanje u kojem bi ispitivanu i kontrolnu skupinu sačinjavao velik broj uzoraka (nekoliko stotina) s iste geografske lokacije te bi se svakoj osobi iz ispitivane skupine pridružila kontrola iste kronološke dobi i spola. Također, potaknuto dobivenim rezultatima i činjenicom da je glikozilacija IgG-a već pronašla potencijalnu primjenu u kliničkom predviđanju (Gudelj i sur. 2018), u budućnosti bi se moglo provesti istraživanje gdje bi ispitivanu skupinu sačinjavao velik broj uzoraka osoba s Downovim sindromom sa zabilježenim tipom, jačinom i vremenom javljanja simptoma. Mogla bi se napraviti poveznica između profila glikozilacije IgG-a i simptoma Downovog sindroma (npr. ranija ili kasnija pojava demencije, prisutnost autoimunih bolesti i slično) te bi se rezultati ovakvog istraživanja mogli bi koristiti za prognostiku, odnosno analizom profila glikozilacije IgG-a osobe s Downovim sindromom moglo bi se predvidjeti koje će simptome razviti, koje će jačine ti simptomi biti i kada će nastupiti.

4.1. Potencijalan utjecaj treće kopije gena *B3GALT5* na glikozilaciju IgG-a u Downovom sindromu

Zasad je poznato da glikani IgG-a imaju galaktozu vezanu samo β -1,4 glikozidnom vezom (Pučić i sur. 2011). S obzirom na činjenicu da u Downovom sindromu postoji treća kopija gena *B3GALT5* koji kodira enzim koji katalizira vezanje galaktoze β -1,3 glikozidnom vezom, te na uočene razlike u udjelu galaktoziliranih glikana IgG-a između osoba s Downovim sindromom i kontrola, postoji mogućnost da se u Downovom sindromu javljaju strukture glikana atipične za profil glikozilacije IgG-a zdrave osobe. Zasad je poznato da glikani IgG-a imaju galaktozu vezanu samo β -1,4 glikozidnom vezom, a u ovom je istraživanju pomoću digestija β -1,3 i β -1,4 galaktozidazama istražena prisutnost glikana IgG-a u kojima je galaktoza vezana β -1,3 vezom.

Rezultati dobiveni nakon digestija galaktozidazama pokazali su da profil glikozilacije osoba s Downovim sindromom eventualno sadrži glikane IgG-a u kojima je galaktoza vezana β -1,3 vezom, međutim, ukoliko su prisutni, njihova je količina gotovo zanemariva. Osim toga, nastala razlika u profilu glikozilacije IgG-a prije i nakon digestije β -1,3 galaktozidazom koja ukazuje na potencijalnu prisutnost galaktoze vezane β -1,3 vezom najvjerojatnije je rezultat greške metode analize glikana i/ili nespecifičnog cijepanja enzima.

Ipak, potencijalna indirektna uloga treće kopije gena *B3GALT5* u glikozilaciji IgG-a u Downovom sindromu ne može se u potpunosti odbaciti. Kao što je spomenuto, enzim *B3GALT5* preferencijalno glikozilira O-glikane i glikolipide (Gardiner i Davisson 2000). S obzirom da je u ovom istraživanju uočena smanjena galaktozilacija IgG-a u Downovom sindromu, moguće je da pojačana aktivnost enzima *B3GALT5* uzrokuje povećanje galaktozilacije O-glikana i glikolipida, pri čemu se koristi dostupna galaktoza koja bi inače sudjelovala u glikozilaciji IgG-a. Za konkretan zaključak bilo bi potrebno provesti detaljnija istraživanja, na primjer napraviti analizu omjera galaktozilacije supstrata *B3GALT5* u osoba s Downovim sindromom te njihove usporedbe s omjerima galaktozilacije kod zdrave populacije.

Također, nedavno je otkriveno da postoje geni koji imaju utjecaj na glikozilaciju IgG-a, a koji prethodno nisu bili povezani s procesom glikozilacije, već s autoimunim bolestima i upalnim procesima (Lauc i sur. 2013). Ovakva saznanja preusmjeravaju fokus istraživanja s glikoziltransferaza i ukazuju na to da je moguće da uz *B3GALT5* postoje drugi geni na 21. kromosomu koji su potencijalno odgovorni za razlike u glikozilaciji IgG-a između osoba s Downovim sindromom i njihovih zdravih vršnjaka. Buduća istraživanja mogala bi otkriti

postoji li na 21. kromosomu gen koji bi potencijalno mogao biti odgovoran za uočene razlike u glikozilaciji IgG-a kod osoba s Downovim sindromom u odnosu na zdrave vršnjake.

5. ZAKLJUČAK

- Osobe s Downovim sindromom imaju različit profil glikozilacije IgG-a od njihovih zdravih vršnjaka.
- Povećan udio agalaktoziliranih glikana i smanjen udio digalaktoziliranih glikana u osoba s Downovim sindromom u odnosu na njihove zdrave vršnjake odražava preuranjeno starenje karakteristično za osobe s Downovim sindromom.
- Rezultati ovog istraživanja idu u prilog potencijalu IgG-a kao biomarkeru biološke dobi.
- Digestijom egzoglikozidazama utvrđeno je kako profil glikozilacije IgG-a osoba s Downovim sindromom ne sadrži galaktozu vezanu β -1,3 glikozidnom vezom, ali ovo istraživanje ne odbacuje mogućnost da je galaktoza vezana β -1,3 vezom prisutna u malim količinama.
- Kako bi dobili kompletan uvid u razlike u glikozilacijskom profilu IgG-a između osoba s Downovim sindromom i zdravih kontrola potrebna su istraživanja na većem broju uzoraka i pažljivo odabranim kontrolama.

6. LITERATURA

Aryal S. (2015). Antibody – Structure, Classes and Functions. Dostupno na: <http://microbiologyinfo.com/antibody-structure-classes-and-functions/>[stranica posjećena 27.11.2018.].

Borelli V., Vanhooren V., Lonardi E., Karli R., Reidin E., Capri M.E., Libert C., Garagnani P., Salvioli S., Franceschi C., Wuhrer M. (2015): Plasma N-Glycome signature of Down syndrome. *J. Proteome Res.* 14:4232–4245.

Gardiner K., Davisson M. (2000): The sequence of human chromosome 21 and implications for research into Down syndrome. *Genome Biol.* 1

Green E.D., Adelt G., Baenziger J.U., Wilson S., Van Halbeek H. (1988): The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy. *J Biol Chem.* 34:18253–68.

Gudelj I., Lauc G., Pezer M. (2018): Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology.*

Horvath S., Garagnani P., Bacalini M. G., Pirazzini C., Salvioli S., Gentilini D., Di Blasio A. M., Giuliani C., Tung S., Vinters H. V., Franceschi C. (2015): Accelerated epigenetic aging in Down syndrome. *Aging cell* 14:491-495.

Janeway C.A. Jr., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (2001): *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5. izdanje. Garland Science, New York. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/

Krištić J., Vučković F., Menni C., Klarić L., Keser T., Beceheli I., Pučić-Baković M., Novokmet M., Mangino M., Thaqi K., Rudan P., Novokmet N., Sarac J., Missoni S., Kolčić I., Polašek O., Rudan I., Campbell H., Hayward C., Aulchenko Y., Valdes A., Wilson J.F., Gornik O., Primorac D., Zoldoš V., Spector T., Lauc G. (2014): Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *Journals Gerontol. Ser. A.* 69:779–789.

Lauc G., Huffman J.E., Pučić M., Zgaga L., Adamczyk B., Mužinić A., Novokmet M., Polašek O., Gornik O., Krištić J., Keser T., Vitart V., Scheijen B., Uh H., Molokhia M., Patrick A.L., McKeigue P., Kolčić I, Lukić I.K., Swann O., van Leeuwen F.N., Ruhaak R., Houwing-Duistermaat J.J., Slagboom E., Beekman M., de Craen A.J.M., Deelder A.M., Zeng Q., Wang W., Hastie N.D., Gyllenten U., Wilson J.F., Wuhrer M., Wright A.F., Rudd P.M., Hayward C., Aulchenko Y., Campbell H., Rudan I. (2013): Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLoS Genetics*. 9:1.

Mahan A. E., Jennewein M. F., Suscovich T., Dionne K., Tedesco J., Chung A. W., Alter G. (2016): Antigen-Specific Antibody Glycosylation Is Regulated via Vaccination. *PLOS Pathogens*. 12:3.

Masuda K., Kubota T., Kaneko E., Iida S., Wakitani M., Kobayashi-Natsume Y., Kubota A., Shitara K., Nakamura K. (2007): Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Molecular immunology*. 44:3122–3131.

Pučić M., Knežević A., Vidič J., Adamczyk B., Novokmet N., Polašek O., Gornik O., Šupraha-Goreta S., Wormald M.R., Redžić I., Campbell H., Wright A., Hastie N.D., Wilson J.F., Rudan I., Wuhrer M., Rudd P.M., Josić D., Lauc G. (2011): High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG – variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol. Cell. Proteomics* 10:1–15.

Quast I., Maurer M.A., Lünemann J.D. (2016): Generation of IgG-Fc Glycovariants Using Recombinant Glycosidases and Glycosyltransferases. *Bio-protocol*. 6(15):e1886.

Roizen N.J., Patterson D. (2003): Down's syndrome. *The Lancet*. 361:1281–1289.

Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Stanley P., Hart G.W., Aebi M., Darvill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L., Seeberger P.H. (2017): *Essentials of glycobiology*. 3. izdanje. Cold Spring Harbor, New York. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/

Vidarsson G., Dekkers G., Rispen T. (2014): IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*. 5:1–17.

Zigman W.B. (2013): Atypical aging in Down syndrome. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 18:51–67.

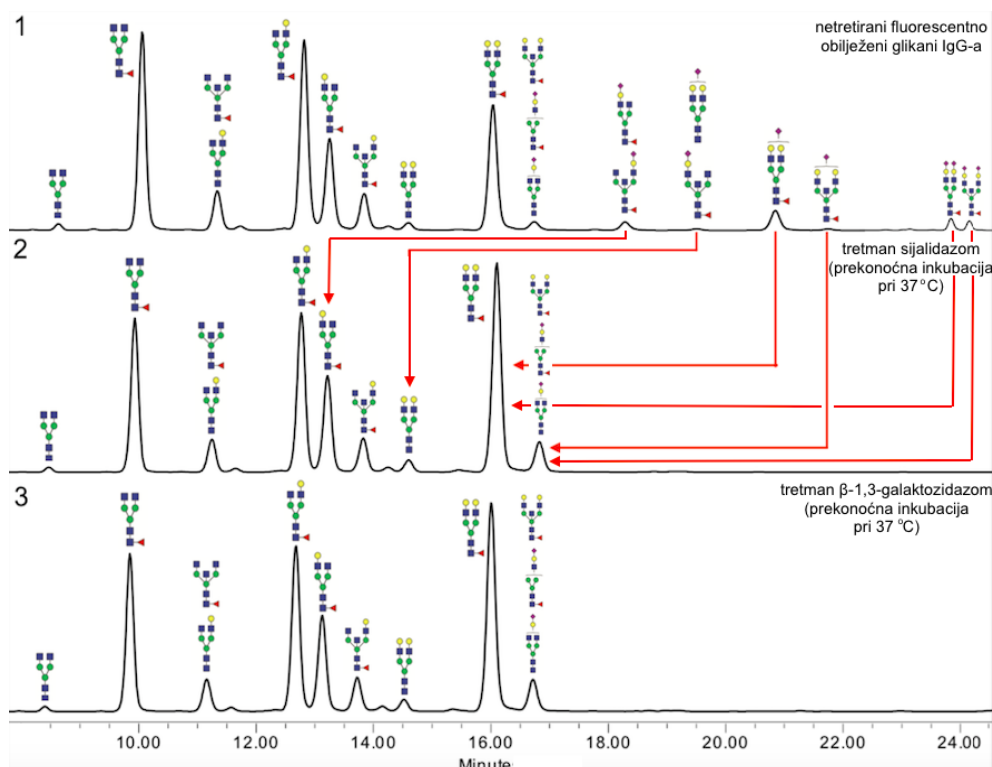
7. PRILOZI

- **Prilog I.** Udjeli površine kromatografskih vršaka dobivenih tretmanom glikana IgG-a sijalizadom i β -1,3-galaktozidazom u ukupnom sastavu glikana IgG-a ispitivane skupine te njihove razlike.
- **Prilog II.** UPLC analiza produkata sekvencijalnih digestija glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) glikozidazama.
- **Prilog III.** Usporedba glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) tretiranih sijalizadom prije (crvena linija) i poslije (plava linija) tretmana β -1,3-galaktozidazom.
- **Prilog IV.** UPLC analiza produkata sekvencijalnih digestija glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) glikozidazama.
- **Prilog V.** Usporedba glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) tretiranih sijalizadom i β -1,4-galaktozidazom prije (plava linija) i nakon (crvena linija) tretmana β -1,3-galaktozidazom.

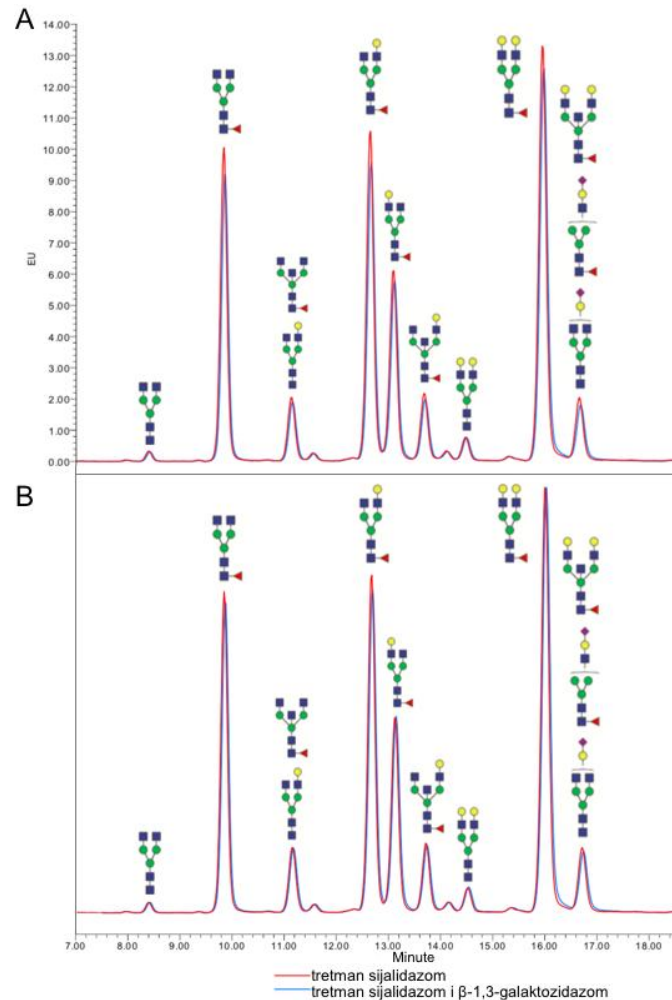
Prilog I. Udjeli površine kromatografskih vršaka dobivenih tretmanom glikana IgG-asijalizadom i β -1,3-galaktozidazom u ukupnom sastavu glikana IgG-a ispitivane skupine te njihove razlike. Uzorak DS_SIA tretiran je sijalidazom, a uzorak DS_B13 je nakon tretmana sijalidazom tretiran β -1,3-galaktozidazom. B13 - SIA predstavlja razliku dvaju tretmana.

Uzorak	Udio površine / %														
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10	GP11	GP12	GP13	GP14	GP15
DS_B13	0,12	0,51	0,16	27,79	0,28	6,24	0,40	19,08	9,30	4,83	0,92	3,67	0,50	21,08	5,11
DS_SIA	0,13	0,48	0,19	27,26	0,28	6,10	0,37	18,61	9,41	4,85	0,88	3,87	0,46	21,86	5,25
B13 - SIA	0,00	0,03	-0,03	0,53	0,00	0,14	0,03	0,48	-0,11	-0,03	0,04	-0,20	0,04	-0,78	-0,14

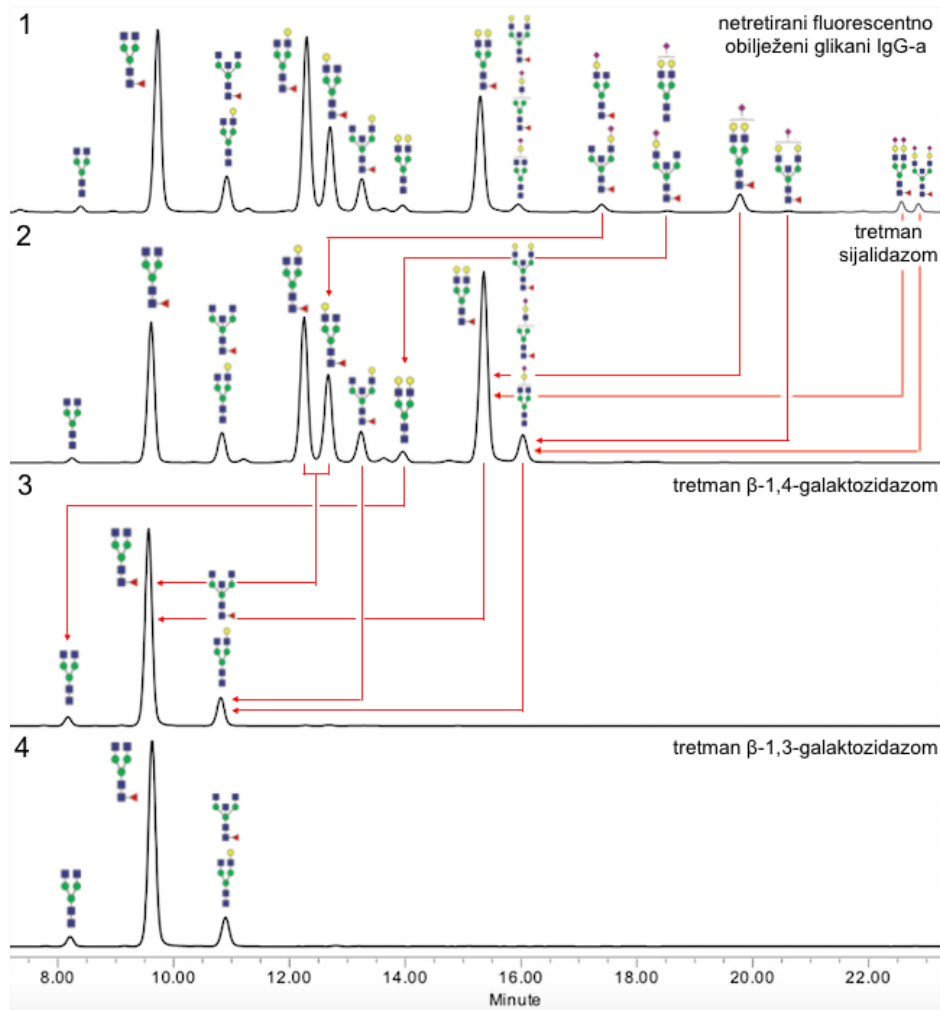
Prilog II. UPLC analiza produkata sekvencijalnih digestija glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) glikozidazama. 1: Netretirani fluorescentno obilježeni glikani IgG-a, 2: glikani IgG-a tretirani sijalidazom, 3: glikani IgG-a tretirani sijalidazom, te zatim β -1,3-galaktozidazom. Crvenim su strelicama označeni prijelazi pojedinih kromatografskih vršaka nakon tretmana enzimom.



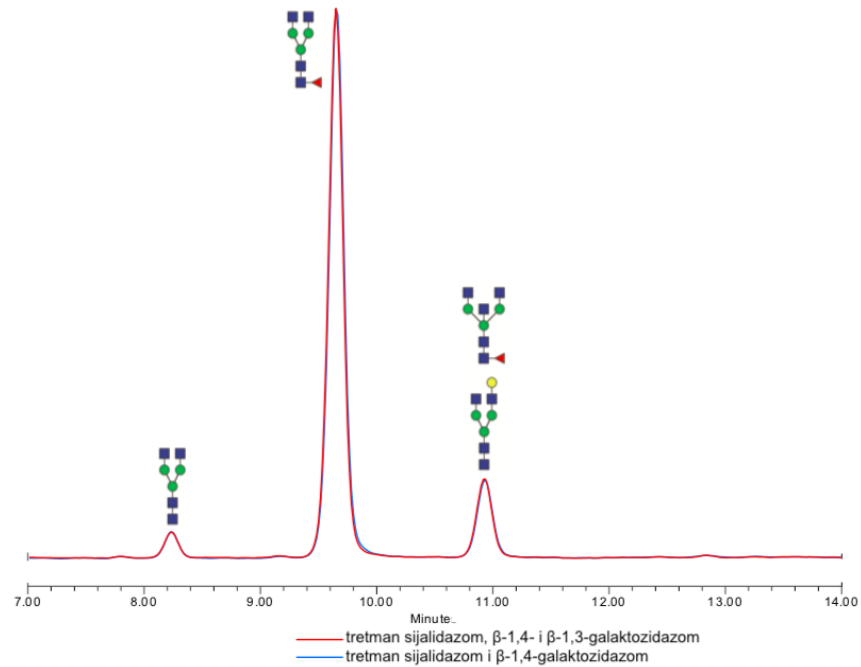
Prilog III. Usporedba glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) tretiranih sijalidazom prije (crvena linija) i poslije (plava linija) tretmana β -1,3-galaktozidazom. A: Nenormaliziran prikaz u kojem je vidljiva razlika u intenzitetima fluorescencije uzoraka, B: prikaz normaliziran u odnosu na najviši kromatografski vršak. Svaki se tretman enzimom odvijao preko noći pri 37°C.



Prilog IV. UPLC analiza produkata sekvencijalnih digestija glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) glikozidazama. 1: Netretirani fluorescentno obilježeni glikani IgG-a, 2: glikani IgG-a tretirani sijalidazom, 3: glikani IgG-a tretirani sijalidazom, te zatim β -1,4-galaktozidazom, 4: glikani IgG-a tretirani sijalidazom, β -1,4-galaktozidazom, te zatim β -1,3-galaktozidazom. Iznad ili pokraj svakog kromatografskog vrška označene su odgovarajuće strukture glikana. Crvenim su strelicama označeni prijelazi pojedinih kromatografskih vršaka nakon tretmana enzimom.



Prilog V. Usporedba glikana IgG-a kontrolne skupine (SPL) tretiranih sijalidazom i β -1,4-galaktozidazom prije (plava linija) i nakon (crvena linija) tretmana β -1,3-galaktozidazom. Prikaz je normaliziran u odnosu na najviši kromatografski vršak. Svaki se tretman enzimom odvijao preko noći pri 37°C.



8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 5. veljače 1995. u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu dr. Ante Starčevića i I. gimnaziju, oboje u Zagrebu. Preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2013., a diplomski studij Molekularne biologije na istom fakultetu upisala sam 2016. godine.

Od kolovoza 2016. do kolovoza 2018. godine bila sam glavni organizator Europskog simpozija studenata biologije – SymBioSE 2018 Croatia, koji se održao u srpnju 2018. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od veljače do lipnja 2018. godine bila sam na praksi na Institutu za molekularnu evoluciju na Heinrich-Heine sveučilištu pod vodstvom prof. Williama Martina u sklopu Erasmus+ stručne prakse.

Od listopada 2016. do veljače 2018. godine bila sam na laboratorijskoj stručnoj praksi na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tema prakse bila je evolucija, a provedena je pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Damjana Franjevića.

U zimskom semestru 2016. godine bila sam demonstrator na kolegiju Animalna fiziologija, također na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Kroz cijeli sam studij aktivno sudjelovala u znanstveno-popularnim manifestacijama, npr. „Dan i noć na PMF-u,“ gdje sam nekoliko puta bila edukator, odnosno voditelj radionice, a također sam vodila radionicu na manifestaciji „Dan za znanost“ u Koprivnici 2017. godine.