

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Fran Lukšić

**Utjecaj starenja stanične linije FreeStyle™
293-F na glikozilaciju izlučenog
imunoglobulina G**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš, te neposrednim voditeljstvom mag. biol. mol. Anike Mijakovac. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na ukazanoj pomoći, razumijevanju i savjetima tokom izrade i pisanja ovog rada.

Hvala mag. biol. mol. Aniki Mijakovac na uloženom trudu i vremenu, strpljenju i savjetima kojima me vodila kroz izradu cijelog rada.

Hvala svim kolegama iz grupe koji su mi priskakali u pomoć kada je bilo potrebno i odgovarali na mnogobrojna pitanja.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene.

Naposljetku, iskreno hvala mojoj obitelji na podršci i neizmjerne ljubavi koju mi pružaju iz dana u dan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj starenja stanične linije FreeStyle™ 293-F na glikozilaciju izlučenog imunoglobulina G

Fran Lukšić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Alternativna glikozilacija fragmenta Fc imunoglobulina G (IgG) znatno mijenja ulogu ovog antitijela u imunom sustavu. Starenjem dolazi do promjena u glikozilaciji, prije svega galaktozilaciji, što dovodi do povećanja udjela IgG s proupalnom ulogom. Stanična linija FreeStyle™ 293-F koristi se za proučavanje regulacije glikozilacije IgG-a te za sintezu rekombinantnih imunoglobulina. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječe li starost stanične linije FreeStyle™ 293-F na glikom IgG-a te ukoliko utječe jesu li promjene uzrokovane starenjem nalik onima koje se dešavaju s glikomom IgG-a u serumu prilikom starenja u ljudi. Drugi dio istraživanja imao je za cilj utvrditi jesu li promjene glikoma izravna posljedica promjene ekspresije glikoziltransferaza koje sudjeluju u procesu glikozilacije IgG-a. Analizom glikana metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti utvrđeno je da starenjem stanica modelne linije dolazi do promjena IgG glikoma. Najznačajnije promjene odnose se na porast udjela agalaktoziliranih glikana i smanjenje udjela fukoziliranih glikana. Promjene fukozilacije mogu se barem dijelom objasniti uočenim promjenama ekspresije fukoziltransferaze FUT8, dok promjene galaktozilacije nisu izravna posljedica promjene ekspresije galaktoziltransferaze B4GALT1. Promjene glikoma IgG-a zabilježene tijekom starenja modelne stanične linije uspoređene su s već poznatim promjenama koje nastaju u IgG glikomu u krvi čovjeka tijekom starenja.

(50 stranica, 15 slika, 2 tablice, 69 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: imunoglobulin G, *N*-glikozilacija, IgG glikom, HEK293 FreeStyle, *in vitro* stanično starenje

Voditelj: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Neposredni voditelj: mag. biol. mol. Anika Mijakovac

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Influence of cell aging on glycosylation of immunoglobulin G secreted from cell line FreeStyle™ 293-F

Fran Lukšić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glycosylation of the Fc fragment of immunoglobulin G (IgG) affects the role of this antibody in the immune system. Aging is associated with changes in glycosylation, primarily galactosylation, which lead to an increase in proportion of proinflammatory IgG antibodies. The FreeStyle™ 293-F is the preferred model cell line used for production of recombinant immunoglobulins, but also for studies of IgG glycosylation. The aim of this study was to determine whether the aging of the FreeStyle™ 293-F cells affects IgG glycome and, if so, whether the changes caused by cell aging are similar to changes of IgG glycome found during aging of a human organism. The aim of the second part of this study was to determine whether changes in IgG glycome result directly from changes in the expression of glycosyltransferases involved in the process of IgG glycosylation. Analysis of glycans by ultra-high performance liquid chromatography revealed that cell aging leads to changes in IgG glycome. The most significant changes are an increase in the proportion of agalactosylated glycans and a decrease in the proportion of fucosylated glycans. Changes in fucosylation can be at least partially explained by the changes in FUT8 expression, while changes in galactosylation are not a direct consequence of changes in B4GALT1 expression. Changes of IgG glycome found during aging of model cells were compared to changes of IgG glycome which are known to occur during human ageing.

(50 pages, 15 figures, 2 tables, 69 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: immunoglobulin G, N-glycosylation, IgG glycome, HEK293 FreeStyle, *in vitro* cell aging

Supervisor: dr. sc. Vlatka Zoldoš, Professor

Assistant Supervisor: mag. biol. mol. Anika Mijakovac

Reviewers: dr. sc. Vlatka Zoldoš, Professor

dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Professor

dr. sc. Martina Šeruga Musić, Associate Professor

Thesis accepted: September 15th, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Glikozilacija proteina	1
1.2. Imunoglobulini	2
1.2.1. Struktura i uloga imunoglobulina G	2
1.2.2. Glikozilacija imunoglobulina G.....	4
1.2.3. Regulacija glikozilacije imunoglobulina G	6
1.3. Glikozilacija imunoglobulina G i starenje.....	7
1.4. Stanična linija FreeStyle™ 293-F	9
1.5. Metode istraživanja glikana.....	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. Materijal	13
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi.....	15
3.2.2. Transfekcija stanica	15
3.2.3. Analiza <i>dot blot</i>	16
3.2.4. Izolacija ukupne stanične RNA i tretman DNazom.....	17
3.2.5. Reverzna transkripcija	18
3.2.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR).....	18
3.2.7. Izolacija molekula IgG, fluorescentno označavanje i razdvajanje glikana	20
3.2.8. Statistička obrada podataka	22
4. REZULTATI	23
4.1. Uzgoj i transfekcija stanica FreeStyle™ 293-F te kvantifikacija izlučenih molekula IgG .	23
4.2. Promjene IgG glikoma tijekom starenja stanica.....	25
4.2.1. Galaktozilacija i agalaktozilirani glikani	26
4.2.2. Sijalinizacija	28
4.3.3. Sržna fukožilacija	29
4.3.3. Rasijecajući <i>N</i> -acetilglukozamin	30
4.3. Promjene ekspresije glikoziltransferaza	31
4.3.1. <i>B4GALTI</i>	32

4.3.2. <i>ST6GAL1</i>	32
4.3.3. <i>FUT8</i>	33
5. RASPRAVA	35
6. ZAKLJUČAK.....	42
7. LITERATURA	43
8. ŽIVOTOPIS.....	49
9. PRILOZI	50

1. UVOD

1.1. Glikozilacija proteina

Glikozilacija je proces u kojem se na lipid ili protein kovalentno vežu glikani. Vezani ugljikohidrati mogu se razlikovati u broju, rasporedu i vrsti monosaharida od kojih su sastavljeni te glikozidnoj vezi (mjestu na kojem su vezani za protein). Posljedice tih razlika su raznovrsne uloge koje vezani ugljikohidrati imaju unutar i izvan stanice. Vezani glikani imaju važnu ulogu u usmjeravanju proteina do ciljnog mjesta, međustaničnim vezama, pravilnom smatanju i stabilnosti proteina, ali i u regulaciji imunog odgovora (Vidarsson i sur. 2014).

Ovisno o vezi između glikana i proteina, razlikujemo pet tipova glikozilacije proteina: *N*-vezana glikozilacija, *O*-vezana glikozilacija, *C*-manozilacija, formacija glikozilfosfatidil inozitolnog sidra i glikozilacija fosfoserina (Spiro 2002). Jedan tip glikozilacije ne isključuje drugi pa tako na istom proteinu može biti više različitih ugljikohidratnih lanaca vezanih na različitim mjestima. Primjer je protein imunoglobulin G (IgG) koji istovremeno može imati i *N*-vezane i *O*-vezane glikane (Fanger i Smyth 1972).

Proces glikozilacije odvija se u više koraka u koje je uključen velik broj enzima raspoređenih u više različitih staničnih odjeljaka, gdje najvažniju ulogu imaju endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat. Iako se glikozilacija smatra posttranslacijskom modifikacijom, *N*-glikozilacija koja je najzastupljeniji tip glikozilacije odvija se paralelno s translacijom tj. kotranslacijski (Spiro 2002).

N-vezana glikozilacija podrazumijeva vezanje prekursorskog oligosaharida za dušikov (N) atom bočnog ogranka asparagina koji se nalazi unutar konsenzus slijeda Asn-X-Ser/Thr pri čemu X predstavlja bilo koju aminokiselinu osim prolina. Prvi korak odvija se u lumenu endoplazmatskog retikuluma kada se struktura sastavljena od 14 monosaharida prebacuje na protein čime se stvara kovalentna veza između monosaharida *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i asparaginskog ostatka proteina. Prekursorska struktura doručuje se u endoplazmatskom retikulumu te se protein potom transportira do Golgijevog aparata gdje se oligosaharid dodatno doručuje kako bi nastali konačni oligosaharidi koje možemo podijeliti u tri skupine: oligosaharidi s velikim udjelom manoze, kompleksni oligosaharidi i hibridni oligosaharidi (Reily i sur. 2019).

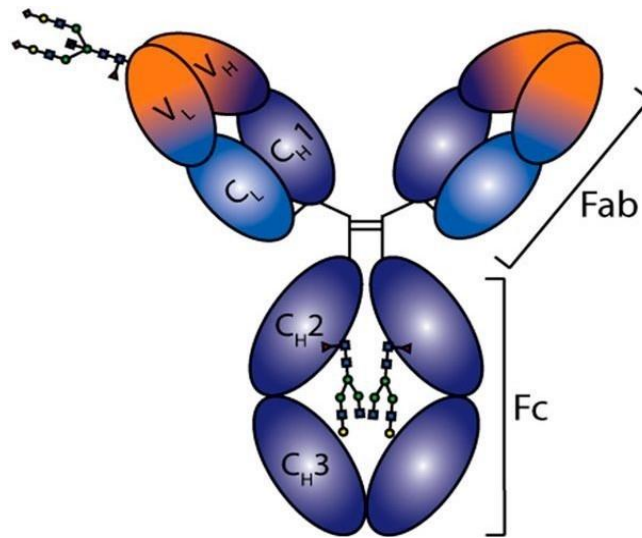
1.2. Imunoglobulini

Imunoglobulini (Ig) ili antitijela su glikoproteini koje stvaraju plazma stanice te čine najznačajniji dio humoralnog imunog sustava. Oko 20% proteina plazme čine upravo imunoglobulini (Vaillant i sur. 2021). U ljudi postoji ukupno pet izotipova imunoglobulina: IgG, IgA, IgM, IgE i IgD. Sve skupine dijele zajedničku osnovnu strukturu koju čine dva laka i dva teška lanca međusobno povezana disulfidnim vezama. Laki lanci sastoje se od dvije domene, N-terminalne varijabilne i konstantne domene. Teški se lanci sastoje od N-terminalne varijabilne domene, te tri ili četiri konstantne domene ovisno o izotipu. Ig se može pocijepati na tri velika fragmenta: fragment Fc (eng. *fragment crystallizable*) i dva fragmenta Fab (eng. *fragment antigen binding*). Fc fragment čine dijelovi oba teška lanca te je taj fragment presudan u regulaciji samog imunog odgovora jer veže različite Fc receptore i efektorske molekule. Fab fragment čine laki lanac i dio teškog lanca, a unutar tog fragmenta nalazi se antigen vezujuće mjesto od kud dolazi i sam naziv (Vaillant i sur. 2021).

1.2.1. Struktura i uloga imunoglobulina G

Imunoglobulin G (IgG) najzastupljeniji je od pet izotipova Ig-a u ljudskom serumu. Kao i ostali izotipovi sastoji se od dva laka i dva teška lanca. Teški se lanac sastoji od jedne varijabilne (VH od eng. *heavy chain variable*) i tri konstantne domene (CH1, CH2 i CH3 od eng. *heavy chain variable*; Slika 1). Domene CH1 i CH2 povezane su spojnom (eng. *hinge*) regijom koja je bitna za stvaranje disulfidnih veza između dva teška lanca. Za povezivanje teških lanaca u dimer važnu ulogu imaju i CH3 regije koje interagiraju nekovalentnim interakcijama.

IgG se dodatno može podijeliti u 4 skupine: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, redom od najzastupljenije do najrjeđe skupine prisutne u plazmi (Schur 1987). Navedene skupine razlikuju se u pojedinim aminokiselinama, ponajviše unutar spojne regije i CH2 domene, što za posljedicu ima različite mogućnosti vezanja pojedinih efektorskih molekula, a samim time i omogućava različitu funkciju antitijela, odnosno različiti imuni odgovor nakon prepoznavanja antigena (Vidarsson i sur. 2014).

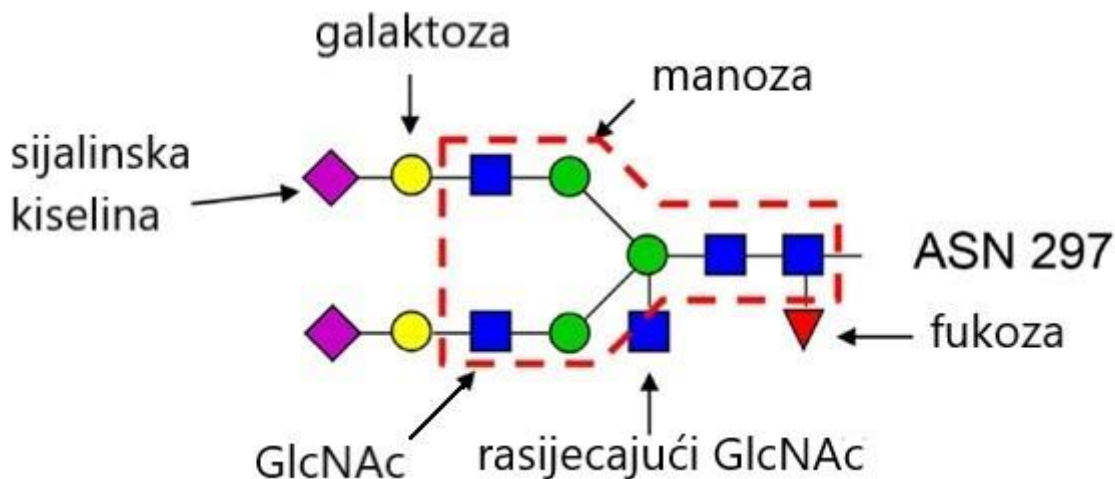


Slika 1. Shematski prikaz strukture imunoglobulina G. IgG se sastoji od dva teška (tamno plava i narančasta boja) i dva laka (svijetlo plava i narančasta boja). Na domeni CH2 oba teška lanca nalazi se očuvani asparagin 297 na koji su vezani glikani smješteni unutar šupljine Fc fragmenta. Na domeni VL lakog lanca nalazi se N-glikozilacijsko mjesto koje je glikozilirano u određenom postotku antitijela IgG. VL-varijabilna domena lakog lanca; CL-konstantna domena lakog lanca; VH-varijabilna domena teškog lanca; CH-konstantna domena teškog lanca; Fab-antigen vezujući fragment; Fc-fragment sklon kristalizaciji. Preuzeto i prilagođeno prema Bovenkamp i sur. (2016).

Imunoglobulin G ima višestruku ulogu u imunom odgovoru. Vežanjem patogena sprječava njihov ulazak u stanice te dovodi do neutralizacije toksina. Također može aktivirati i klasičan put komplementa vežanjem i aktivacijom proteina C1q što naposljetku dovodi do lize ili fagocitoze patogena (Thomson 2016). Treći mehanizam djelovanja uključuje vežanje fragmenta Fc za pripadajuće receptore fragmenta Fc IgG-a (Fc γ R) koji se nalaze na više različitih skupina hematopoetskih stanica, ali i na nekim endotelnim stanicama (Schroeder i sur. 2010). Efekti vežanja za receptore Fc γ R mogu biti različiti, ovisno o podskupini receptora koje je IgG vezao, ali i ovisno o vrsti stanica na kojima se receptori nalaze. Vežanjem za receptore na makrofazima IgG dovodi do fagocitoze patogena, vežanjem za receptore na stanice ubojice (NK stanice, eng. *natural killer*) aktivira staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (ADCC, eng. *Antibody dependent cell mediated cytotoxicity*), a vežanjem limfocita regulira se sinteza ovog antitijela (Schroeder i sur. 2010).

1.2.2. Glikozilacija imunoglobulina G

Unutar domene CH2 IgG-a nalazi se očuvan asparagin na poziciji 297 (N297) na koji je amidnom vezom vezan glikan. Glikani s obje domene CH2 smješteni su unutar šupljine koji formiraju teški lanci (Slika 1; Cobb 2020). Vezani glikani imaju trostruku ulogu: strukturnu, stabilizacijsku i funkcionalnu. Preradom prekursorske strukture do konačnog glikana nastaju dodatne hidrofobne interakcije koje stabiliziraju fragment Fc (Bowden i sur. 2012). Druga je uloga utjecaj na poluživot cirkulirajućeg IgG-a pa tako dodatak sijalinske kiseline na *N*-vezani glikan produžuje poluživot cirkulirajućeg IgG-a, vjerojatno promjenom afiniteta vezanja za pojedine Fc receptore (Bas i sur. 2019). Treća je uloga regulacija imunog odgovora. Sama struktura vezanog glikana utječe na afinitet vezanja za pojedine tipove receptora Fc i proteine komplementa te promjena strukture glikana dovodi do vezanja drugih receptora i posljedično drugačijeg imunog odgovora (Dekkers i sur. 2017; Shields i sur. 2002).



Slika 2. Struktura *N*- glikana vezanog na asparagin 297 u molekuli imunoglobulina G. Sržna struktura (uokvirena crvenom isprekidanom linijom) sastoji se od 5 molekula GlcNAc i 2 molekule manoze. Glikan može biti dodatno modificiran dodatkom fukoze, rasijecajućeg GlcNAc, galaktoze i sijalinske kiseline. Preuzeto i prilagođeno prema Vidarsson i sur. (2014).

Sržna struktura glikana vezanog za N297 sastoji se od 2 molekule GlcNAc, te tri molekule manoze koje stvaraju biantenarnu strukturu (Slika 2). Ta struktura može biti dodatno modificirana dodatkom fukoze na početni (sržni) GlcNAc, rasijecajućeg GlcNAc na početnu manozu, dodatkom galaktoza na antenarne manoze, te dodatkom sijalinske kiseline na galaktozu. Svaka od tih modifikacija utječe na funkciju i strukturu IgG-a. Fukozilacija smanjuje afinitet vezanja za FcγRIII, a time i ADCC (Shields i sur. 2002) dok sijalinizacija ima supresivnu ulogu u imunom odgovoru (Hess i sur. 2013). Galaktozilacija može imati protuupalnu ulogu poboljšavajući vezanje za inhibitorne receptore FcγRIIB (Karsten i sur. 2012), ali može imati i proupalnu pospješujući vezanje za FcγRIIIa (Houde i sur. 2010). Velik broj mogućih glikanskih struktura s različitim funkcijama dovode do kompleksne uloge IgG-a u pro- i protuupalnom odgovoru.

Uspoređujući glikanske profile unutar populacije, uočeno je postojanje značajnih razlika (Pučić i sur. 2011). Dio njih moguće je objasniti genetičkom podlogom (Lauc i sur. 2013), ali je velik dio uvjetovan okolišem. Ipak, gledajući glikanski profil pojedinca, on je relativno stabilan kroz vrijeme (Gornik i sur. 2009). Do promjena dolazi tek usred pojave različitih promjena fizioloških stanja, te različitih patoloških stanja zbog čega se glikanski profil IgG-a nameće kao potencijalni biljeg zdravstvenog stanja pojedinca (Gudelj i sur. 2018).

Treba spomenuti i druga mjesta glikozilacije IgG-a, prije svega unutar fragmenta Fab. Fab mjesta glikozilacije nastaju prilikom procesa somatske hipermutacije i procjenjuje se da oko 20% ljudskog IgG-a ima N-glikozilirane Fab fragmente (Bovenkamp i sur. 2016). Iako nije toliko istražena kao glikozilacija fragmenta Fc, do sada je utvrđeno da Fab glikozilacija utječe na stabilnost i poluživot IgG-a te na afinitet vezanja antigena (Bovenkamp i sur. 2016, 2018; Khurana i sur. 1997). Preostala mjesta glikozilacije specifična su za izotip IgG3. To je jedini izotip IgG-a za koji je utvrđena O-glikozilacija unutar vezne domene, no njezina uloga još nije poznata (Plomp i sur. 2015). Unutar fragmenta Fc izotipa IgG3 postoji i potencijalno mjesto N-glikozilacije na poziciji N392 čija uloga još nije istražena (de Haan i sur. 2020; Shah i sur. 2017).

1.2.3. Regulacija glikozilacije imunoglobulina G

Do sada su otkrivena četiri enzima koja sudjeluju u modifikaciji glikana na IgG-u, a sva četiri enzima su glikoziltransferaze koje dodaju monosaharidne jedinice na postojeću glikansku strukturu. To su: fukoziltransferaza 8 (FUT8, dodaje sržnu fukožu), *N*-acetilglukozaminiltransferaza 3 (MGAT3, dodaje rasijecajući GlcNAc), beta-galaktozidaza alfa-2,6-sialiltransferaza 1 (ST6GAL1, dodaje sijalinsku kiselinu) te beta-1,4-galaktoziltransferaza 1 (B4GALT1, dodaje galaktozu) (Lauc i sur. 2013).

Osim glikoziltransferaza, cjelogenomske studije povezanosti (eng. *genome-wide association study*, GWAS) dovele su do otkrića većeg broja gena koji su povezani s glikozilacijom imunoglobulina G, a čija se stvarna uloga u glikozilaciji treba utvrditi funkcionalnim analizama. Jedan od posljednjih primjera je istraživanje Klarić i sur. (2020) koje je pokazalo direktan utjecaj promjene ekspresije transkripcijskog faktora IKZF1 na ekspresiju fukoziltransferaze 8 i glikozilaciju IgG-a.

Uz brojne transkripcijske faktore i druge proteine s nepoznatom funkcijom u ovom procesu, sve je više dokaza da i epigenetička regulacija ima veliku ulogu u glikozilaciji IgG-a i proteina općenito. Pokazano je da promjena metilacije gena koji kodiraju za glikoziltransferaze, ali i drugih gena koji nisu direktno uključeni u dodatak ili skidanje monosaharida na glikansku strukturu, dovodi do promjene strukture glikana. Metilacija promotora *MGAT3* nađena kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva negativno korelira s galaktoziliranim i sijaliniziranim glikanima, kao i s glikanima koji imaju vezan rasijecajući GlcNAc (Klasić i sur. 2018). Uloga histonskih modifikacija u glikozilaciji nije toliko istražena, no postoje studije koje pokazuju da histonske modifikacije reguliraju ekspresiju specifičnih glikoziltransferaza u mozgu (Kizuka i sur. 2011). Treći epigenetički mehanizam bitan u regulaciji glikozilacije proteina, a potencijalno i u glikozilaciji IgG-a su male nekodirajuće RNA. Mikro RNA (miRNA) molekule reguliraju ekspresiju glikoziltransferaza u mnogim tumorskim staničnim linijama. Različite miRNA smanjuju ekspresiju *FUT8* i fukozilaciju proteina u stanicama kolorektalnog karcinoma, kao i u stanicama hepatocelularnog karcinoma (Wang i sur. 2014; Bernardi i sur. 2013). I drugi gliko-geni u tumorskim stanicama regulirani su miRNA, npr. *MGAT3* i *ST6GAL1* (Han i sur. 2018; Huang i sur. 2018). Kako isti geni sudjeluju u glikozilaciji IgG-a, moguće je da miRNA imaju bitnu ulogu i u tom procesu, što bi objasnilo određene promjene glikanskih struktura koje nisu proporcionalne promjeni ekspresije vezanih glikoziltransferaza (Thu i Mahal 2020; Neelamegham i Mahal 2016).

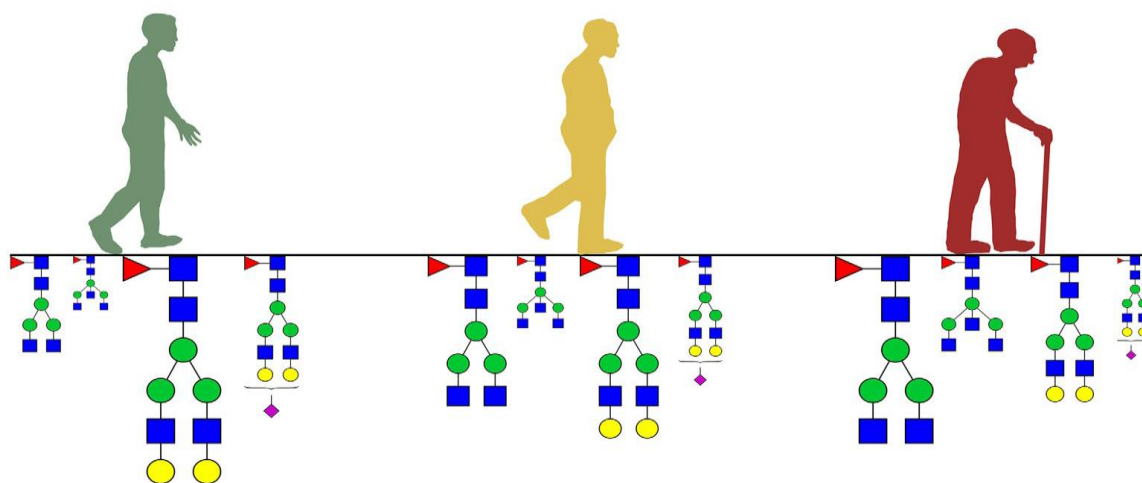
Ciljano modificiranje ekspresije gena koji imaju potencijalnu ulogu u glikozilaciji može imati veliku ulogu u istraživanju regulacije glikozilacije IgG-a, ali i u bioinženjerstvu promijenjenog IgG-a s ciljanim djelovanjem u terapijske svrhe (Mijakovac i sur. 2021; Zong i sur. 2017; Dekkers i sur. 2016).

1.3. Glikozilacija imunoglobulina G i starenje

Prve promjene IgG glikoma povezane sa starenjem uočene su prije više od 30 godina. Parekh i suradnici uočili su promjene galaktozilacije IgG-a povezane s dobi ispitanika (Parekh i sur. 1988). Udio galaktoziliranih struktura povećavao se do 25. godine nakon čega je uočen postepeni pad tj. povećanje udjela agalaktoziliranih struktura (Slika 3). Povećanje udjela agalaktoziliranih struktura tijekom starenja potvrđeno je i u nekoliko recentnijih studija (Baković i sur. 2013; Chen i sur. 2012; Pučić i sur. 2011). Promjene galaktozilacije tijekom djetinjstva i mladosti nisu potpuno jasne jer različite studije donose različite rezultate (Martinić Kavur i sur. 2021).

Osim promjena galaktozilacije, tijekom starenja mijenjaju se i neke druge glikanske strukture. Više je istraživanja potvrdilo porast udjela struktura s vezanim rasijecajućim GlcNAc kod ispitanika oba spola (Chen i sur. 2012; Shikata i sur. 1998). Nije potpuno jasno na koji način i mijenja li se fukozilacija tijekom starenja. U djece je potvrđeno smanjenje udjela fukoziliranih struktura tijekom odrastanja (Haan i sur. 2016), no u ispitanika odrasle dobi rezultati su kontradiktorni - dok neki pokazuju lagano povećanje udjela fukoziliranih struktura, drugi pak pokazuju smanjenje, a kod nekih nije došlo do promjene (Martinić Kavur i sur. 2021; Baković i sur. 2013; Chen i sur. 2012; Pučić i sur. 2011). Sijalinizacija se tijekom starenja ponaša kao galaktozilacija, te je uočen pad sijaliniziranih struktura (Slika 3; Baković i sur. 2013; Chen i sur. 2012; Pučić i sur. 2011). U navedenim studijama, osim starenja pokazana je i značajna uloga spolnih hormona u glikozilaciji IgG-a. To bi objasnilo određene razlike glikanskih profila muškaraca i žena, ali i velike promjene glikanskog profila u žena u perimenopauzi i postmenopauzi. Nedavno je istraživanje napravljeno u grupi prof. Zoldoš i prof. Lauca sugeriralo mogući molekularni mehanizam utjecaja spolnog hormona estradiola na promjenu glikozilacije IgG-a u žena postmenopauzalne dobi (Mijakovac i sur. 2021).

Chronic low grade inflammation



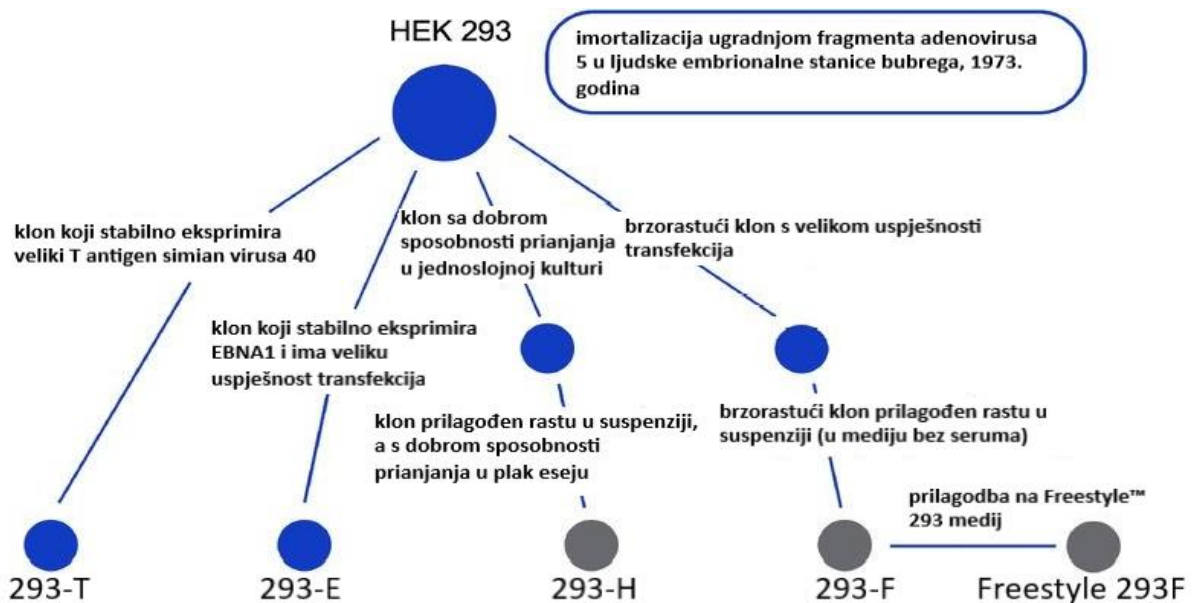
Slika 3. Promjene udjela različitih glikanskih struktura vezanih na IgG u korelaciji sa starenjem i povećanje kronične upale niske razine. Veličina prikazanih struktura proporcionalna je relativnoj učestalosti tih struktura u glikomu IgG-a čovjeka. Starenjem se smanjuje udio galaktoziliranih i sijaliniziranih struktura, a raste udio agalaktoziliranih struktura i struktura s vezanim rasijecajućim GlcNAc. Preuzeto iz Martinić Kavur i sur. (2021).

Sve navedene promjene koreliraju uz određena odstupanja s kronološkom starosti ispitanika te omogućuju relativno uspješno predviđanje kronološke dobi (Krištić i sur. 2014). No, ovdje je važno spomenuti i biološku starost koja predstavlja mjeru zdravlja i funkcionalnosti organizma, a koja je uvjetovana kombinacijom genskih i okolišnih čimbenika (Martinić Kavur i sur. 2021). Na biološko starenje znatno utječe kronična upala niske razine (od engl. *low grade chronic inflammation*), a velik dio promjena glikoma uočenih prilikom starenja, prvenstveno smanjenje galaktozilacije, povezan je upravo s upalnim procesima niske razine u organizmu. Teorija upalnog starenja (eng. *inflammaging*) povezuje upravo procese kronične upale niske razine sa starenjem (Dall’Olio i sur. 2013). Kronična upala nastaje kao posljedica cjeloživotne izloženosti vanjskim i unutarnjim čimbenicima (poput prekomjerne težine, hipertenzije i kardiometaboličkih poremećaja) što dovodi do neravnoteže između pro- i protuupalnih faktora. Povećanje udjela agalaktoziliranih struktura na IgG-u uzrokovano kronološkim starenjem u tim okolnostima dovodi do jačanja upale i stvaranja još više proupalnih struktura te nastaje upalni „začarani krug“. Na temelju toga može se zaključiti da je promjena glikozilacije IgG-a povezana ne samo s kronološkim, već i biološkim starenjem organizma te predstavlja dobar marker ovog procesa (Krištić i sur. 2014).

1.4. Stanična linija FreeStyle™ 293-F

Stanična linija HEK293 (od eng. *human embryonic kidney* 293) jedna je od najčešće korištenih staničnih linija za ekspresiju rekombinantnih proteina. Stanice su prvotno izolirane iz ljudskog ženskog fetusa te su 1973. godine imortalizirane ugradnjom fragmenta adenovirusa 5 unutar kromosoma 19 (Graham i sur. 1977). Ugrađeni fragment veličine je 4 tisuće parova baza te sadrži gene za proteine E1A i E1B koji inhibiraju apoptozu i interferiraju s regulatorima staničnog ciklusa što omogućava kontinuiranu kultivaciju ove stanične linije.

Tijekom godina, od originalne roditeljske linije uspostavljeno je više staničnih linija različitih karakteristika (Slika 4). Neke linije imaju ugrađene virusne gene čija ekspresija poboljšava sintezu rekombinantnih proteina, na primjer linija HEK293T (DuBridje i sur. 1987). Neke su linije prilagođene rastu u suspenziji u mediju bez seruma što omogućuje veliku gustoću rasta i uzgoj u bioreaktorima (Côté i sur. 1998; Graham 1987), na primjer HEK293-H, HEK293-F i FreeStyle™ 293-F. Linija 293-F stvorena je izolacijom klona koji je imao sposobnost brzog rasta i veliku uspješnost transfekcija te prilagodbom izoliranog klona na rast u suspenziji u mediju bez seruma. Prilagodbom te nove linije na rast u FreeStyle mediju dobivena je linija FreeStyle™ 293-F (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz nastanka različitih staničnih linija od izvorne linije HEK293. Prikazane su linije koje se danas koriste u istraživanjima poput 293-T i 293-E, a nastale su ugradnjom virusnih gena, dok su druge nastale selekcijom klonova s određenim prednostima poput brzog rasta i rasta u suspenziji, kao što su 293-H, 293-F i Freestyle 293-F. Preuzeto i prilagođeno prema Malm i sur. (2020).

Rast u suspenziji ovim linijama daje veliku prednost za uzgoj u velikim količinama i sintezu željenih proteina, a posljednjih se godina prepoznaje još jedna velika prednost novih linija, a to je ljudsko podrijetlo. Za razliku od stanične linije jajnika kineskog hrčka (eng. *chinese hamster ovary*, CHO), koja je dugo bila najčešće upotrebljavana stanična linija za sintezu monoklonskih antitijela u terapijske svrhe (Walsh 2018), linija HEK293 i iz nje izvedene linije sadrže aktivne određene enzime uključene u posttranslacijske modifikacije proteina, a koje nalazimo samo u stanicama ljudskog podrijetla. Primjer je α 2,6-sialiltransferaza, enzim uključen u glikozilaciju proteina, koji nalazimo u ljudskim stanicama, ali ne i u CHO (Lee i sur. 1989). Takve razlike u aktivnim enzimima dovode do razlika u strukturi i funkciji sintetiziranih proteina, prije svega imunoglobulina. Na primjer, IgG1 sintetiziran u stanicama HEK293-F ima različit glikanski profil te različito interagira s Fc receptorima u usporedbi s IgG1 sintetiziranim u stanicama CHO (Blundell i sur. 2020). Iz tog se razloga istraživanja i proizvodnja glikoziliranih proteina sve više usmjeravaju na ljudske stanične linije.

Osim što linija HEK293-F ima aktivne sve enzime potrebne za normalnu glikozilaciju ljudskih proteina, uključujući i IgG, pokazano je i da je i glikom IgG-a sintetiziranog u ovoj staničnoj liniji jako sličan glikomu IgG-a ljudske plazme (Dekkers i sur. 2016). Dekkers i sur. (2016) koristili su liniju FreeStyle™ 293-F za sintezu rekombinantnog IgG-a. Njihovi rezultati pokazuju da glikom IgG-a iz ove linije ima podjednaku razinu fukoze kao i serumski IgG, te nešto manje razine vezane galaktoze, sijalinske kiseline i rasijecajućeg GlcNAc. Još jedno recentno istraživanje pokazalo je da je linija FreeStyle™ 293-F dobra modelna linija za proučavanje glikoma ljudskog IgG-a. Mijakovac i sur. (2021) su upotrijebili ovu liniju za proučavanje uloge većeg broja gena u regulaciji glikozilacije IgG-a. Trenutni nedostatak modelne linije za proučavanje utjecaja starenja na promjene IgG glikoma, uz navedene upotrebe i dokazane prednosti linije FreeStyle™ 293-F nameću pitanje može li ova linija biti dobar model za istraživanja promjena glikoma usred starenja.

1.5. Metode istraživanja glikana

Prvi korak u analizi glikana je priprema i predtretman samih uzoraka, a o tom koraku uvelike ovise i kvaliteta same analize glikana. Priprema uzoraka može se pojednostavljeno podijeliti na nekoliko koraka: kemijsko ili enzimsko odvajanje glikana od proteina, izolacija i obilježavanje glikana, te po potrebi obogaćivanje i dodatno pročišćavanje uzoraka (Paton i sur. 2021).

Jedna od prvih metoda analize glikana temeljena je na upotrebi lektina, proteina koji vežu šećere. Lektini specifično vežu određene monosaharidne strukture što omogućuje relativnu uspješnu analizu izoliranih glikana, pogotovo u kombinaciji s fluorescentnom detekcijom signala (Paton i sur. 2021). Novije metode koje se koriste za analizu udjela pojedinih glikanskih struktura su tekućinska kromatografija i kapilarna elektroforeza. Obje se metode baziraju na različitom vremenu zadržavanja (retencije) pojedinih glikana zbog razlika u veličini, strukturi i naboju što dovodi do stvaranja različitih kromatografskih ili elektroforetskih vršaka (eng. *peaks*). Ako su glikani fluorescentno obilježeni, mjeri se intenzitet fluorescencije inducirane laserom koji je proporcionalan količini pojedine glikanske strukture u uzorku. Navedene metode pogodne su za analize velikog broja uzoraka gdje se može pretpostaviti da je sadržaj pojedinih vršaka stabilan (Martinić Kavur i sur. 2021).

Za određivanje same strukture glikana najbolji je izbor spektrometrija masa, no nedostatak metode je veća složenost opreme i potrebnih vještina. Moguće je i povezati spektrometriju masa s tekućinskom kromatografijom ili kapilarnom elektroforezom za određivanje struktura pojedinih vrškova (Martinić Kavur i sur. 2021). Četvrta metoda kojom je moguće odrediti primarnu strukturu glikana, ali i druge strukturne te dinamičke informacije, je nuklearna magnetna rezonanca (NMR). Prednost ove metode je očuvanje uzoraka i mala potrebna koncentracija za analizu, a u kombinaciji s drugim metodama moguće je dobiti puno preciznije strukture glikana (Paton i sur. 2021; Leeftang i Vliegthart 2012).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja utvrditi je dolazi li starenjem modelne stanične linije FreeStyle™ 293-F do promjena u glikozilaciji izlučenog imunoglobulina G, te mogu li se te promjene usporediti s promjenama IgG glikoma koje su posljedica starenja ljudskog organizma. Nadalje, ukoliko dolazi do promjena u glikozilaciji IgG-a, cilj je utvrditi jesu li te promjene izravna posljedica promjene ekspresije glikoziltransferaza koje su odgovorne za pojedine korake u procesu IgG-glikozilacije ili su promjene rezultat promjene u ekspresiji nekih drugih gena, GWAS hitova povezanih s glikozilacijom IgG-a, i/ili nekog drugog mehanizma regulacije glikozilacije.

Specifični ciljevi:

1. Uzgoj i pasažiranje stanica linije FreeStyle™ 293-F kroz dulji vremenski period te transfekcija stanica sustavom za ekspresiju IgG-a nakon svake 4 pasaže. Time će se dobiti stanice različite starosti koje će izlučivati molekule IgG-a za analizu glikana.
2. Provjera količine izlučenog IgG-a, te analiza glikana na IgG molekulama izlučenih iz stanica različite starosti.
3. Analiza ekspresije glikoziltransferaza ovisno o promjenama glikana na IgG molekulama izlučenim iz stanica različite starosti.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Komercijalni setovi kemikalija:

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka); TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Applied Biosystems™ Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Random Primer (hexadeoxyribonucleotide mix; TaKaRa, Tokio, Japan); Recombinant RNase Inhibitor (TaKaRa, Tokio, Japan); dNTP Mixture (TaKaRa, Tokio, Japan)

Enzimi:

PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/μL; TaKaRa, Tokio, Japan)

Plazmidi:

p3SVLT (Mijakovac i sur. 2021; Slika P1); pORF-hp21 (InvivoGen, San Diego, Kalifornija, SAD; Slika P1); pORF-hp27 (InvivoGen, San Diego, Kalifornija, SAD; Slika P2); plazmid s teškim i lakim lancem IgG-a (Mijakovac i sur. 2021; Slika P2)

Uređaji:

spektrofotometar NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Eve automated cell counter (NanoEntek, Seoul, Južna Koreja); 7500 Fast Real-Time PCR System machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); ProFlex™ 3 × 32-well PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka); Alliance Q9 Advanced Auto (Uvitec, Cambridge, UK); CO₂ inkubator Panasonic MCO-170AICUV-PE (Panasonic, Osaka, Japan); orbitalna tresilica PSU-20i (Biosan, Riga. Latvija)

Stanična linija:

FreeStyle™ 293-F (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

Ostalo:

293-Fectin, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific); 293 Expression Medium, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific); Opti-MEM Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific); 1 × PBS (100 ml/L 10 × PBS); Amersham Protan Nitrocellulose Blotting Membrane Premium 0,45 μm (GE Healthcare, Chicago, Illinois, SAD); Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka); PBST (1:1000 Tween u 1 × PBS); antitijelo Ab97225 Goat anti-human IgG-Fc (Abcam, Cambridge, Velika Britanija); Clarity Max Western ECL Substrate (Luminol Enhancer Solution i Peroxide Solution; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Alikvot stanica FreeStyle™ 293-F izvađen je iz spremnika s tekućim dušikom, kratko inkubiran u vodenoj kupelji na 37 °C, dok se stanice nisu odmrznule, te je 1 ml prebačen u tikvicu s 29 ml prethodno zagrijanog hranjivog medija 293 Expression Medium. Stanice su uzgajane na 37 °C u inkubatoru s 8%-tnim udjelom CO₂ u atmosferi na orbitalnoj tresilici s konstantnim miješanjem na 140 rpm. Stanice su presađivane (pasažirane) svaka 2 do 3 dana, kada bi dosegle gustoću od 1 do 2 milijuna stanica po mililitru. Broj stanica i vijabilnost određivani su upotrebom automatskog brojača stanica Eve ili Bürker-ove komorice i tripanskog modrila.

3.2.2. Transfekcija stanica

Stanice su transfecirane nakon svake četvrte pasaže, počevši od treće pasaže (kao nulte). Razmak između transfekcija bio je između 9 i 10 dana (ovisno o danima pasažiranja). Nakon brojanja stanica i određivanja vijabilnosti, na pločice za staničnu kulturu sa šest jažica nasadeno je po 1×10^6 stanica po jažici. Količine pojedinih plazmida određene su prema radu Vink i sur. (2013). Za što bolju ekspresiju IgG-a potrebno je izvršiti istovremenu transfekciju s plazmidom s genima za IgG (geni za laki i teški lanac IgG1, bez sekvence za mjesto glikozilacije unutar Fab regije) te s plazmidima p33SVLT, p21 i p27 u masenom omjeru 0,69/0,01/0,05/0,25. Kako bi u konačnici masa DNA za jednu transfekciju iznosila približno 2 µg, prema navedenom omjeru određena je masa pojedinih plazmida: 1,4 µg/ 20 ng/ 100 ng/ 500 ng (plazmid s IgG/ p33SVLT/ pORF-hp21/ pORF-hp27). Razrjeđenja koncentracije plazmida pripremljena su u 76 µl medija Opti-MEM. Masa transfekcijskog reagensa 293-Fectin po uputama proizvođača treba biti dvostruko veća od mase DNA pa je 4 µl Fectin-a razrijeđeno u 76 µl Opti-MEM-a i potom inkubirao 5 minuta uz neprestano protresanje. Kompleks Fectin-a i Opti-MEM-a potom je dodan u smjesu DNA i Opti-MEM-a koja je pritom neprestano miješana vorteksom. Dobivena smjesa inkubirana je 25 min te potom dodana na stanice u pločice sa 6 jažica. Stanice i supernatanti skupljani su pet dana nakon transfekcije. Cijeli sadržaj jažice prebačen je u epruvetu Eppendorf, centrifugiran 5 min na 4000 g te su potom odvojeni supernatanti koji su korišteni za analizu IgG glikoma od taloga koji je korišten za analizu ekspresije gena. Supernatanti su smrznuti na -20 °C, a talozi na -80 °C kako bi ostali intaktni do analize.

3.2.3. Analiza *dot blot*

Metodom *dot blot* provjerena je količina izlučenog IgG-a što je ujedno i mjera za uspješnost transfekcije stanica. Prvo je na nitroceluloznoj membrani označena shema kapanja uzoraka, a potom je membrana stavljena u plastičnu kadicu i prelivena s 1 × PBS-om. Nakon kratkog namakanja PBS je izliven, a membrana posušena papirom. Membrana je vraćena u kadicu i nanoseno je po 2 µl uzoraka, kontrola i ranije pripremljenih standarda. Kao kontrole korišteni su uzorci u kojima je već ranije dokazana dovoljna koncentracija IgG-a za daljnju analizu (pozitivna kontrola), uzorci u kojima je prisutan IgG-a, ali u nedovoljnoj koncentraciji za analizu glikana te goveđi albuminski serum kao negativna kontrola.

Za vrijeme sušenja uzoraka koji su nakapani na membranu, pripremljen je svježi PBST (deterđent Tween razrijeđen u PBS-u u omjeru 1:1000) te potom 5% -tno mlijeko u PBST-u (1,25 grama bezmasnog mlijeka u prahu otopljeno u 25 ml PBST-a). Membrana je prelivena mlijekom te inkubirana 30 minuta na tresilici na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta izliveno je mlijeko i membrana je prelivena s antitijelom na ljudski Fc fragment IgG-a obilježenim peroksidazom iz hrena (Ab97225, goat anti-human IgG-Fc, HRP) razrijeđenim u 5%-tnom mlijeku u omjeru 1:2000. Kadica je prekrivena aluminijskom folijom i inkubirana jedan sat na tresilici na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, otopina antitijela je izlivena, a membrana dvaput isprana s PBST-om. Potom je membrana prelivena s PBST-om i inkubirana 15 minuta na tresilici (prekrivena folijom). Isti je korak ponovljen još jednom, a potom je membrana kratko posušena papirom i prebačena u suhu kadicu. Membrana je ravnomjerno prekrivena s 2 ml reagensa za detekciju (smjesa luminola i vodikovog peroksida u omjeru 1:1) te inkubirana 5 minuta prekrivena folijom. Nakon inkubacije membrana je prebačena na prozirnu foliju i rezultati su vizualizirani pomoću uređaja Alliance Q9 Advanced Auto.

3.2.4. Izolacija ukupne stanične RNA i tretman DNazom

Za izolaciju ukupne RNA korišten je komplet RNeasy Mini Kit (QiaGen), a postupak je proveden prema uputama proizvođača uz manje preinake. U svaku je epruvetu s talozima stanica dodano 350 μ l pufera RLT te su epruvete dobro promiješane pomoću vorteksa, a potom je dodan isti volumen 70%-tnog etanola te je smjesa promiješana pipetiranjem. Po 700 μ l uzorka, uključujući nastale precipitate prebačeno je u kolonu RNeasy Mini spin koja je stavljena u kolekcijsku epruvetu od 2 ml. Potom su kolone centrifugirane 30 sekundi na 10000 g, a eluat je bačen. U svaku je kolonu dodano 700 μ l pufera RW1 te su kolone opet centrifugirane 30 s na 10000 g, a eluat je bačen. U sljedećem je koraku dodano po 500 μ l pufera RPE te su kolone ponovno centrifugirane 30 s na 10000 g, a eluat je opet bačen. Još jednom je dodano 500 μ l pufera RPE te su kolone ovoga puta centrifugirane 2 minute na 10000, a eluat je bačen. Kolone su potom prebačene u nove kolekcijske epruvete od 2 ml i centrifugirane 1 minutu na 14000 g kako bi se eluirao ostatak pufera i nevezanih frakcija. U sljedećem su koraku kolone prebačene u kolekcijske epruvete od 1,5 ml, dodano je po 50 μ l vode bez RNaze te su kolone centrifugirane 1 minutu na 10000 g kako bi se isprala vezana RNA. Koncentracije dobivenih RNA izmjerene su na uređaju NanoDrop8000.

Kako bi se uklonila zaostala stanična DNA, napravljen je tretman TURBO DNazom (Thermo Fischer Scientific). U svaku reakcijsku smjesu dodano je 3000 ng izolirane RNA, 0,5 μ l DNaze, 2,5 μ l pufera 10 \times Turbo DNase Buffer te destilirana voda do 25 μ l. Smjese su promiješane pipetiranjem te inkubirane 30 minuta na 37 °C. Potom je u smjese dodano po 2,5 μ l inaktivirajućeg agensa te su inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje Vorteksom. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 90 s na 10000 g, sakupljeni su supernatanti i ponovno su izmjerene koncentracije RNA na uređaju NanoDrop8000.

3.2.5. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija napravljena je upotrebom Prime Script RTase (TaKaRa). Najprije su pripremljena razrijeđena RNA kako bi masa RNA po reakciji iznosila 400 ng. U reakcijsku smjesu je osim 13 µl razrijeđene RNA dodan 1 µl nasumičnih heksamernih početnica (50 µM) i 1 µl mješavine dNTP (10 µM). Smjesa je inkubirana 5 min na 65 °C te zatim 5 min na ledu. Nakon inkubacije u početnu je reakcijsku smjesu dodano 5 µl druge reakcijske smjese u sastavu: 4 µl pufera 5 × Prime Script Buffer, 0,5 µl Prime Script RTase i 0,5 µl Recombinant RTase Inhibitor. Finalne smjese (dobivene miješanjem prve i druge reakcijske smjese) stavljene su u PCR uređaj na program: 30 °C – 10 min, 42 °C – 60 min, 70 °C – 15 min. Negativna kontrola reverzne transkripcije bila je reakcija bez dodane RNA (RNA-).

3.2.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

Metoda qPCR korištena je za određivanje promjene ekspresije pojedinih gena koji kodiraju glikoziltransferaze. Postoji više varijanti detekcije produkata umnažanja ovom metodom, a u ovom je istraživanju korištena tehnologija fluorescentnih interkalirajućih boja „SYBRGreen“.

Reakcijska smjesa sastojala se od 10 µl smjese „Power SYBR™ Green PCR Master Mix“, 0,1 µl *forward* početnice (10 µM) i 0,1 µl *reverse* početnice (10 µM) za ciljani gen, 8,8 µl dH₂O te 1 µl cDNA (5 ng). Geni čija je ekspresija analizirana su *B4GALT1*, *ST6GALI* i *FUT8*. Kao endogena kontrola korišteno je više gena, *HPRT1* koji kodira hipoksantin-guanin fosforibozil transferazu, *HMBS* koji kodira hidrosimetilbilan sintazu, *ACTB* koji kodira beta-aktin, *GUSB* koji kodira glukuronidazu beta te *PUM1* koji kodira RNA vezujući protein 1 iz porodice Pumilio (eng. *Pumilio RNA Binding Family Member 1*). Početnice korištene za umnažanje gena od interesa i endogenih kontrola navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Početnice korištene u kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom

Početnice	Sekvenca početnice (5' – 3')
HPRT1 FW	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT
HPRT1 REV	AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA
HMBS_FW	AGCTTGCTCGCATAACAGACG
HMBS_REV	AGCTCCTTGGTAAACAGGCTT
B4GALT1_FW_3	CCAGGCGGGAGACACTATATT
B4GALT1_REV_3	CACCTGTACGCATTATGGTCAT
ST6GAL1_FW_2	CTACCACCCGCTGCTCTATG
ST6GAL1_REV_2	GTGTGGCTTTTCCAAGCAGG
FUT8_FW	AACTGGTTCAGCGGAGAATAAC
FUT8_REV	TGAGATTCCAAGATGAGTGTTTCG
PUM1_FW1	CGGTCGTCCTGAGGATAAAA
PUM1_REV1	CGTACGTGAGGCGTGAGTAA
PUM1_FW2	GGCATGGAGCCTCTTCAGTT
PUM1_REV2	ACAGCAAGCGCATTAGGTCT
PUM1_FW3	GCGGGAGATTGCTGGACATA
PUM1_REV3	ACCATGAGTTGGTAGGCAGC
GUSB_FW1	CCACGGTGTCAACAAGCAT
GUSB_REV1	GCGGGGGACCGGGAA
GUSB_FW2	TTGAAGCTGGAGGGAACTGG
GUSB_REV2	GCGGGGGACCGGGAA
GUSB_FW3	CTCTCCTGGGGGTACAGCAT
GUSB_REV3	CCAACCGCGAGAAGATGA
ACTB_FW1	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
ACTB_FW2	GGATTCCTATGTGGGCGACGA
ACTB_REV2	GCGTACAGGGATAGCACAGC
ACTB_FW3	CTTCGCGGGCGACGAT
ACTB_REV3	CCACATAGGAATCCTTCTGACC

Prvo je u pločicu za qPCR s 96 bazenčića ispipetirano 19 μ l smjese početnica, dH₂O i smjese Master Mix te je zatim dodan 1 μ l cDNA. Za svaki su uzorak rađene dvije tehničke replike. Za svaki su gen rađene i dvije negativne kontrole, negativna kontrola reverzne transkripcije (RNA-, opisano u 3.2.5.) i negativna kontrola qPCR reakcije u koju je umjesto cDNA dodana dH₂O. Također je napravljena kontrola tretmana DNazom tako što je u reakcijsku smjesu umjesto cDNA dodana RNA nakon tretmana kako bi se provjerilo postoji li zaostala DNA koja bi se mogla umnožiti. Broj ciklusa reakcije qPCR iznosio je 45, a vrijeme elongacije 30 sekundi.

Rezultati analize qPCR obrađeni su metodom $\Delta\Delta Ct$, a kao referentni uzorak korištena je prva pasaža. Kako su za svaku biološku repliku rađene dvije tehničke replike, prvo je izračunata srednja vrijednost Ct za svaku biološku repliku. Dobivene srednje vrijednosti Ct za gene *B4GALT1*, *ST6GAL1* ili *FUT8* normalizirane su u odnosu na srednju vrijednost Ct endogene kontrole odgovarajuće biološke replike, kako bi se dobila vrijednost ΔCt . Potom je izračunata srednja vrijednost ΔCt za svaku biološku skupinu, koja je normalizirana u odnosu na srednju vrijednost ΔCt referentne skupine. Dobivene vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ korištene su za izračunavanje faktora promjene ekspresije gena FC (engl. *fold change*).

3.2.7. Izolacija molekula IgG, fluorescentno označavanje i razdvajanje glikana

Izolacija i analiza IgG-a napravljena je u suradnji s tvrtkom Genos d.o.o (sve do izračuna deriviranih svojstava i statističke obrade podataka). IgG je izoliran upotrebom agaroznih kuglica s imobiliziranim proteinom G (*Protein G Agarose fast flow beads*, Merck, Njemačka). Kuglice su triput isprane s $10 \times$ volumena $1 \times$ PBS-om. Potom su resuspendirane u PBS-u, centrifugirane 10 s na 150 g te je potom uklonjen supernatant. Nakon trećeg ispiranja kuglice su resuspendirane u PBS-u te je dobivena smjesa u omjeru 50:50 (v/v). Supernatanti sakupljeni nakon transfekcija pomiješani su s jednakim volumenom PBS-a i 40 μ l smjese kuglica u epruveti volumena 5 ml. Nakon resuspendiranja pipetiranjem, uzorci su inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Tijekom inkubacije uzorci su dvaput resuspendirani pipetiranjem. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 10 s na 150 g te je uklonjen sav supernatant. Kuglice su isprane triput s 300 μ l $1 \times$ PBS-a te triput s 300 μ l vode visoke čistoće (eng. *ultrapure water*) kako bi se uklonili nespecifično vezani proteini. Vezani IgG ispran je inkubacijom kuglica u 100 μ l 0,1 M mravlje kiseline 15 min na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Isprani IgG je neutraliziran sa 17 μ l 1 M amonijevog bikarbonata. Uzorci su potom osušeni u vakuumskom evaporatoru.

Kako bi se glikani odvojili od IgG-a, najprije je u svaki uzorak dodano 30 μ l 1.33% (w/v) SDS-a, uzorci su resuspendirani pipetiranjem, pokriveni ljepljivom folijom te su inkubirani 10 minuta na 65°C. Nakon toga uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu te je dodano 10 μ l 4% (v/v) Igepal-CA630 (Merck, Njemačka) kako bi se neutralizirao višak SDS-a. Potom je uzorcima dodano 10 μ l 5 \times PBS-a s 1,2 U enzima PNGase F (Promega, SAD), poklopljeni su ljepljivom folijom te inkubirani 18 h na 37°C.

Nakon odvajanja od IgG-a, glikani su fluorescentno obilježeni prokainamidom. Obilježavanje je provedeno u dva koraka. U prvom je koraku svakom uzorku dodano 25 µl otopine za obilježavanje u sastavu prokainamid klorid koncentracije 172.8 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, USA) otopljen u smjesi DMSO-a (Merck, Njemačka) i ledene octene kiseline (Merck, Njemačka) (70:30, v/v). Uzorci su inkubirani 1 h na 65°C. U sljedećem je koraku po uzorku dodano 25 µl otopine u sastavu: 2-pikolin boran koncentracije 179.2 mg/ml otopljen smjesi DMSO-a i ledene octene kiseline (70:30, v/v). Uzorci su inkubirani 1,5 h na 65°C. Ostatak nevezanih fluorescentnih oznaka i otapala uklonjeni su metodom tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography solid-phase extraction*, HILIC-SPE) upotrebom filter pločice 0.2 µm GHP filter plate (Pall Corporation, SAD). Glikani su isprani s kolone ultrapročišćenom vodom. Glikani su odvojeni tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (eng. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC) na uređaju Waters Acquity UPLC (Waters, SAD).

Dobiveni kromatogrami obrađeni su automatskom integracijom koja je za svaki uzorak ručno doradana, a udio pojedine glikanske strukture (kromatografskih vršaka) izražen je kao postotak ukupne integrirane površine.

Derivirana svojstva (glikani određenih zajedničkih karakteristika, na primjer s vezanim rasijecajućim GlcNAc) dobivena su zbrajanjem udjela površina svih vrškova čije pridružene glikanske strukture imaju traženu karakteristiku (Tablica 2).

Tablica 2. Derivirana svojstva uz pridružen opis i kromatografske vrškove (GP) koji su pridruženi pojedinom svojstvu

Derivirano svojstvo	Opis svojstva	Uključeni kromatografski vršci
A	Udio agalaktoziliranih struktura u ukupnom glikomu IgG-a	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6
G	Udio galatoziliranih glikana u ukupnom glikomu IgG-a	GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24
S	Udio sijaliniziranih glikana (mono- i di-) u ukupnom glikomu IgG-a	GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24
F	Udio glikana koji sadrže sržnu fukozu u ukupnom glikomu IgG-a	GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24
B	Udio glikana koji sadrže rasijecajući GlcNAc u ukupnom glikomu IgG-a	GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24

3.2.8. Statistička obrada podataka

Rezultati analize glikana metodom UPLC obrađeni su testom ANOVA *s post hoc* testom Tukey u programu GraphPad Prism kako bi se odredilo je li došlo do statistički značajne promjene udjela određenih glikanskih struktura starenjem stanica.

Rezultati analize ekspresije gena metodom qPCR obrađeni su testom Kruskal-Wallis *s post hoc* testom Dunn u program GraphPad Prism kako bi se odredilo je li došlo do značajne promjene u ekspresiji pojedinih glikoziltransferaza.

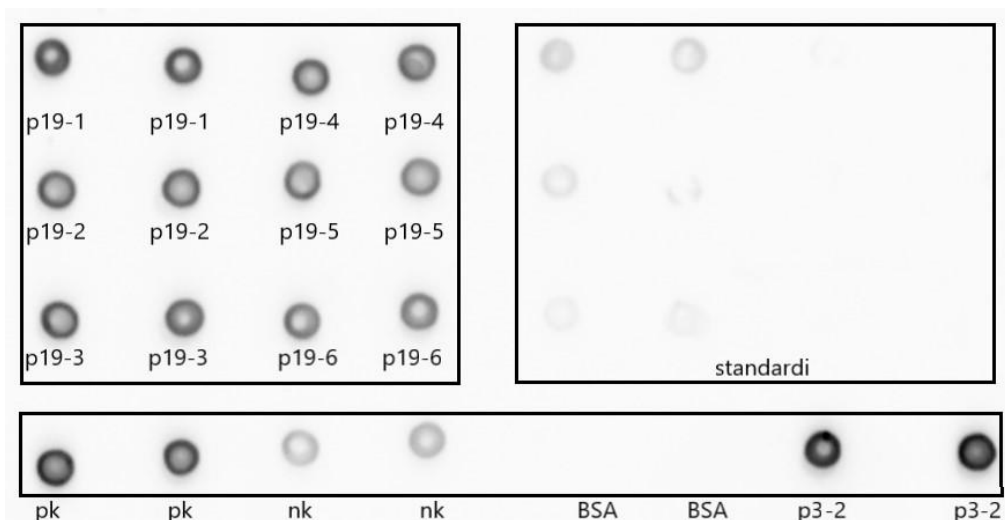
4. REZULTATI

4.1. Uzgoj i transfekcija stanica FreeStyle™ 293-F te kvantifikacija izlučenih molekula IgG

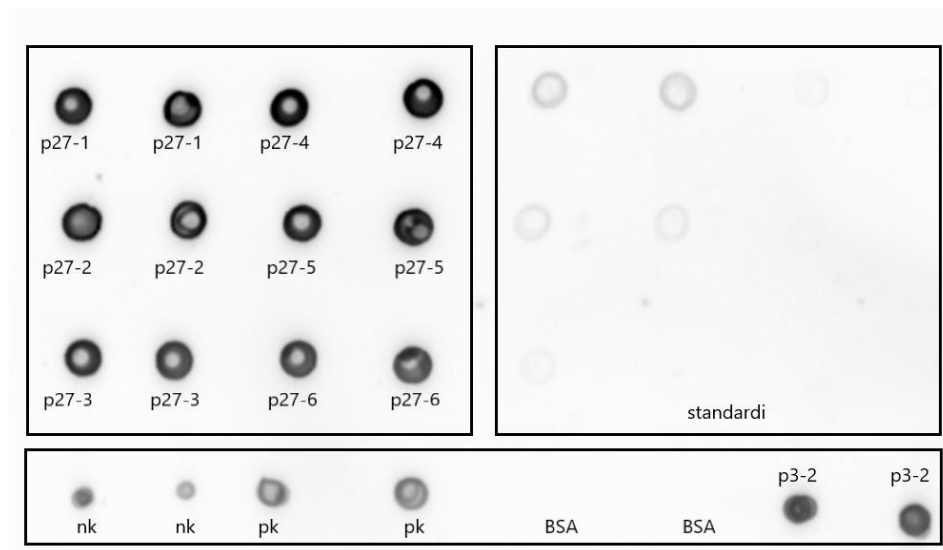
Stanice su presađene 39 puta prije nego što im je vijabilnost pala ispod 90% što se smatra prestankom log faze rasta, te stanice tada više nisu prikladne za transfekciju prema uputama proizvođača (Thermo Fisher Scientific 2020). Ukupno su analizirani glikani sakupljeni nakon devet transfekcija. Od odmrzavanja stanica do prve transfekcije (treće pasaže) prošlo je sedam dana, a od prve do devete transfekcije prošlo je 75 dana. Na temelju broja stanica (brojane su prije svake pasaže) i poznatog vremenskog perioda između dviju pasaža određeno je vrijeme udvostručenja stanica koje iznosi 23,87 sati (\pm 3,69 sati). Ovaj podatak je u skladu s uputama proizvođača prema kojima je vrijeme udvostručenja stanica FreeStyle™ 293-F između 22 i 28 sati (Thermo Fisher Scientific 2020). Iz navedenog se može zaključiti da je broj dioba stanica otprilike jednak broju dana trajanja eksperimenta. Treba napomenuti da se vrijeme udvostručenja nije mijenjalo starenjem stanica već je bilo prilično ujednačeno kroz cijeli eksperiment.

Količina IgG-a provjerena je metodom *dot blot*. Analizirani su supernatanti od prve do osme transfekcije. Rezultati *dot blot*-ova analizirani su u programu ImageJ (ImageJ, Ver 1.53 k, NIH, United States) mjerenjem integrirane optičke gustoće točaka (OD) nakon automatskog uklanjanja pozadinskog signala. Količina glikana nakon pojedinih transfekcija relativno su kvantificirane kako bi se odredila uspješnost pojedine transfekcije u odnosu na ostale, te kako bi se utvrdilo je li količina molekula IgG u supernatantima dovoljna za analize glikana. Radi lakše usporedbe količina sakupljenog IgG između različitih transfekcija, uz navedene standarde i kontrole na svaku je membranu nanesen i uzorak supernatanta sakupljenog nakon prve transfekcije (p3-1 ili p3-2).

Detekcijom i relativnom kvantifikacijom glikana iz supernatanta utvrđeno je da su sve transfekcije bile uspješne, te su količine glikana veće nego u kontroli za koju je otprije poznato da sadrži IgG, ali u nedovoljnoj količini za analizu vezanih glikana (Slika 5). Najmanje količine IgG-a detektirane su u supernatantima stanica transfeciranih nakon 19. pasaže (Slika 5), a najviše IgG-a detektirano je u supernatantima stanica transfeciranih nakon 27. pasaže (Slika 6).

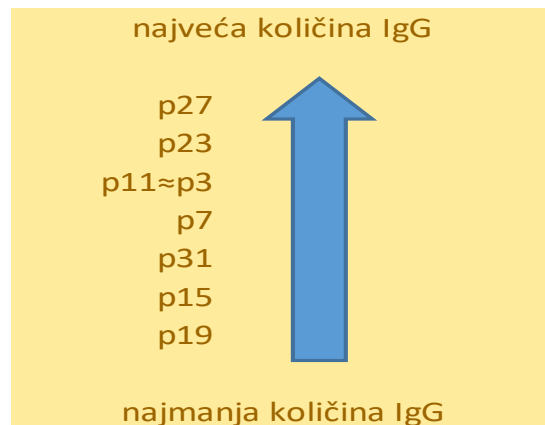


Slika 5. Membrana s uzorcima supernatanata transfekcije stanica 19. pasaže. U supernatantima stanica transfeciranih nakon 19. pasaže količina IgG-a manja je nego u pozitivnoj kontroli (pk) i uzorcima 3. pasaže (p3-2), no veća je nego u uzorcima supernatanta koji predstavljaju negativnu kontrolu (nk). BSA-goveđi serumski albumin, negativna kontrola specifičnosti vezanja korištenih antitijela na IgG.



Slika 6. Membrana s uzorcima supernatanata transfekcije stanica 27. pasaže. U supernatantima stanica transfeciranih nakon 27. pasaže utvrđena je najveća količina IgG-a. BSA-goveđi serumski albumin; nk-negativna kontrola; pk-pozitivna kontrola; p3-2-supernatant sakupljen nakon prve transfekcije stanica.

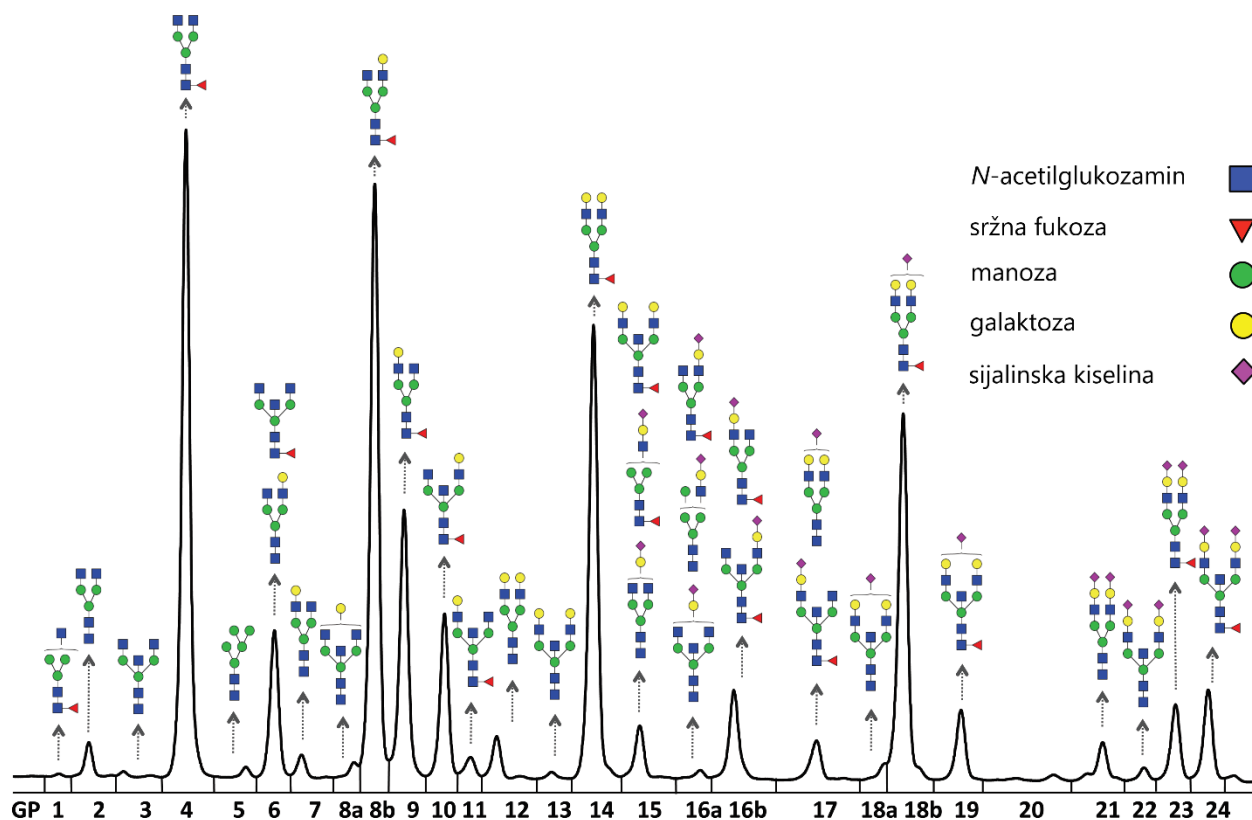
Supernatanti preostalih transfekcija sadržavali su različite količine IgG, a nakon usporedbe poredani su po količinama detektiranih molekula IgG (Slika 7).



Slika 7. Poredak transfekcija prema količini detektiranih molekula IgG prisutnih u supernatantima. Najveća količina molekula IgG detektirana je u supernatantima transfekcije 27. pasaže, a najmanje u supernatantima transfekcije 19. pasaže. Supernatanti transfekcija 11. i 3. pasaže sadržavali su podjednake količine IgG.

4.2. Promjene IgG glikoma tijekom starenja stanica

Analizirani su glikani iz devet različitih vremenskih točaka, a u svakoj je točki bilo šest replika. Analizom glikana metodom UPLC dobiveni su kromatogrami koji su podijeljeni na 24 različita vrška na isti način kao i kromatogrami glikana IgG-a iz ljudskog seruma (Slika 8). Svakom su kromatografskom vršku pridružene odgovarajuće glikanske strukture te su izračunati omjeri površine vrška naspram cijele integrirane površine kromatograma (Tablica P1). Udjeli glikanskih struktura sa zajedničkim karakteristikama svrstani su zajedno (derivirana svojstva). Promatrano je pet različitih glikanskih komponenti i njihove promjene starenjem stanica: galaktozilacija, agalaktozilacija, sijalinizacija, sržna fukozilacija, te vezanje rasijecajućeg GlcNAc.



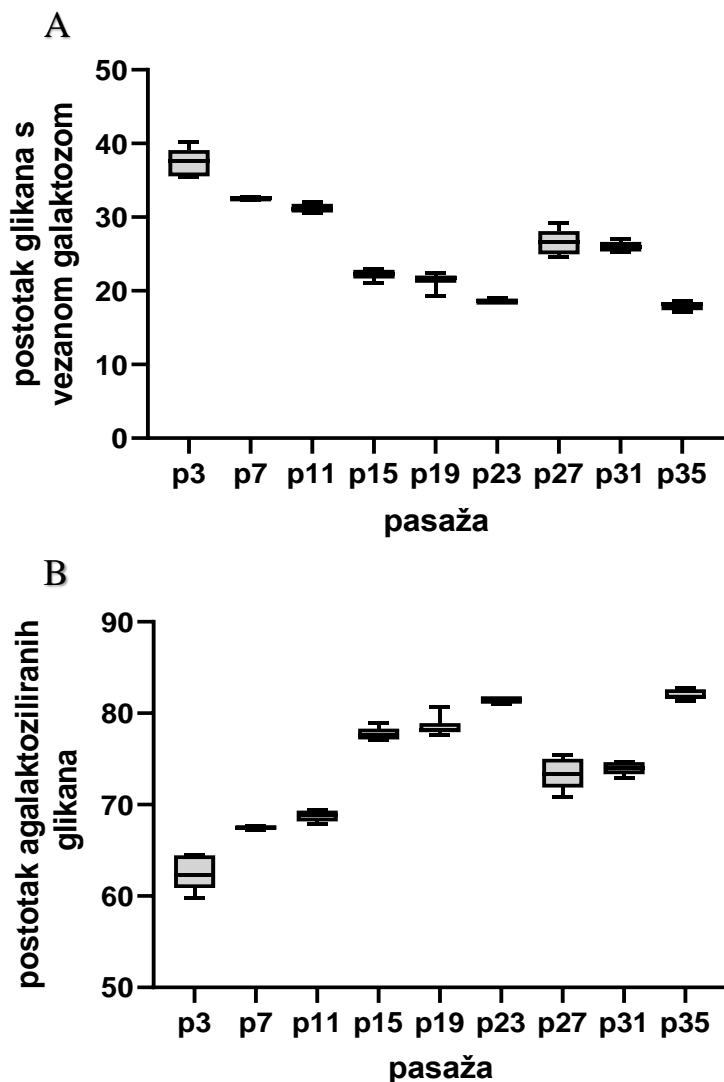
Slika 8. Kromatogram fluorescentno obilježenih glikana prisutnih na molekulama IgG-a iz ljudskog seruma. Svakom su kromatografskom vršku pridružene moguće glikanske strukture. Preuzeto i prilagođeno prema Krištić i sur. 2014.

4.2.1. Galaktozilacija i agalaktozilirani glikani

Već je na prvi pogled vidljiva velika promjena u udjelu glikana koji imaju vezanu jednu ili dvije galaktozne jedinice na glikansku strukturu (Slika 9). U mladim stanicama (p3), galaktozilirano je od 35 do 40% svih glikana glikoma stanica FreeStyle™ 293-F. Na molekulama IgG-a izlučenih iz stanica nakon svake sljedeće transfekcije udio galaktoziliranih glikana značajno se smanjuje ($p < 0,05$) sve do 23. pasaže kada je manje od 20% glikana galaktozilirano. Zatim dolazi do značajnog porasta galaktoziliranih glikana te je u 27. pasaži galaktozilirano između 25 i 30% glikana. Treba istaknuti da je i količina IgG-a izoliranog nakon transfekcije 27. pasaže najveća u usporedbi s ostalim transfekcijama. Povećani udio galaktoziliranih glikana prisutan je i u 31. pasaži, a potom je opet uslijedio pad te je udio galaktoziliranih glikana u 35. pasaži otprilike jednak onome u 23. pasaži, odnosno iznosi manje od 20%. U nekim je replikama udio galaktoziliranih

glikana i manji nego u 23. pasaži (< 18% galaktoziliranih glikana) no ta razlika nije statistički značajna.

Od svih galaktoziliranih struktura, najviše postotak (preko 50% svih galaktoziliranih struktura) čine monogalaktozilirani glikani s vezanom sržnom fukozom (kromatografski vršak 8).

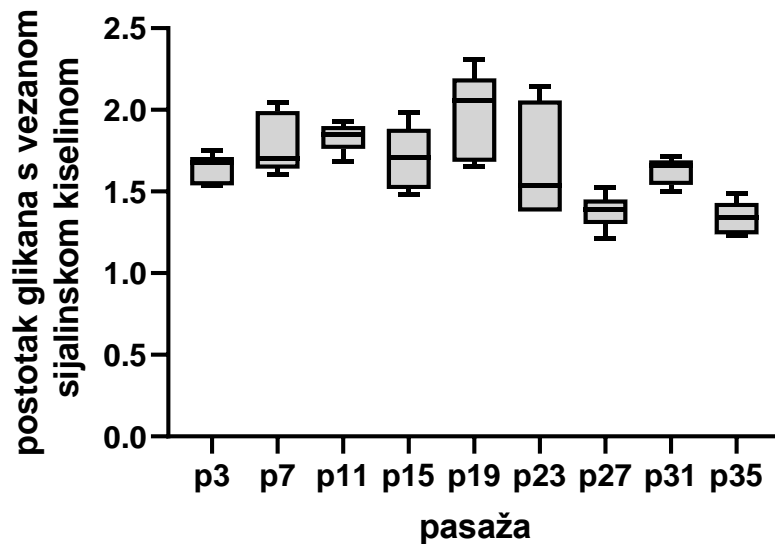


Slika 9. Prikaz promjene udjela galaktoziliranih i agalaktoziliranih glikana kroz vrijeme. Glikani IgG-a sintetiziranog u stanicama FreeStyle™ 293-F različite starosti analizirani su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, a statistička značajnost promjena određena je testom ANOVA. A) Promjena udjela galaktoziliranih glikana kroz vrijeme. Udio galaktoziliranih glikana značajno se smanjuje, $p < 0,05$ B) Promjena udjela agalaktoziliranih glikana kroz vrijeme. Udio agalaktoziliranih glikana značajno raste starenjem stanica, $p < 0,05$.

Udio agalaktoziliranih glikana mijenja se suprotno od udjela galaktoziliranih. Najmanje agalaktoziliranih glikana prisutno je u mladim stanicama (p3), iako je i tada više od 60% svih glikana agalaktozilirano (Slika 9). Starenjem stanica dolazi do porasta udjela glikana bez vezane galaktoze i to je najizraženije u stanicama pasaže 23. U pasažama 27. i 31 primijećeno je smanjenja udjela agalaktoziliranih glikana ($p > 0,05$), međutim porast je ponovo zabilježen u pasaži 35 gdje je zabilježeno preko 80% agalaktoziliranih glikana. Među agalaktoziliranim strukturama najveći udio čine glikani s dva vezana antenarna GlcNAc i sržnom fukozom (kromatografski vršak 4). To je ujedno i najzastupljenija glikanska struktura u cijelom glikomu IgG stanica FreeStyle™ 293-F, s udjelom između 55% i 75%. Uočene promjene u udjelu agalaktoziliranih glikana najvećim su dijelom posljedica promjena udjela ove glikanske strukture tijekom starenja stanica.

4.2.2. Sijalinizacija

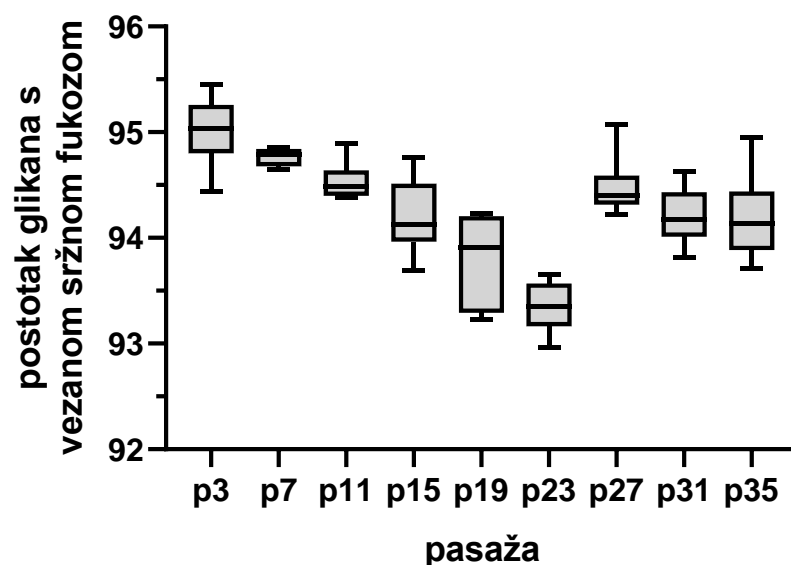
Udio sijaliniziranih struktura (mono- i di-) čini jako mali dio ukupnih glikana IgG-a sintetiziranog u ovoj staničnoj liniji, koji iznosi svega nekoliko posto. Sijalinizacija je tijekom dužeg perioda, sve do 27. pasaže, stabilna i ne dolazi do značajnih promjena iako je u nekim pasažama za pojedine replike vidljivo blago povećanje udjela sijaliniziranih glikana iznad 2% (Slika 10). Prva značajna promjena vidljiva je u pasaži 27 kada udio sijaliniziranih struktura pada ispod 1,5%. Iako je u pasaži 31 taj udio nešto veći, ne dolazi do značajne promjene ($p > 0,05$), a u posljednjoj, 35. pasaži, udio sijaliniziranih struktura opet je manji od 1,5%. Kako je većem broju kromatografskih vršaka pridruženo više mogućih struktura, nije moguće zaključiti koja je sijalinizirana glikanska struktura najučestalija.



Slika 10. Prikaz promjena udjela sijaliniziranih glikana kroz vrijeme. Glikani IgG-a sintetiziranog u stanicama FreeStyle™ 293-F različite starosti analizirani su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, a statistička značajnost promjena određena je testom ANOVA. Udio sijaliniziranih glikana značajno se smanjio u starim stanicama, tj. pasažama p27 i p35, $p < 0,05$.

4.3.3. Sržna fukozilacija

Približno 95% glikana vezanih za IgG sintetiziran u staničnoj liniji FreeStyle™ 293-F ima vezanu sržnu fukožu (Slika 11). Najveći postotak fukoziliranih glikana čine agalaktozilirani glikani koji imaju samo dva antenarna GlcNAc i sržnu fukožu (kromatografski vršak 4). Starenjem stanica dolazi do malog, ali značajnog smanjenja fukozilacije koje je najizraženije u 23. pasaži. U ovoj pasaži je zabilježeno 93-93,5% fukoziliranih glikana. Tada, baš kao što je slučaj i s galaktozilacijom, dolazi do značajnog porasta fukozilacije koji je najizraženiji u pasaži 27. U sljedećim pasažama naizgled dolazi do ponovnog smanjenja fukozilacije, no to smanjenje nije značajno ($p = 0,811$) kao što je slučaj s ranije opisanim ponovnim smanjenjem galaktozilacije.

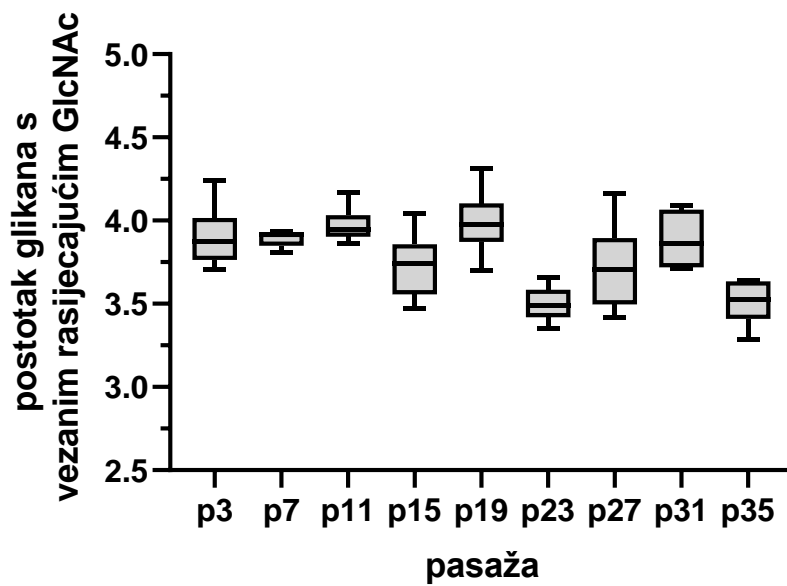


Slika 11. Prikaz promjena udjela glikana sa sržnom fukozom kroz vrijeme. Glikani IgG-a sintetiziranog u stanicama FreeStyle™ 293-F različite starosti analizirani su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, a statistička značajnost promjena određena je testom ANOVA. Starenjem stanica značajno se smanjuje udio fukoziliranih glikana ($p < 0,05$) te je najmanje fukoziliranih glikana zabilježeno u pasaži 23.

4.3.3. Rasijecajući *N*-acetilglukozamin

Svega nekoliko posto svih glikana IgG sintetiziranog u staničnoj liniji FreeStyle™ 293-ima vezani rasijecajući GlcNAc (Slika 12). Udio glikana s ovom modifikacijom relativno je stabilan kroz vrijeme i vidljive su samo dvije značajne točke smanjenja - pasaža 23 kada udio glikana pada s 4 na 3,5%, te pasaža 35 kada se udio opet smanjuje s 4 na otprilike 3,5%. Oba smanjenja, iako značajna, daleko su manja od opisane promjene galaktozilacije, pa čak i fukozilacije.

Prema zastupljenosti pojedinih glikanskih struktura s ovom modifikacijom, najveći postotak čine agalaktozilirani i sržno fukozilirani glikani koji imaju dva antenarna GlcNAc te treći račvajući (kromatografski vršak 6).



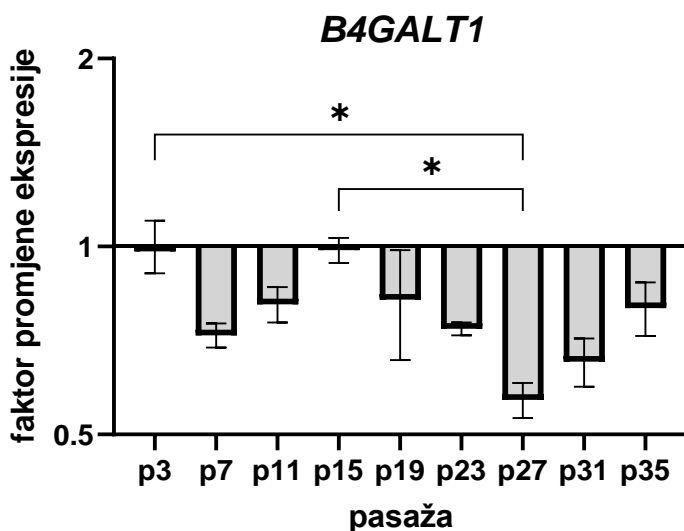
Slika 12. Prikaz promjena udjela glikana s rasijecajućim GlcNAc kroz vrijeme. Glikani IgG-a sintetiziranog u stanicama FreeStyle™ 293-F različite starosti analizirani su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, a statistička značajnost promjena određena je testom ANOVA. Značajne promjene glikana s rasijecajućim GlcNAc ($p < 0,05$) vidljive su u pasažama 23 i 35.

4.3. Promjene ekspresije glikoziltransferaza

Na temelju uočenih promjena pojedinih glikana, odabrana su tri gena koja kodiraju glikoziltransferaze koje sudjeluju u glikozilaciji IgG-a, a kako bi se utvrdilo jesu li uočene promjene izravna posljedica promjene ekspresije tih gena. Kvantitativnim PCR-om analizirana je ekspresija gena *FUT8*, *B4GALTI* i *ST6GALI* u istim vremenskim točkama kad i glikani. Kao endogena kontrola najprije je korišten gen *HPRT1*. No, uočeno je da se starenjem stanične linije FreeStyle™ 293-F znatno mijenja ekspresija ovog gena te nije moguće dobiti pouzdane rezultate o promjeni ekspresije istraživanih glikoziltransferaza. Nakon testiranja više gena koji se upotrebljavaju kao endogene kontrole (*HMBS*, *ACTB*, *GUSB* i *PUM1*) odabran je gen *PUM1* jer je za njega uočena najmanja razlika Ct vrijednosti kroz duži vremenski period te je usporedbom Ct vrijednosti svih testiranih gena i Ct vrijednosti *HPRT1* upravo s *PUM1* dobiven najveći faktor promjene ekspresije FC (eng. *fold change*) za *HPRT1*.

4.3.1. *B4GALT1*

Gen *B4GALT1* kodira enzim beta-1,4-galaktoziltransferazu 1 koji dodaje galaktozu na antenarne GlcNAc. Tijekom promatranog vremenskog perioda dolazi do značajne promjene u ekspresiji *B4GALT1* ($p < 0,05$), no te promjene ne prate promjene galaktozilacije glikana koje su prethodno opisane. Već u drugoj transfekciji (p7) vidljiv je velik pad u ekspresiji ovog gena (Slika 13) što je u skladu i s promjenom glikoma IgG (Slika 9A). No, tada slijedi porast sve do početne razine ekspresije u p15 što se ne poklapa s konstantnim padom udjela galaktoziliranih glikana do te vremenske točke. Potom slijedi drugi, veći pad razine ekspresije čija je vrijednost najmanja u p27, kada je uočen porast udjela galaktoziliranih glikana. U zadnjim pasažama slijedi porast ekspresije *B4GALT1* što opet nije u skladu s uočenim promjenama glikana jer se tada smanjuje udio galaktoziliranih glikana (Slika 9A).

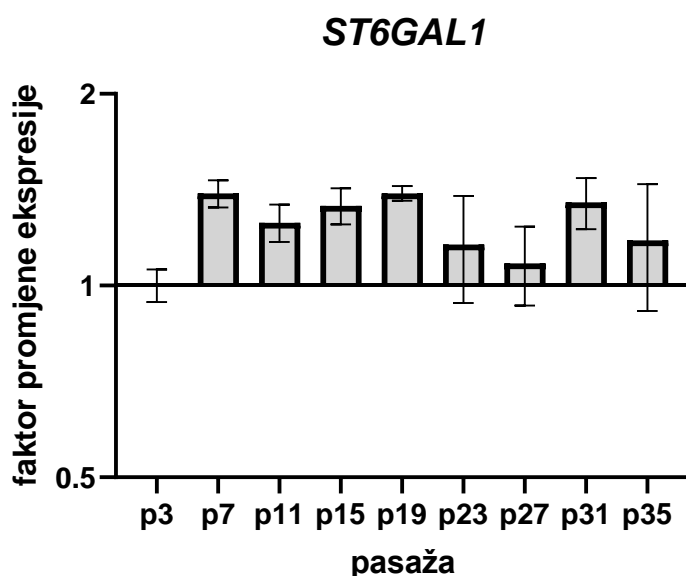


Slika 13. Promjene ekspresije gena *B4GALT1* tijekom starenja stanica FreeStyle™ 293-F. Kao endogena kontrola korišten je gen *PUM1*, a kao referentni uzorak s kojim su uspoređivane sve ostale pasaže korištena je pasaža 3 (p3). * označava statističku značajnost $p < 0,05$

4.3.2. *ST6GALI*

Gen *ST6GALI* kodira enzim beta-galaktozidaza alfa-2,6-sialiltransferazu 1 koji dodaje sialinsku kiselinu na antenarne galaktoze. Iako su opisane promjene sialinizacije glikana statistički neznačajne, u nekim je replikama uočen blagi porast razina sialinizacije te je iz tog razloga analizirana i ekspresija *ST6GALI*.

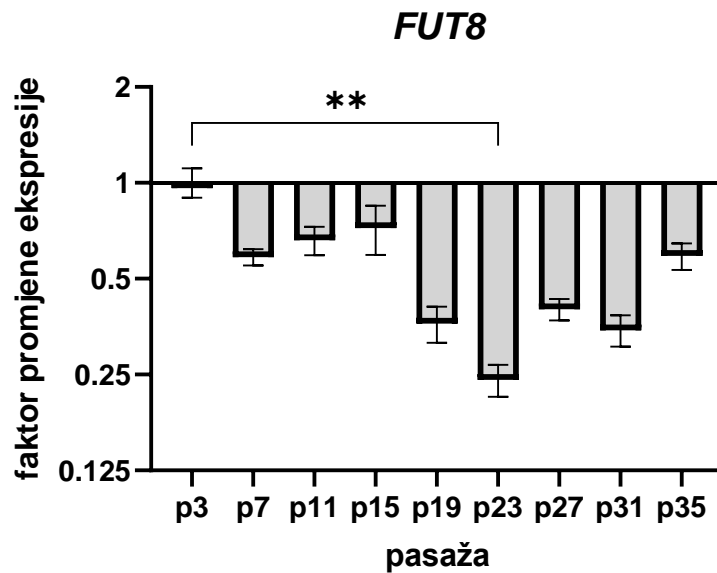
Iako promjena ekspresije *ST6GAL1* nije bila statistički značajna u nekim točkama ipak dolazi do porasta vrijednosti ekspresije ovog gena (Slika 14), što prati promjene siljaliniziranih glikanskih struktura (Slika 10). Također je vidljiva i velika razlika u dobivenim vrijednostima između pojedinih replika što, uz mali broj replika, otežava tumačenje dobivenih rezultata i statističku potvrdu značajnosti uočenih promjena.



Slika 14. Promjene ekspresije gena *ST6GAL1* tijekom starenja stanica FreeStyle™ 293-F. Kao endogena kontrola korišten je gen *PUM1*, a kao referentni uzorak s kojim su uspoređivane sve ostale pasaže korištena je pasaža 3 (p3). Nema statistički značajnih promjena ekspresije.

4.3.3. *FUT8*

Gen *FUT8* kodira enzim fukoziltransferazu 8 koji dodaje fukozu na sržni GlcNAc. Ekspresija *FUT8* značajno se mijenja starenjem. Već u pasaži 7 dolazi do velikog pada u ekspresiji, potom kroz sljedećih nekoliko pasaža do blagog porasta (Slika 15), nakon čega slijedi još veći pad koji je najizraženiji u pasaži 23. Taj se pad poklapa s uočenim značajnim smanjenjem fukozilacije glikana koje je također najveće u pasaži 23 (Slika 11). U posljednjim pasažama dolazi do novog porasta ekspresije koji je najveći u pasaži 35, no i dalje ekspresija ne doseže razinu iz prve transfekcije (p3).



Slika 15. Promjene ekspresije gena *FUT8* tijekom starenja stanica FreeStyle™ 293-F. Kao endogena kontrola korišten je gen *PUM1*, a kao referentni uzorak s kojim su uspoređivane sve ostale pasaže korištena je pasaža 3 (p3). ** označava statističku značajnost $p < 0,01$

5. RASPRAVA

Glikani vezani za IgG znatno utječu na njegovu funkciju te je svaka promjena u glikozilaciji IgG-a važna u regulaciji imunog odgovora. Starenjem organizma potvrđene su brojne promjene koje posljedično dovode do promjena u imunom odgovoru. Iako su prve promjene povezane sa starenjem otkrivene prije više desetljeća, i dalje ostaju brojna neodgovorena pitanja vezana za regulaciju glikozilacije IgG-a i utjecaja starenja na IgG glikozilaciju.

Dobiveni rezultati ovim istraživanjem pokazuju da starenje stanica modelne stanične linije FreeStyle™ 293-F utječe na glikom izlučenog IgG-a. Najveće promjene očituju se u udjelu galaktoziliranih odnosno agalaktoziliranih glikana što je ujedno i obilježje IgG-a primijećeno starenjem ljudskog organizma. Zapravo je smanjenje galaktozilacije prva otkrivena i do sada najistraženija promjena IgG glikoma uslijed starenja čovjeka (Yu i sur. 2016; Krištić i sur. 2014; Pučić i sur. 2011; Shikata i sur. 1998; Parekh i sur. 1988). Gotovo sva navedena istraživanja utvrdila su da se starenjem povećava udio agalaktoziliranih glikana, a smanjuje udio digalaktoziliranih, dok je udio monogalaktoziliranih glikana relativno stabilan kroz vrijeme. Usporedbom glikoma IgG-a izlučenog iz stanica modelne linije FreeStyle™ 293-F i IgG glikoma čovjeka čini se da postoje značajne razlike u starenju stanica modelne linije i ljudskog organizma. Ipak, zajednička karakteristika u oba slučaja je promjena galaktozilacije. Prilikom starenja stanica FreeStyle™ 293-F najveće su promjene u udjelu monogalaktoziliranih struktura, što nije toliko izraženo u glikomu IgG-a čovjeka. Jedno od mogućih objašnjenja je sama razlika u glikomima IgG-a čovjeka i modelne stanične linije FreeStyle™ 293-F.

Provedeno istraživanje u ovom diplomskom radu potvrdilo je da je glikom IgG-a izlučenog iz stanica FreeStyle™ 293-F sličan glikomu IgG-u iz plazme čovjeka (Dekkers i sur. 2016). Ipak, postoje određene razlike. U radu Dekkers i sur. (2016) kromatografi pokazuju puno veće standardne devijacije pojedinih svojstava, kao što su galaktozilacija, sijalinizacija, fukozilacija i udio sržnog GlcNAc, nego što su dobivene u ovom istraživanju za pojedinu vremensku točku. Iz studije Dekkers i sur. (2016) nije jasno jesu li sve stanice iz kojeg je izlučen IgG bile jednake starosti, te je moguće da su za određivanje IgG glikoma analizirane molekule IgG-a izlučene iz stanica različite starosti (pasažirane različit broj puta). Ako je to zaista slučaj, uz činjenicu da su najveće devijacije zabilježene upravo za udio galaktoziliranih glikana, ovo istraživanje daje

moгуće objašnjenje za veliki raspon standardnih devijacija određenih deriviranih glikanskih svojstava opisanih u radu od Dekkers i sur. (2016).

Iako su derivirana svojstva IgG glikoma linije FreeStyle™ 293-F nalik onima ljudskog IgG-a, usporedbom pojedinih glikanskih struktura ipak su vidljive neke značajne razlike. Najzastupljenija glikanska struktura u glikomu IgG-a dobivenog u liniji FreeStyle™ 293-F je ona pridružena kromatografskom vršku 4, a sastoji se od dva antenarna GlcNAc bez galaktoza te sržno vezane fukoze. Neovisno o starosti stanica, ova struktura čini minimalno 50%, a u nekim vremenskim točkama i preko 70% svih analiziranih glikana IgG-a. Analizirajući ljudski IgG glikom i uzevši u obzir sve proučavane populacije, ova struktura, u trenutku kada je najzastupljenija, čini nešto više od 30% svih glikana IgG-a (Krišić i sur. 2014). Druga velika razlika na razini zastupljenosti pojedinačnih glikana su glikanske strukture pridružene kromatografskim vrškovima 14 i 18. Vršku 14 odgovara digalaktozilirani glikan s vezanom sržnom fukozom, a vršku 18 digalaktozilirani glikan sa sržnom fukozom na koji je još vezana jedna molekula sijalinske kiseline. Dok u ljudskom IgG glikomu navedene strukture u nekim trenucima čine preko 12% - 15% svih glikana, u glikomu stanične linije FreeStyle™ 293-F ove su strukture slabo zastupljene i u trenutku kada su najzastupljenije čine manje od 5 odnosno 1% svih glikana. Iz svega navedenog proizlazi da linija FreeStyle™ 293-F, iako dovoljno dobra za proučavanje IgG glikoma, ima određena ograničenja koja se ne smiju zanemariti prilikom osmišljavanja eksperimenata.

Iako je stanična linija FreeStyle™ 293-F u teoriji imortalna, dokazano je da dugotrajno pasažiranje imortalnih staničnih linija dovodi do promjena morfologije i drugih karakteristika stanica što utječe na njihov životni vijek u kulturi (Montano 2014). Sam proizvođač ove stanične linije navodi maksimalni broj pasaža koji iznosi 30 do 35 (Thermo Fisher Scientific 2020) zbog čega ipak možemo govoriti o starenju stanične linije FreeStyle™ 293-F tokom dužeg vremena.

Što se tiče spomenutih promjena galaktozilacije usred starenja stanica, u jednom trenutku dolazi do zanimljive promjene u udjelu galaktoziliranih glikana. Sve do pasaže 23 dolazi do kontinuiranog smanjenja galaktozilacije koja je najmanja u toj vremenskoj točki, a potom u sljedećoj transfekciji, u pasaži 27, dolazi do velikog porasta u galaktozilaciji. Taj je porast vidljiv i u sljedećoj transfekciji, u pasaži 31, a potom dolazi do ponovnog smanjenja. Vrlo slična promjena vidljiva je i s udjelima fukoziliranih glikana. Osim toga ta se transfekcija/pasaža ističe i po najvećoj

količini izlučenog IgG-a. Kako u literaturi nije pronađen sličan rezultat, nameću se dvije hipoteze. Prva je da se promijenio neki od uvjeta uzgoja stanica te je došlo do njihovog oporavka koji objašnjava uočene promjena IgG glikoma. Problem s ovom hipotezom je taj što su stanice konstantno uzgajane u istim uvjetima (u istom inkubatoru), te su u svakoj transfekciji korišteni isti reagensi. Druga hipoteza sugerira da je tijekom starenja stanica došlo do aktivacije određenog „obrambenog mehanizma” kojim se stanice žele obraniti od potencijalne smrti usred metaboličkih promjena uzrokovanih starenjem. Kako je druga najuspješnija transfekcija po količini izlučenog IgG-a ona u pasaži 23 kada su promatrana svojstva galaktozilacije i fukoziacije na minimumu, pretpostavka bi bila da se oporavak stanica ranije očituje u uspješnosti transfekcije, a tek poslije u promjenama glikozilacije. Isto tako bi se i novo pogoršanje stanja stanica najprije očitovalo u smanjenoj uspješnosti transfekcija. Naime, transfekcija u pasaži 31 po količini IgG-a puno je lošija od prethodne dvije transfekcije, a promjene glikoma nisu značajne u odnosu na pasažu 27. Za potvrdu bilo koje od navedenih hipoteza, a prije svega za drugu hipotezu i potencijalni mehanizam obrane, potrebna su daljnja istraživanja koja bi analizirala više različitih karakteristika i preciznije praćenje uvjeta uzgoja stanica.

Promjene sijalinizacije IgG glikana zabilježene tijekom starenja modelne linije FreeStyle™ 293-F izuzetno su male te je razina sijaliniziranih glikana prilično stabilna kroz vrijeme. U slučaju starenja čovjeka to nije slučaj. Pokazano je da starenjem dolazi do smanjenja udjela mono- i disijaliniziranih glikana na IgG-u iz seruma (Yu i sur. 2016; Krištić i sur. 2014; Pučić i sur. 2011). I ova se različitost u ponašanju glikozilacije IgG-a u starih stanica i organizma čovjeka jednim dijelom može objasniti razlikama u samom sastavu IgG glikoma čovjeka i modelne linije jer već u samom početku, u glikomu IgG-a izlučenog iz mladih stanica udio sijaliniziranih glikana puno je manji nego kod IgG glikana čovjeka. Moguće je i da je stvaran udio sijaliniziranih glikana još manji te da dio uračunatih glikana predstavljaju glikani s većim brojem manozna u svojem sastavu. Zbog sličnosti u veličini i naboju molekula, nekim kromatografskim vršcima nije moguće pridružiti jednu specifičnu strukturu, već im je pridruženo više struktura, a to je slučaj i s vršcima 18 i 21 koji predstavljaju ne samo sijalinizirane glikane, nego i glikane s više manoznih monosaharida. Prilikom analiza IgG glikoma čovjeka u većini slučajeva glikozilacija Fab fragmenta nije analizirana odvojeno, već zajedno s glikozilacijom Fc fragmenta što utječe na udio sijaliniziranih glikana. Otprilike 20% IgG-a ima glikozilirane Fab fragmente, te sijalinizirane glikanske strukture na Fab fragmentu čine velik dio ukupnih sijaliniziranih glikana unutar IgG glikoma (Anumula

2012). IgG antitijela izlučena od strane stanica FreeStyle™ 293-F nemaju Fab mjesta glikozilacije te ova činjenica može objasniti razliku u postotku sijaliniziranih glikana u IgG glikomu mladih stanica i IgG glikoma čovjeka. Treba ipak primijetiti da u posljednjim pasažama dolazi do blagog smanjenja sijalinizacije koje je i statistički značajno, pa je moguće da bi duljim uspješnim pasažiranjem stanica i promjene sijalinizacije bile veće te sličnije promjenama uočenim u ljudskom organizmu.

Dosadašnja su istraživanja pokazala da starenjem u čovjeka dolazi do porasta udjela glikana s rasijecajućim GlcNAc (Chen i sur. 2012; Pučić i sur. 2011). U ovom istraživanju na modelnoj staničnoj liniji nismo uspjeli potvrditi promjenu u udjelu rasijecajućeg GlcNAc tijekom starenja stanica. Sam udio rasijecajućeg GlcNAc oscilira između 3,5% i 4% u IgG glikomu stanica, a starenjem ipak dolazi do malog, ali značajnog smanjenja tog udjela. Moguće je da bi povećanjem broja replika taj pad postao manji ili čak ne bi bio uočen, ali prema trenutnim rezultatima ipak postoji smanjenje uzrokovano starenjem.

Posljednje promatrano glikansko svojstvo, sržna fukozilacija, mijenja se manje od galaktozilacije, ali puno više od sijalinizacije i rasijecajućeg GlcNAc. Starenjem se smanjuje udio fukoziliranih glikana, ali nakon pasaže 23, dolazi do ponovnog porasta tog udjela, kao što je ranije opisano za galaktozilaciju. U posljednjim pasažama dolazi do novog smanjenja, ali to je smanjenje manje nego u slučaju galaktozilacije. Fukozilacija IgG-a ima protuupalnu ulogu i iako bi smanjenje udjela fukoziliranih glikana bilo u skladu s uočenom pojavom upalnog starenja u ljudi, dosadašnji rezultati nisu jednoglasno potvrdili do kakvih promjena u fukozilaciji dolazi usred starenja čovjeka (Martinić Kavur i sur. 2021). Iz tog je razloga teško usporediti sličnosti uočenih promjena za modelnu liniju s promjenama kod čovjeka, iako uočeni ponovni rast fukozilacije u istom trenutku kada dolazi do porasta galaktozilacije nameće potrebu za detaljnijim istraživanjem potencijalnog mehanizma obrane stanica.

Neke od uočenih promjena glikana, prije svega porast agalaktoziliranih glikana i smanjenje galaktoziliranih glikana, nisu samo obilježje starenja, već i upalnih procesa. Kao što je ranije spomenuto, smatra se da sijalinizirani i galaktozilirani glikani imaju protuupalnu ulogu, iako glikani s terminalnim galaktozama mogu biti i proupalni (Martinić Kavur i sur. 2021). Agalaktozilirani glikani smatraju se isključivo proupalnim jer aktiviraju klasični i alternativni put komplementa, a prema nekim rezultatima čak lektinski put aktivacije komplementa (Banda i sur.

2008; Arnold i sur. 2006; Malhotra i sur. 1995). Uočene promjene udjela galaktoziliranih i agalaktoziliranih glikana tijekom starenja upućuju i na različitu ulogu IgG-a koji je sintetiziran u istim staničnoj liniji, ali u stanicama različite starosti. Ovo je istraživanje pokazalo kako je upotrebom stanica FreeStyle™ 293-F različite starosti moguće barem jednim dijelom regulirati pro- ili protuupalnu ulogu sintetiziranih antitijela što bi, uz dodatne modifikacije ove linije, moglo pomoći u upotrebi ove linije za masovniju sintezu određenih antitijela.

Kako bi se odredili mehanizmi koji dovode do uočenih promjena glikoma, prvi je korak svakako provjera ekspresija gena koji kodiraju enzime izravno uključene u samu glikozilaciju. Velik problem prilikom analize ekspresije ciljanih glikoziltransferaza bio je izbor odgovarajuće endogene kontrole. Endogene kontrole inače korištene u laboratoriju, *HPRT1* i *HMBS*, imale su znatno promijenjenu ekspresiju tijekom starenja stanica. Za oba kontrolna gena smanjenje ekspresije je bilo veće nego smanjenje ekspresije ciljanih gena što je, uzevši u obzir uočene promjene glikoma, bilo prilično iznenađujuće. Pregledom literature pronađena je tek jedna publikacija koja validira različite endogene kontrole za istraživanja različitih modela starenja, a jedan od modela je i *in vitro* starenje (González-Bermúdez i sur. 2019). U tom su radu autori pokazali da je gen *PUM1* najbolja endogena kontrola za proučavanje starenja *in vitro* u modelnoj staničnoj liniji fibroblasta. Ovo je istraživanje pokazalo da je gen *PUM1* najbolja endogena kontrola i za proučavanje starenja ili procesa pod utjecajem starenja u staničnoj liniji FreeStyle™ 293-F. U budućim istraživanjima bi ipak trebalo ispitati veći broj gena i utvrditi koji geni su najbolje endogene kontrole za ovu staničnu liniju kako bi buduće analize genske ekspresije mogle dati preciznije i točnije rezultate.

Od tri analizirana gena, jedini gen čija ekspresija prati promjene u udjelu odgovarajućih glikanskih struktura je *FUT8*. Ekspresija *FUT8* smanjuje se i najniža je u pasaži 23 kada je i najmanji udio glikana fukoziliran, a potom dolazi do porasta ekspresije. Zanimljivo je da je uočena promjena fukoziliranih glikana prilično malena, unutar 2%, dok su promjene ekspresije fukoziltransferaze daleko veće te je u pasaži 23 ekspresija trostruko manja nego u pasaži 3. Jedno od mogućih objašnjenja ovakvog nerazmjera u promjeni količine mRNA i fukoziliranih glikana kao krajnjeg produkta je posttranskripcijska regulacija. U više tipova karcinoma do sada je dokazana regulacija gena *FUT8* molekulama miRNA (Cheng i sur. 2016; Wang i sur. 2014; Bernardi i sur. 2013). Neke od istraživanih miRNA djeluju na promjenu količine mRNA kao i količinu proteina, dok neke, poput miR-34a koju su istraživali Bernardi i sur. (2013), djeluje samo

na promjenu količine proteinskog produkta. Moguće je stoga da je i fukozilacija IgG-a dijelom regulirana miRNA. Iz tog bi se razloga, osim količine mRNA za svaku vremensku točku, trebala kvantificirati i količina samog proteina FUT8 kako bi se vidjelo jesu li količine mRNA i proteina u korelaciji ili postoji neki drugi mehanizam regulacije fukozilacije IgG-a.

Uočene promjene ekspresije gena *B4GALT1* nisu u skladu s promjenama galaktozilacije glikana. Najveći pad ekspresije zabilježen je upravo u pasaži 27 kada dolazi do porasta udjela galaktoziliranih glikana, a potom slijedi porast ekspresije u trenutku kada se smanjuje galaktozilacija. Ipak taj porast vrijednosti ekspresije gena nije statistički značajan. Kako je promjena ekspresije u ovom istraživanju praćena samo na razini mRNA, postoji mogućnost da je ovdje uključen neki posttranskripcijski mehanizam regulacije ekspresije *B4GALT1*. Najbolja bi opcija stoga bila istovremeno pratiti promjenu ne samo na razini mRNA, već i samog proteina B4GALT1 kako bi se ustanovile potencijalne razlike, baš kao i u slučaju ekspresije *FUT8*. Keusch i sur. (1998) istraživali su promjene ekspresije ovog gena u osoba oboljelih od reumatoidnog artritisa te su utvrdili da, iako su vidljive promjene galaktozilacije IgG-a oboljelih osoba, nema promjene na razini proteina B4GALT1. To znači da možda postoji i dodatna, posttranslacijska razina regulacije aktivnosti enzima B4GALT1 čija bi se uloga svakako trebala istražiti i u procesu starenja.

ST6GAL1 je jedini gen čija se ekspresija tijekom cijelog promatranog perioda nije značajno promijenila. Kako su i promjene sijaliniziranih glikana minimalne sve do zadnjih pasaža, ovi rezultati nisu toliko iznenađujući. Ipak treba istaknuti postojanje velikih razlika između pojedinih replika, a kako su za metodu qPCR korištene samo tri replike, a ne šest kao za analizu glikana, takve razlike značajno utječu na rezultate statističkih analiza i samo tumačenje rezultata. U budućim bi istraživanjima trebao biti promatran veći broj replika kako bi se lakše utvrdila normalna distribucija dobivenih vrijednosti (ukoliko postoji). To bi omogućilo i precizniju statističku analizu podataka te eliminiralo određene nedoumice koje sada postoje oko naravi uočenih promjena.

Stanična linija FreeStyle™ 293-F prema dostupnoj literaturi još nije korištena u istraživanjima procesa starenja, pa su i same promjene do kojih dolazi uslijed dugotrajnog uzgoja ove linije nepoznate. Istraživanja starenja fibroblasta provedena *in vitro* pokazala su da starenje stanica dovodi do promjena glikana vezanih za membranu, prije svega smanjenja sijaliniziranih glikanskih struktura i povećanja udjela glikana s terminalnim galaktozama (Itakura i sur. 2016;

Tadokoro i sur. 2006). Istraživanja epidermalnih matičnih stanica također su pokazala promjene glikoma membranskih glikana, no u ovom je slučaju uočen porast sijaliniziranih glikana, kao i porast ekspresije samih sijaliltransferaza (Oinam i sur. 2020). Bilo bi zanimljivo u budućim istraživanjima paralelno pratiti promjene glikoma izlučenog IgG-a kao i promjene glikoma membranskih proteina. Eventualne promjene membranskih glikana ukazale bi na postojanje potencijalnog biljega starenja ove stanične linije jer, iako je u načelu riječ o imortalnoj staničnoj liniji, već je opisano da to nije sasvim točno. Prema rezultatima ovog istraživanja, osim promjena glikozilacije IgG-a usred starenja, nisu uočeni druge promjene poput duljeg vremena udvostručenja ili smanjenja vijabilnosti stanica, kao ni morfološke promjene sve do zadnje dvije pasaže. Osim potencijalnih biljega starenja, rezultati takvog istraživanja mogli bi ukazati na postojanje više različitih mehanizama regulacije glikozilacije IgG-a usred starenja koji djeluju istovremeno, a omogućavaju različite glikanske profile proteina s različitim funkcijama.

6. ZAKLJUČAK

Ovo je istraživanje pokazalo da starost modelne stanične linije FreeStyle™ 293-F utječe na glikom sintetiziranog IgG-a, te starenjem stanica dolazi do smanjenja udjela galaktoziliranih glikana, a porasta udjela agalaktoziliranih glikana. Od ostalih se modifikacija najviše mijenja fukozilacija, dok se sijalinizacija i udio glikana s rasijecajućim GlcNAc uglavnom ne mijenjaju. Uočene promjene u galaktozilaciji nisu posljedica promjene ekspresije galaktoziltransferaze B4GALT1, barem ne na razini mRNA, dok bi promjene fukozilacije, prema dobivenim rezultatima, barem dijelom mogle biti posljedica promjene ekspresije fukoziltransferaze FUT8. Značajna promjena glikoma događa se u pasaži 27, kada nakon kontinuiranog pada galaktozilacije dolazi do novog porasta koji je vidljiv kroz nekoliko pasaža, kada opet slijedi novi pad. Kako slične promjene nisu uočene prilikom starenja drugih staničnih linija, potrebno je detaljnije istražiti uočenu promjenu kako bi se ustanovilo je li ona posljedica određenih uvjeta uzgoja i rukovanja stanica ili se radi o mehanizmu koji stanice aktiviraju uslijed promjena uzrokovanih starenjem.

Uočene promjene imaju određene sličnosti s promjenama IgG glikoma koje su uzrokovane starenjem ljudskog organizma. Najveća sličnost izražena je kroz povećanje udjela agalaktoziliranih glikana tj. smanjenje galaktozilacije glikana, dok se promjene ostalih svojstava ipak donekle razlikuju. Veći broj uzoraka i replika mogao bi rasvijetliti još neke potencijalne sličnosti, prije svega uočene promjene sijalinizacije.

U budućim bi istraživanjima svakako bilo poželjno pratiti više parametara koji se dokazano mijenjaju tijekom starenja modelnih staničnih linija, poput glikoma membranskih proteina, kako bi se utvrdilo dovodi li starenje ove stanične linije i do drugih promjena osim uočenih promjena glikoma IgG-a. Na taj bi se način potencijalno mogli utvrditi i mehanizmi koji dovode do uočenih promjena glikozilacije IgG-a te postoji li više različitih mehanizama regulacije koji se aktiviraju starenjem.

7. LITERATURA

- Anumula K.R. (2012): Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J. Immunol. Methods* **382**: 167.
- Arnold J.N., Dwek R.A., Rudd P.M., Sim R.B. (2006): Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunol. Lett.* **106**: 103.
- Baković M.P., Selman M.H.J., Hoffmann M., Rudan I., Campbell H., Deelder A.M., Lauc G., Wuhrer M. (2013): High-Throughput IgG Fc N-Glycosylation Profiling by Mass Spectrometry of Glycopeptides. *J. Proteome Res.* **12**: 821.
- Banda N.K., Wood A.K., Takahashi K., Levitt B., Rudd P.M., Royle L., Abrahams J.L., Stahl G.L., Holers V.M., Arend W.P. (2008): Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. *Arthritis Rheum.* **58**: 3081.
- Bas M., Terrier A., Jacque E., Dehenne A., Pochet-Béghin V., Béghin C., Dezetter A.-S., Dupont G., Engrand A., Beaufils B., Mondon P., Fournier N., Romeuf C. de, Jorieux S., Fontayne A., Mars L.T., Monnet C. (2019): Fc Sialylation Prolongs Serum Half-Life of Therapeutic Antibodies. *J. Immunol.* **202**: 1582.
- Bernardi C., Soffientini U., Piacente F., Tonetti M.G. (2013): Effects of MicroRNAs on Fucosyltransferase 8 (FUT8) Expression in Hepatocarcinoma Cells. *PLoS One* **8**: e76540.
- Blundell P.A., Lu D., Dell A., Haslam S., Pleass R.J. (2020): Choice of Host Cell Line Is Essential for the Functional Glycosylation of the Fc Region of Human IgG1 Inhibitors of Influenza B Viruses. *J. Immunol. Author Choice* **204**: 1022.
- Bovenkamp F.S. van de, Derksen N.I.L., Breemen M.J. van, Taeye S.W. de, Heer P.O., Sanders R.W., Rispens T. (2018): Variable Domain N-Linked Glycans Acquired During Antigen-Specific Immune Responses Can Contribute to Immunoglobulin G Antibody Stability. *Front. Immunol.* **9**: 12.
- Bovenkamp F.S. van de, Hafkenscheid L., Rispens T., Rombouts Y. (2016): The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *J. Immunol.* **196**: 1435.
- Bowden T.A., Baruah K., Coles C.H., Harvey D.J., Yu X., Song B.-D., Stuart D.I., Aricescu A.R., Scanlan C.N., Jones E.Y., Crispin M. (2012): Chemical and structural analysis of an antibody folding intermediate trapped during glycan biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **134**: 17554.
- Chen G., Wang Y., Qiu L., Qin X., Liu H., Wang X., Wang Y., Song G., Li F., Guo Y., Li F., Guo S., Li Z. (2012): Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. *J. Proteomics* **75**: 2824.
- Cheng L., Gao S., Song X., Dong W., Zhou H., Zhao L., Jia L. (2016): Comprehensive N-glycan profiles of hepatocellular carcinoma reveal association of fucosylation with tumor progression and regulation of FUT8 by microRNAs. *Oncotarget* **7**: 61199.

- Cobb B.A. (2020): The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology* **30**: 202.
- Côté J., Garnier A., Massie B., Kamen A.A. (1998): Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells. *Biotechnol. Bioeng.* **59**:567.
- Dall'Olio F., Vanhooren V., Chen C.C., Slagboom P.E., Wuhrer M., Franceschi C. (2013): N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Res. Rev.* **12**: 685.
- Dekkers G., Plomp R., Koeleman C.A.M., Visser R., Horsten H.H. Von, Sandig V., Rispens T., Wuhrer M., Vidarsson G. (2016): Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Sci. Rep.* **6**: 1.
- Dekkers G., Treffers L., Plomp R., Bentlage A.E.H., Boer M. de, Koeleman C.A.M., Lissenberg-Thunnissen S.N., Visser R., Brouwer M., Mok J.Y., Matlung H., Berg T.K. van den, Esch W.J.E. van, Kuijpers T.W., Wouters D., Rispens T., Wuhrer M., Vidarsson G. (2017): Decoding the Human Immunoglobulin G-Glycan Repertoire Reveals a Spectrum of Fc-Receptor- and Complement-Mediated-Effector Activities. *Front. Immunol.* **8**: 877.
- DuBridges R.B., Tang P., Hsia H.C., Leong P.M., Miller J.H., Calos M.P. (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 379.
- Fanger M.W., Smyth D.G. (1972): The oligosaccharide units of rabbit immunoglobulin G. Multiple carbohydrate attachment sites. *Biochem. J.* **127**: 757.
- González-Bermúdez L., Anglada T., Genescà A., Martín M., Terradas M. (2019): Identification of reference genes for RT-qPCR data normalisation in aging studies. *Sci. Rep.* **9**: 1.
- Gornik O., Wagner J., Pučić M., Knežević A., Redžić I., Lauc G. (2009): Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* **19**: 1547.
- Graham F.L. (1987): Growth of 293 Cells in Suspension Culture. *J. Gen. Virol.* **68**: 937.
- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. (1977): Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **36**: 59.
- Gudelj I., Lauc G., Pezer M. (2018): Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell. Immunol.* **333**: 65.
- Haan N. de, Falck D., Wuhrer M. (2020): Monitoring of immunoglobulin N- and O-glycosylation in health and disease. *Glycobiology* **30**: 226.
- Haan N. de, Reiding K.R., Driessen G., Burg M. van der, Wuhrer M. (2016): Changes in Healthy Human IgG Fc-Glycosylation after Birth and during Early Childhood. *J. Proteome Res.* **15**: 1853.
- Han Y., Liu Y., Fu X., Zhang Q., Huang H., Zhang C., Li W., Zhang J. (2018): miR-9 inhibits the

- metastatic ability of hepatocellular carcinoma via targeting beta galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1. *J. Physiol. Biochem.* 2018 **74**: 491.
- Hess C., Winkler A., Lorenz A.K., Holecška V., Blanchard V., Eiglmeier S., Schoen A.-L., Bitterling J., Stoehr A.D., Petzold D., Schommartz T., Mertes M.M.M., Schoen C.T., Tiburzy B., Herrmann A., Köhl J., Manz R.A., Madaio M.P., Berger M., Wardemann H., Ehlers M. (2013): T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. *J. Clin. Invest.* **123**: 3788.
- Houde D., Peng Y., Berkowitz S.A., Engen J.R. (2010): Post-translational Modifications Differentially Affect IgG1 Conformation and Receptor Binding. *Mol. Cell. Proteomics* **9**: 1716.
- Huang H., Liu Y., Yu P., Qu J., Guo Y., Li W., Wang S., Zhang J. (2018): MiR-23a transcriptional activated by Runx2 increases metastatic potential of mouse hepatoma cell via directly targeting Mgat3. *Sci. Reports* **8**: 1.
- Itakura Y., Sasaki N., Kami D., Gojo S., Umezawa A., Toyoda M. (2016): N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci.* **6**: 1.
- Karsten C.M., Pandey M.K., Figge J., Kilchenstein R., Taylor P.R., Rosas M., McDonald J.U., Orr S.J., Berger M., Petzold D., Blanchard V., Winkler A., Hess C., Reid D.M., Majoul I. V., Strait R.T., Harris N.L., Köhl G., Wex E., Ludwig R., Zillikens D., Nimmerjahn F., Finkelman F.D., Brown G.D., Ehlers M., Köhl J. (2012): Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat. Med.* **18**: 1401.
- Keusch J., Lydyard P.M., Berger E.G., Delves P.J. (1998). B lymphocyte galactosyltransferase protein levels in normal individuals and in patients with rheumatoid arthritis. *Glycoconj J.* **15**:1093.
- Khurana S., Raghunathan V., Salunke D.M. (1997): The Variable Domain Glycosylation in a Monoclonal Antibody Specific to GnRH Modulates Antigen Binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**: 465.
- Kizuka Y., Kitazume S., Yoshida M., Taniguchi N. (2011): Brain-specific expression of N-acetylglucosaminyltransferase IX (GnT-IX) is regulated by epigenetic histone modifications. *J. Biol. Chem.* **286**: 31875.
- Klarić L., Tsepilov Y.A., Stanton C.M., Mangino M., Sikka T.T., Esko T., Pakhomov E., Salo P., ... Hayward C. (2020): Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. *Sci. Adv.* **6**: 301.
- Klasić M., Markulin D., Vojta A., Samaržija I., Biruš I., Dobrinić P., Ventham N.T., Trbojević-Akmačić I., Šimurina M., Štambuk J., Razdorov G., Kennedy N.A., Satsangi J., Dias A.M., Pinho S., Annese V., Latiano A., D’Inca R., Lauc G., Zoldoš V. (2018): Promoter methylation of the MGAT3 and BACH2 genes correlates with the composition of the immunoglobulin G glycome in inflammatory bowel disease. *Clin. Epigenetics* **10**: 1.

- 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., Šarac 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 Biol. Sci. Med. Sci.* **69**: 779.
- 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.-W., Molokhia M., Patrick A.L., McKeigue P., Kolčić I., Lukić I.K., Swann O., Leeuwen F.N. van, Ruhaak L.R., Houwing-Duistermaat J.J., Slagboom P.E., Beekman M., Craen A.J.M. de, Deelder A.M., Zeng Q., Wang W., Hastie N.D., Gyllensten U., Wilson J.F., Wuhler 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 Genet.* **9**: e1003225.
- Lee E.U., Roth J., Paulson J.C. (1989): Alteration of Terminal Glycosylation Sequences on N-linked Oligosaccharides of Chinese Hamster Ovary Cells by Expression of β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**: 13848.
- Leefflang B.R., Vliegthart J.F.G. (2012): Glycoprotein Analysis: Using Nuclear Magnetic Resonance Update based on the original article by J F G Vliegthart, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, © 2000, John Wiley & Sons, Ltd. *Encycl. Anal. Chem.*
- Malhotra R., Wormald M.R., Rudd P.M., Fischer P.B., Dwek R.A., Sim R.B. (1995): Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat. Med.* **1**: 237.
- Malm M., Saghaleyni R., Lundqvist M., Giudici M., Chotteau V., Field R., Varley P., Hatton D., Grassi L., Svensson T., Uhlen M., Nielsen J., Rockberg J. (2020): Evolution from adherent to suspension – systems biology of HEK293 cell line development. *Sci. Rep.* **10**.
- Martinić Kavur M., Lauc G., Pezer M. (2021): Immunoglobulin G Glycans as Biomarkers and Functional Effectors in Aging and Diseases. *Comprehensive Glycoscience - Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Oxford: Elsevier, 439-478.
- Mijakovac A., Jurić J., Kohrt W.M., Krištić J., Kifer D., Gavin K.M., Miškec K., Frkatović A., Vučković F., Pezer M., Vojta A., Nigrović P.A., Zoldoš V., Lauc G. (2021): Effects of Estradiol on Immunoglobulin G Glycosylation: Mapping of the Downstream Signaling Mechanism. *Front. Immunol.* **12**: 1.
- Montano M. (2014): Model systems. *Translational Biology in Medicine*, Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Woodhead Publishing, 9-33
- Neelamegham S., Mahal L.K. (2016): Multi-level regulation of cellular glycosylation: From genes to transcript to enzyme to structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **40**: 145.
- Oinam L., Changarathil G., Raja E., Ngo Y.X., Tateno H., Sada A., Yanagisawa H. (2020): Glycome profiling by lectin microarray reveals dynamic glycan alterations during epidermal

- stem cell aging. *Aging Cell* **19**: e13190.
- Parekh R., Roitt I., Isenberg D., Dwek R., Rademacher T. (1988): Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J. Exp. Med.* **167**: 1731.
- Paton B., Suarez M., Herrero P., Canela N. (2021): Glycosylation Biomarkers Associated with Age-Related Diseases and Current Methods for Glycan Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 5788.
- Plomp R., Dekkers G., Rombouts Y., Visser R., Koeleman C.A.M., Kammeijer G.S.M., Jansen B.C., Rispens T., Hensbergen P.J., Vidarsson G., Wuhrer M. (2015): Hinge-Region O-Glycosylation of Human Immunoglobulin G3 (IgG3). *Mol. Cell. Proteomics* **14**: 1373.
- Pučić M., Knežević A., Vidič J., Adamczyk B., Novokmet M., 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**: 1373.
- Reily C., Stewart T.J., Renfrow M.B., Novak J. (2019): Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**: 346.
- Schroeder H.W., Jr, Cavacini L. (2010): Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**: 41.
- Schur P.H. (1987): IgG subclasses - a review. *Ann. Allergy* **58**: 89.
- Shah I.S., Lovell S., Mehzabeen N., Battaile K.P., Tolbert T.J. (2017): Structural characterization of the Man5 glycoform of human IgG3 Fc. *Mol. Immunol.* **92**: 28.
- Shields R.L., Lai J., Keck R., O'Connell L.Y., Hong K., Gloria Meng Y., Weikert S.H.A., Presta L.G. (2002): Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcγRIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. *J. Biol. Chem.* **277**: 26733.
- Shikata K., Yasuda T., Takeuchi F., Konishi T., Nakata M., Mizuochi T. (1998). Structural changes in the oligosaccharide moiety of human IgG with aging. *Glycoconj. J.* **15**: 583.
- Spiro R.G. (2002): Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**: 43.
- Tadokoro T., Yamamoto K., Kuwahara I., Fujisawa H., Ikekita M., Taniguchi A., Sato T., Furukawa K. (2006): Preferential reduction of the α -2-6-sialylation from cell surface N-glycans of human diploid fibroblastic cells by in vitro aging. *Glycoconjugate J.* **23**: 443.
- Thermo Fisher Scientific (Invitrogen) (2020): FreeStyle™ 293-F cells USER GUIDE.
- Thomson C.A. (2016): IgG Structure and Function. *Encycl. Immunobiol.* **2**: 15.
- Thu C.T., Mahal L.K. (2020): Sweet Control: MicroRNA Regulation of the Glycome. *Biochemistry* **59**: 3098.

- Vaillant A.A.J., Jamal Z., Ramphul K. (2021): Immunoglobulin. StatPearls [Internet], Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 139-174.
- Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. (2014): IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* **5**.
- Walsh G. (2018): Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **36**: 1136.
- Wang M., Wang J., Kong X., Chen H., Wang Y., Qin M., Lin Y., Chen H., Xu J., Hong J., Chen Y.-X., Zou W., Fang J.-Y. (2014): MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. *Sci. Rep.* 2014 **4**: 1.
- Yu X., Wang Y., Kristic J., Dong J., Chu X., Ge S., Wang H., Fang H., Gao Q., Liu D., Zhao Z., Peng H., Bakovic M.P., Wu L., Song M., Rudan I., Campbell H., Lauc G., Wang W. (2016): Profiling IgG N-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: A community-based study in a Han Chinese population. *Medicine (Baltimore)*. **95**.
- Zong H., Han L., Ding K., Wang J., Sun T., Zhang X., Cagliero C., Jiang H., Xie Y., Xu J., Zhang B., Zhu J. (2017): Producing defucosylated antibodies with enhanced in vitro antibody-dependent cellular cytotoxicity via FUT8 knockout CHO-S cells. *Eng. Life Sci.* **17**: 801.

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27.04.1997. godine u Zagrebu, a odrastao sam u Samoboru gdje sam pohađao Osnovnu školu Samobor, a potom Gimnaziju Antun Gustav Matoš. Godine 2016. upisao sam Preddiplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na istom sam fakultetu 2019. godine upisao Diplomski studij Molekularne biologije. Tijekom studiranja bio sam demonstrator u sklopu kolegija Zoologija u zimskom semestru 2017. godine, a laboratorijsku stručnu praksu odradio sam na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Više sam puta sudjelovao u znanstveno-popularnoj manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“, a volontirao sam i na Simpoziju studenata biologije 2019. godine. Za izuzetan uspjeh u studiranju 2021. godine nagrađen sam Dekanovom nagradom.

9. PRILOZI

Tablica P1. Udjeli integriranih površina pojedinih kromatografskih vršaka za svaku repliku svake transfekcije. Svakom su kromatografskom vršku pridružene moguće glikanske strukture. Svaki opis strukture odnosi se na monosaharidne jedinice dodane na osnovnu strukturu koja se sastoji od dva *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i tri manoze. F-fukoza; A-antenarni GlcNAc; M-manoza; B-račvajući GlcNAc; G-galaktoza; S-sijalinska kiselina; P3.1-3. pasaža 1. replika; GP-kromatografski vršak

pridružena glikanska struktura pasaža	FA2B + additional structure(s)?							
	FA1	A2	A2B	FA2	M5	A2G	FA2(6)G1	
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8
P3.1	1,19	0,76	0,30	55,82	2,45	1,72	0,68	19,56
P3.2	1,30	0,78	0,33	57,53	2,58	1,91	0,68	18,62
P3.3	1,18	0,78	0,39	55,50	2,42	2,19	0,62	19,58
P3.4	1,11	0,75	0,29	53,65	2,22	1,73	0,53	20,96
P3.5	1,15	0,80	0,34	54,73	2,38	1,86	0,51	20,05
P3.6	1,37	0,80	0,43	57,37	2,84	1,70	0,69	18,83
P7.1	1,71	0,67	0,33	59,67	2,92	1,99	0,59	17,00
P7.3	1,80	0,64	0,36	60,02	2,90	1,96	0,61	16,69
P7.4	1,71	0,62	0,31	59,89	3,04	1,86	0,55	16,60
P7.5	1,78	0,62	0,30	59,85	2,84	2,02	0,60	16,57
P7.6	1,72	0,63	0,36	60,02	2,94	1,99	0,66	16,77
P11.1	1,88	0,64	0,33	61,09	3,14	1,99	0,69	15,97
P11.2	1,89	0,63	0,37	61,30	3,15	2,01	0,52	15,76
P11.3	1,82	0,67	0,32	60,79	3,14	1,94	0,74	16,04
P11.4	1,87	0,68	0,38	60,08	3,14	2,16	0,72	16,25
P11.5	1,78	0,68	0,29	60,13	2,98	2,03	0,74	16,47
P11.6	1,95	0,61	0,28	61,44	3,07	2,10	0,48	15,76
P15.1	2,31	0,49	0,28	69,67	3,27	1,98	0,47	10,66
P15.2	2,45	0,58	0,38	69,36	3,54	1,80	0,77	10,96
P15.3	2,54	0,55	0,50	69,83	3,59	1,95	0,59	10,48
P15.4	2,36	0,56	0,36	68,21	3,46	2,13	0,79	11,39
P15.5	2,36	0,68	0,52	68,15	3,69	1,76	0,63	11,64
P15.6	2,33	0,53	0,36	68,85	3,39	1,79	0,72	11,64

Nastavak Tablice P1

pridružena glikanska struktura	FA2(6)BG		FA2(3)BG		FA2G2		FA2BG2		FA2(3)G1
	FA2(3)G1	1	1 + M6	A2G2	A2BG2	FA2G2	FA2BG2	S1 + M7	
pasaža	GP9	GP10	GP11	GP12	GP13	GP14	GP15	GP16	
P3.1	9,44	0,55	0,86	0,19	0,09	4,59	0,10	0,54	
P3.2	8,96	0,51	0,84	0,18	0,08	4,10	0,06	0,50	
P3.3	9,42	0,46	0,90	0,20	0,08	4,55	0,07	0,57	
P3.4	10,20	0,54	0,88	0,15	0,06	5,13	0,08	0,53	
P3.5	9,98	0,54	0,90	0,15	0,06	4,70	0,08	0,56	
P3.6	8,63	0,54	0,84	0,23	0,12	4,00	0,07	0,50	
P7.1	8,41	0,44	0,78	0,14	0,08	3,48	0,07	0,52	
P7.3	8,40	0,45	0,81	0,14	0,11	3,37	0,07	0,53	
P7.4	8,32	0,46	0,83	0,17	0,10	3,41	0,09	0,68	
P7.5	8,52	0,43	0,76	0,13	0,09	3,46	0,09	0,60	
P7.6	8,32	0,49	0,75	0,16	0,11	3,42	0,06	0,51	
P11.1	7,78	0,43	0,81	0,15	0,11	3,06	0,07	0,55	
P11.2	8,00	0,42	0,81	0,12	0,12	3,05	0,07	0,53	
P11.3	8,00	0,46	0,82	0,14	0,08	3,15	0,07	0,57	
P11.4	8,07	0,44	0,82	0,14	0,09	3,20	0,08	0,60	
P11.5	8,16	0,47	0,76	0,13	0,09	3,30	0,06	0,58	
P11.6	8,13	0,40	0,80	0,11	0,10	3,02	0,07	0,53	
P15.1	6,04	0,26	0,66	0,05	0,07	1,76	0,03	0,50	
P15.2	5,38	0,39	0,73	0,13	0,14	1,71	0,07	0,47	
P15.3	5,58	0,30	0,71	0,10	0,08	1,61	0,06	0,48	
P15.4	5,68	0,32	0,78	0,14	0,15	1,80	0,08	0,53	
P15.5	5,50	0,35	0,73	0,12	0,16	1,79	0,08	0,60	
P15.6	5,82	0,33	0,69	0,10	0,08	1,82	0,06	0,42	

Nastavak Tablice P1

pridružena glikanska struktura pasaža	FA2G2S1		FA2G2BS		A2G2S2 +			FA2BG2S
	A2G2S1	+ M8	1	FA2FG2S1	M9	A2BG2S2	FA2G2S2	2
	GP17	GP18	GP19	GP20	GP21	GP22	GP23	GP24
P3.1	0,28	0,44	0,09	0,02	0,21	0,01	0,05	0,06
P3.2	0,26	0,38	0,09	0,02	0,18	0,01	0,06	0,04
P3.3	0,26	0,40	0,08	0,02	0,20	0,01	0,05	0,06
P3.4	0,31	0,46	0,09	0,03	0,22	0,01	0,03	0,03
P3.5	0,35	0,44	0,10	0,02	0,19	0,02	0,05	0,03
P3.6	0,27	0,37	0,10	0,02	0,16	0,02	0,04	0,05
P7.1	0,26	0,40	0,08	0,03	0,19	0,02	0,08	0,11
P7.3	0,24	0,46	0,10	0,04	0,16	0,01	0,08	0,06
P7.4	0,32	0,53	0,10	0,03	0,24	0,00	0,08	0,07
P7.5	0,32	0,47	0,11	0,03	0,22	0,02	0,11	0,08
P7.6	0,24	0,40	0,08	0,03	0,20	0,01	0,07	0,07
P11.1	0,26	0,47	0,13	0,04	0,22	0,02	0,09	0,09
P11.2	0,33	0,42	0,09	0,04	0,21	0,01	0,08	0,07
P11.3	0,27	0,47	0,11	0,03	0,22	0,01	0,10	0,05
P11.4	0,26	0,46	0,09	0,06	0,21	0,01	0,10	0,10
P11.5	0,27	0,50	0,12	0,02	0,24	0,03	0,10	0,07
P11.6	0,24	0,43	0,08	0,04	0,20	0,02	0,06	0,08
P15.1	0,27	0,44	0,08	0,08	0,27	0,06	0,12	0,17
P15.2	0,20	0,35	0,08	0,05	0,18	0,00	0,15	0,12
P15.3	0,22	0,36	0,09	0,04	0,17	0,01	0,09	0,07
P15.4	0,26	0,36	0,09	0,09	0,19	0,02	0,13	0,12
P15.5	0,23	0,42	0,08	0,05	0,25	0,03	0,11	0,08
P15.6	0,19	0,38	0,07	0,05	0,17	0,02	0,11	0,08

Nastavak Tablice P1

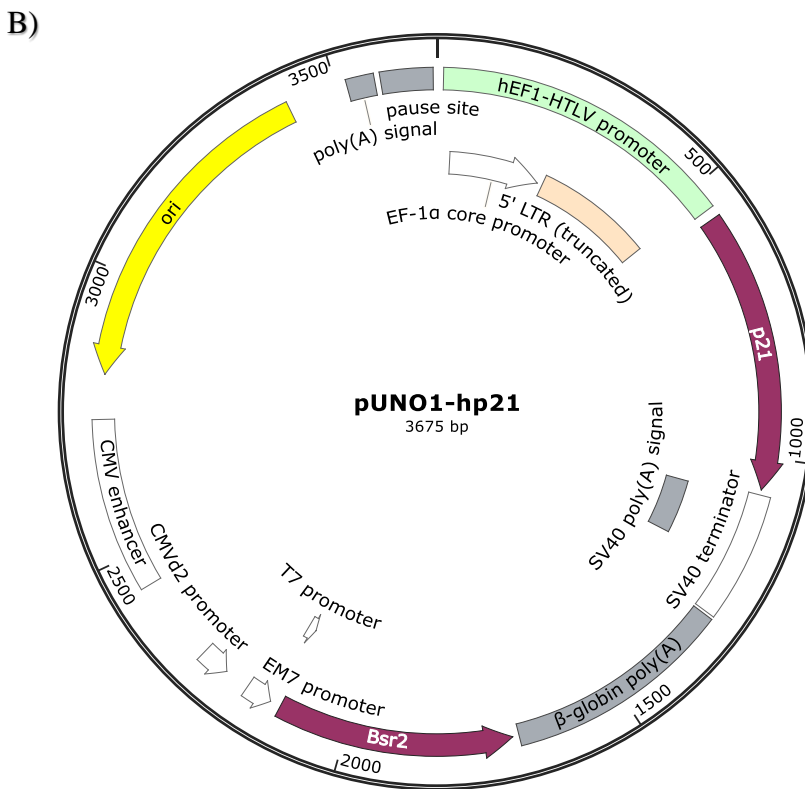
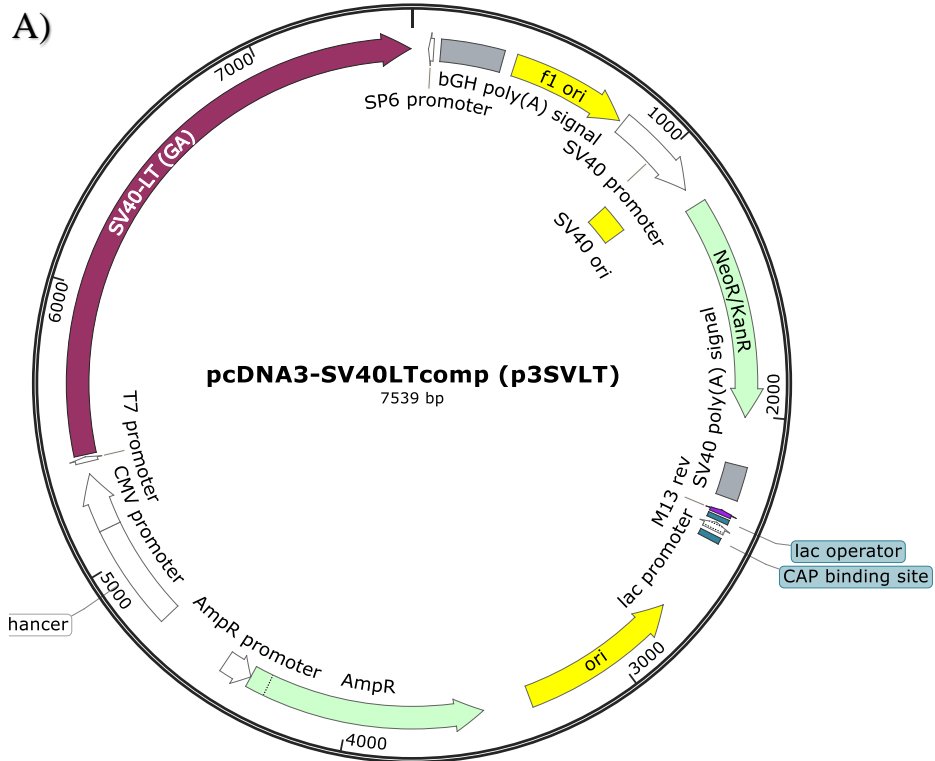
pridružena glikanska struktura pasaža	FA1	A2	A2B	FA2	M5	FA2B + additional structure(s)?	A2G	FA2(6)G1
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8
P19.1	2,80	0,47	0,38	68,06	3,60	2,31	0,61	10,92
P19.2	2,93	0,58	0,57	68,07	4,14	1,77	0,67	11,00
P19.3	2,94	0,59	0,44	68,35	4,11	1,81	0,78	10,58
P19.4	2,82	0,53	0,42	68,34	3,80	2,22	0,83	10,88
P19.5	2,96	0,48	0,36	68,64	3,76	2,12	0,58	10,34
P19.6	1,70	0,78	0,46	72,96	2,85	1,94	1,05	9,65
P23.1	3,27	0,52	0,59	71,21	4,57	1,68	0,73	9,16
P23.2	3,08	0,46	0,45	71,11	4,59	1,62	0,73	9,41
P23.3	3,12	0,46	0,47	71,09	4,56	1,78	0,55	9,53
P23.4	3,31	0,47	0,44	71,19	4,67	1,78	0,66	8,93
P23.5	3,18	0,45	0,27	70,89	4,30	1,97	0,72	8,97
P23.6	3,02	0,43	0,47	71,14	4,15	1,79	0,46	9,47
P27.1	2,26	0,59	0,37	66,87	3,60	1,71	0,69	12,59
P27.2	2,14	0,57	0,41	65,76	3,37	1,97	0,66	13,32
P27.3	2,28	0,61	0,47	66,08	3,32	2,15	0,64	12,93
P27.4	1,94	0,67	0,38	62,69	3,34	1,82	0,62	15,28
P27.5	2,01	0,66	0,38	64,25	3,30	1,63	0,60	14,34
P27.6	1,95	0,62	0,35	64,56	3,02	1,91	0,45	14,08
P31.1	2,41	0,57	0,40	65,74	3,66	1,94	0,68	13,00
P31.2	2,38	0,57	0,36	65,47	3,54	1,78	0,52	13,50
P31.3	2,40	0,56	0,41	65,71	3,70	1,85	0,74	12,87
P31.4	2,24	0,53	0,40	64,25	3,36	2,13	0,84	13,85
P31.5	2,19	0,59	0,40	64,87	3,36	2,09	0,82	13,64
P31.6	2,29	0,62	0,39	65,59	3,27	1,87	0,50	13,71
P35.1	2,98	0,44	0,43	72,20	3,86	1,78	0,69	9,18
P35.2	3,02	0,44	0,50	72,15	3,79	1,96	0,65	9,25
P35.3	2,93	0,38	0,37	73,57	3,35	1,94	0,48	8,71
P35.4	2,88	0,44	0,45	72,58	3,79	1,66	0,65	9,24
P35.5	2,98	0,48	0,55	71,68	4,00	1,69	0,67	9,42
P35.6	2,94	0,44	0,48	73,32	3,80	1,82	0,50	8,87

Nastavak Tablice P1

pridružena glikanska struktura	FA2(6)BG		FA2(3)BG		FA2G2		FA2BG2		FA2(3)G1
	FA2(3)G1	1	1 + M6	A2G2	A2BG2	FA2G2	FA2BG2	S1 + M7	
pasaža	GP9	GP10	GP11	GP12	GP13	GP14	GP15	GP16	
P19.1	5,62	0,28	0,80	0,09	0,12	1,68	0,11	0,62	
P19.2	5,17	0,43	0,70	0,15	0,15	1,60	0,10	0,64	
P19.3	5,16	0,46	0,72	0,14	0,17	1,52	0,08	0,54	
P19.4	5,55	0,36	0,73	0,12	0,09	1,62	0,04	0,47	
P19.5	5,57	0,33	0,76	0,10	0,10	1,51	0,08	0,56	
P19.6	4,48	0,34	0,62	0,13	0,09	1,21	0,03	0,40	
P23.1	4,34	0,33	0,73	0,16	0,11	1,14	0,07	0,41	
P23.2	4,51	0,26	0,73	0,09	0,08	1,23	0,05	0,52	
P23.3	4,70	0,21	0,71	0,07	0,08	1,27	0,03	0,42	
P23.4	4,66	0,25	0,73	0,08	0,10	1,20	0,03	0,46	
P23.5	4,78	0,22	0,69	0,06	0,08	1,21	0,04	0,61	
P23.6	4,64	0,23	0,67	0,11	0,05	1,26	0,06	0,63	
P27.1	6,54	0,33	0,79	0,09	0,09	2,09	0,04	0,44	
P27.2	6,70	0,37	0,79	0,11	0,10	2,23	0,05	0,48	
P27.3	6,57	0,42	0,89	0,14	0,10	2,05	0,04	0,42	
P27.4	7,28	0,44	0,86	0,11	0,10	2,87	0,08	0,44	
P27.5	7,35	0,35	0,81	0,09	0,11	2,64	0,06	0,40	
P27.6	7,86	0,35	0,76	0,06	0,09	2,69	0,05	0,38	
P31.1	6,50	0,41	0,72	0,11	0,14	2,10	0,07	0,47	
P31.2	6,59	0,43	0,74	0,08	0,14	2,16	0,07	0,47	
P31.3	6,35	0,46	0,73	0,15	0,16	2,10	0,09	0,52	
P31.4	6,83	0,43	0,78	0,15	0,13	2,36	0,07	0,50	
P31.5	6,60	0,47	0,74	0,13	0,11	2,25	0,06	0,48	
P31.6	6,65	0,41	0,73	0,10	0,11	2,20	0,05	0,47	
P35.1	4,50	0,36	0,66	0,11	0,12	1,15	0,06	0,42	
P35.2	4,75	0,24	0,65	0,06	0,10	1,18	0,04	0,42	
P35.3	4,82	0,23	0,63	0,04	0,08	1,10	0,05	0,38	
P35.4	4,58	0,22	0,64	0,08	0,12	1,20	0,05	0,37	
P35.5	4,59	0,36	0,69	0,14	0,11	1,19	0,07	0,41	
P35.6	4,37	0,25	0,64	0,07	0,12	1,09	0,06	0,37	

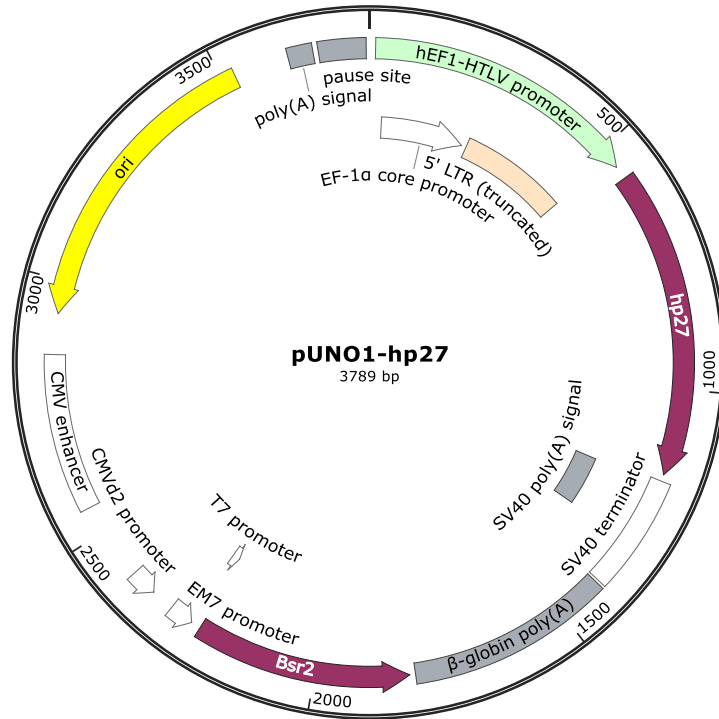
Nastavak Tablice P1

pridružena glikanska struktura	FA2G2S1		FA2G2BS		A2G2S2 +		FA2BG2S	
	A2G2S1	+ M8	1	FA2FG2S1	M9	A2BG2S2	FA2G2S2	2
pasaža	GP17	GP18	GP19	GP20	GP21	GP22	GP23	GP24
P19.1	0,21	0,53	0,09	0,08	0,26	0,02	0,15	0,19
P19.2	0,19	0,46	0,11	0,11	0,22	0,01	0,13	0,10
P19.3	0,28	0,53	0,11	0,10	0,24	0,02	0,18	0,14
P19.4	0,17	0,43	0,05	0,08	0,21	0,02	0,14	0,08
P19.5	0,33	0,64	0,11	0,06	0,26	0,02	0,17	0,16
P19.6	0,17	0,48	0,06	0,05	0,26	0,01	0,11	0,15
P23.1	0,19	0,35	0,07	0,07	0,15	0,02	0,07	0,06
P23.2	0,17	0,40	0,08	0,05	0,18	0,00	0,11	0,07
P23.3	0,19	0,35	0,07	0,04	0,16	0,02	0,06	0,08
P23.4	0,15	0,38	0,07	0,04	0,18	0,01	0,11	0,09
P23.5	0,22	0,52	0,08	0,06	0,31	0,04	0,14	0,16
P23.6	0,26	0,35	0,13	0,13	0,37	0,03	0,08	0,05
P27.1	0,18	0,37	0,05	0,02	0,18	0,00	0,09	0,04
P27.2	0,17	0,41	0,06	0,02	0,18	0,00	0,07	0,04
P27.3	0,17	0,36	0,05	0,03	0,17	0,00	0,08	0,04
P27.4	0,26	0,37	0,09	0,06	0,17	0,00	0,09	0,04
P27.5	0,23	0,33	0,11	0,03	0,18	0,02	0,06	0,06
P27.6	0,21	0,29	0,06	0,01	0,13	0,00	0,08	0,05
P31.1	0,17	0,39	0,10	0,04	0,18	0,02	0,13	0,06
P31.2	0,21	0,46	0,08	0,04	0,19	0,02	0,10	0,11
P31.3	0,25	0,44	0,08	0,03	0,21	0,01	0,11	0,07
P31.4	0,20	0,42	0,07	0,06	0,20	0,01	0,12	0,06
P31.5	0,19	0,44	0,10	0,04	0,20	0,01	0,13	0,08
P31.6	0,18	0,41	0,05	0,04	0,20	0,00	0,06	0,09
P35.1	0,24	0,38	0,07	0,04	0,16	0,01	0,10	0,06
P35.2	0,15	0,29	0,05	0,03	0,13	0,03	0,06	0,08
P35.3	0,14	0,32	0,07	0,02	0,19	0,02	0,12	0,07
P35.4	0,17	0,40	0,07	0,05	0,17	0,01	0,10	0,06
P35.5	0,17	0,31	0,06	0,05	0,16	0,01	0,11	0,09
P35.6	0,18	0,29	0,07	0,03	0,14	0,01	0,09	0,06

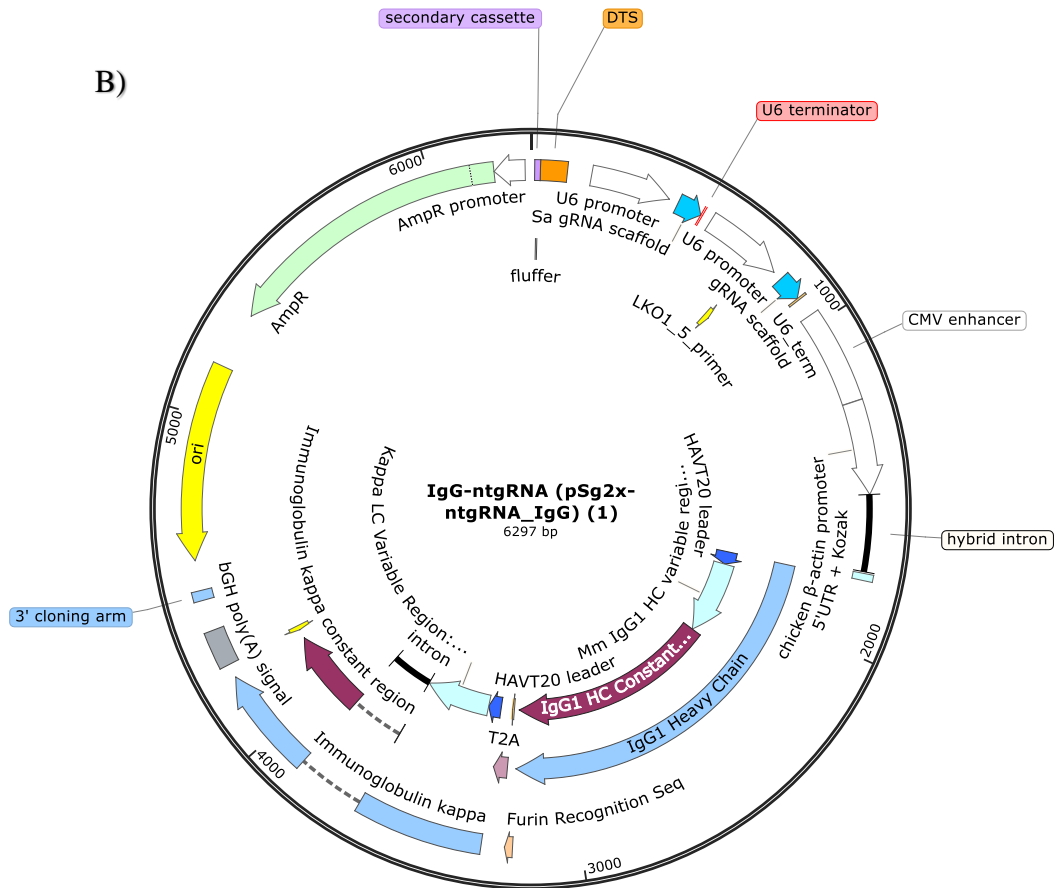


Slika P1. Vektorske mape plazmida A) pcDNA3-SV40LTcomp (p3SVLT) B) pUNO1-hp21

A)



B)



Slika P2. Vektorske mape plazmida A) pUNO27-hp1 B) IgG-ntgRNA