

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek
smjer: Biokemija

Helena Deriš

**Derivatizacija N-glikana Imunoglobulina G u visokoprotocnim
metodama analize**
Kemijski Seminar 1

Zagreb, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 GLIKOBIOLOGIJA	1
1.2 MONOSAHARIDI.....	1
1.3 GLIKOKONJUGATI.....	2
1.4 GLIKOPROTEINI (N-VEZANI GLIKANI I N-GLIKOZILACIJA)	3
1.5 IMUNOGLOBULIN G	4
1.6 VISOKOPROTOČNE ANALIZE GLIKOZILACIJE	6
2. VISOKOPROTOČNE ANALIZE N-GLIKANA IMUNOGLOBULINA G.....	7
2.1 IZOLACIJA IMUNOGLOBULINA G.....	8
2.2 OTPUŠTANJE N-GLIKANA S IZOLIRANOG IMUNOGLOBULINA G.....	9
2.2.1 ENZIMATSKO OTPUŠTANJE N-GLIKANA.....	10
2.2.2 KEMIJSKO OTPUŠTANJE N-GLIKANA	11
2.3 DERIVATIZACIJA.....	12
2.3.1 REDUKTIVNA AMINACIJA	13
2.3.2 MICHAELOVA ADICIJA	16
2.3.3 OBILJEŽAVANJE HIDRAZIDOM.....	17
2.3.4 PERMETILACIJA	19
2.4 PROČIŠĆAVANJE OTPUŠTENIH I DERIVATIZIRANIH N-GLIKANA.....	20
2.5 ANALIZA GLIKOPEPTIDA.....	21
2.6 KOMERCIJALNI SETOVI ZA BRZU PRIPREMU UZORAKA	22
2.6.1 GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit	22
2.6.2 Agilent AvanceBio Gly-x N-Glycan Prep with InstantPC Kit	24
2.7 SEPARACIJA I DETEKCIJA	25
2.7.1 HILIC-UHPLC-FLR	25
2.7.2 CGE-LIF	26
2.7.3. MASENA SPEKTROFOTOMETRIJA	27
3. TEHNIKA MIKROČIPOVA.....	29
4. ZAKLJUČAK	32
LITERATURA	33

1. UVOD

1.1 GLIKOBIOLOGIJA

Glikobiologija je relativno mlada grana molekularne biologije koja proučava strukturu, biosintezu, evoluciju i biološku funkciju glikana. Pojam glikana obično obuhvaća oligosaharidne lance vezane na druge biološke makromolekule (proteine, lipide), široko rasprostranjene u živim organizmima.

Tijekom revolucije molekularne biologije 1970-ih godina, proučavanje glikana uglavnom je kaskalo za proučavanjem ostalih makromolekula, dijelom zbog njihove strukturne složenosti, a dijelom zbog poteškoća u određivanju glikanskih sekvenci, naime, biosintezu glikana nemoguće je neposredno predvidjeti iz DNK predloška. Termin „glikobiologija“ stvoren je tek 1980-ih godina, zahvaljujući naglom razvoju tehnologije, posebice masene spektrofotometrije (razvoj ESI-MS i MALDI-MS tehnika)², koje su omogućile dublja istraživanja struktura i funkcija glikana, a prvenstveno je obuhvaćao kombinaciju načela biokemije i tradicionalne kemije ugljikohidrata s modernim razumijevanjem stanične i molekularne biologije glikana, posebno njihovih konjugata s proteinima i lipidima.

Područje glikobiologije je danas brzo rastuće polje prirodnih znanosti, a obuhvaća kemiju ugljikohidrata, enzimologiju biosinteze i razgradnje glikana, interakciju s receptorima, ulogu glikana u složenim biološkim sustavima te njihovu analizu ili manipulaciju raznim tehnikama.¹

1.2 MONOSAHARIDI

Prema IUPAC-ovoj definiciji, glikani su sinonim za polisaharide, makromolekule monosaharida povezanih glikozidnom vezom. No, u teoriji se pod pojmom glikana češće misli na ugljikohidratnu podjedinicu glikokonjugata.

Osnovna građevna jedinica ugljikohidrata su monosaharidi. Monosaharidi (šećeri) su molekule koje u svojoj strukturi sadrže karbonilnu skupinu, ili na kraju ugljičnog lanca (aldoze) ili na ugljiku unutar lanca (ketoze). Monosaharidi se najčešće sastoje od 6 ugljikovih atoma (heksoze). Četiri od šest ugljikovih atoma ima na sebe vezane četiri različite skupine, stoga heksoze imaju 4 kiralna centra. Skupine vezane na kiralne centre mogu se vezati na dva stereokemijski različita načina, stoga je mogući broj osnovnih heksoza 16 (2^4). Šećeri koji se razlikuju u konfiguraciji na samo jednom atomu ugljika nazivaju se epimeri (npr. D-glukoza i D-galaktoza). Šećeri koji se razlikuju u konfiguraciji na sva četiri kiralna centra i odnose se kao zrcalne slike nazivaju se enantiomeri (L-glukoza i D-glukoza). U prirodi nalazimo monosaharide u D konfiguraciji, iznimka je fukoza (pentoza) koja se kod sisavaca pojavljuje u L konfiguraciji.

U slobodnoj formi, monosaharide nalazimo u obliku lanca ili prstena, dok se unutar oligosaharida nalaze isključivo u formi prstena (konfiguracija piranoze). Sami oligosaharidi mogu biti linearni ili razgranati, a sastoje se od monosaharida povezanih glikozidnom vezom. Monosaharidi u formi prstena (piranoze) sadrže jedan kiralni anomerni centar, aldoze na C-1, a ketoze na C-2. Glikozidna veza je kovalentna veza između ugljika hemiacetalne (aldoze) ili hemiketalne (ketoze) skupine monosaharida i neke molekule koja sadrži nukleofilnu skupinu (npr. druga molekula monosaharida). Ovisno o položaju nukleofila (najčešće atoma kisika) u odnosu na anomerni ugljikov atom i monosaharidni prsten, razlikujemo α -glikozidnu i β -glikozidnu vezu koje mogu biti odgovorne za različita strukturna obilježja i biološke funkcije sekvenci inače identičnog sastava. Utjecaj vrste glikozidne veze najjednostavnije je prikazan na primjeru škroba i celuloze, obje makromolekule su homopolimeri glukoze, a razlikuju se u vrsti prevladavajućih veza kojima su povezane molekule glukoze, u škrobu prevladavaju α 1-4 veze, a u celulozi β 1-4 veze.^{1, 3}

1.3 GLIKOKONJUGATI

Glikokonjugati su spojevi u kojima su jedna ili više monosaharidnih ili oligosaharidnih jedinica (glikona) kovalentno povezane s neugljikohidratnim dijelom (aglikonom). Oligosaharid koji nije vezan za aglikon posjeduje reducirajuću snagu aldehida ili ketona u svojoj terminalnoj monosaharidnoj komponenti (izuzev oligosaharida u kojima su šećeri povezani na svojim reducirajućim krajevima, kao u derivatima saharoze ili trehaloze). Kraj glikana na kojem se nalazi aldehidna ili ketonska skupina stoga se naziva reducirajući kraj, pojam koji se obično koristi čak i kada je šećerni lanac vezan za aglikon i na taj je način izgubio svoju reducirajuću snagu. Sukladno tome, suprotni kraj lanca naziva se nereducirajućim krajem. Najčešći monosaharidi koji se pojavljuju u građi glikokonjugata kod kralježnjaka su:

1. pentoze (neutralni šećeri s pet ugljikovih atoma, npr. D-ksiloza);
2. heksoze (neutralni šećeri sa šest ugljikovih atoma, npr. D-galaktoza);
3. heksozamini (heksoze s amino skupinom na poziciji 2, koja može niti slobodna ili, češće, N-acetilirana, npr. N-acetil-D-glukozamin);
4. 6-deoksiheksoze (npr. L-fukoza);
5. uronske kiseline (monougljične kiseline dobivene oksidacijom terminalne hidroksilne skupine aldoza u karboksilnu skupinu, npr. D-glukuronska kiselina);
6. sijalinske kiseline (α -keto kiseline s 9 ugljikovih atoma, npr. N-acetilneuraminska kiselina).

Nadalje, slobodne hidroksilne skupine mnogih monosaharida su podložne raznim modifikacijama, od kojih su najčešće fosforilacija, sulfatacija, metilacija, O-acetilacija i acilacija masnim kiselinama, što dodatno doprinosi raznovrsnosti glikana. Također, često dolazi do modifikacija slobodnih hidroksilnih skupina monosaharida, kao što su

laktonizacija sa susjednom hidroksilnom skupinom ili laktamizacija sa susjednom amino skupinom.

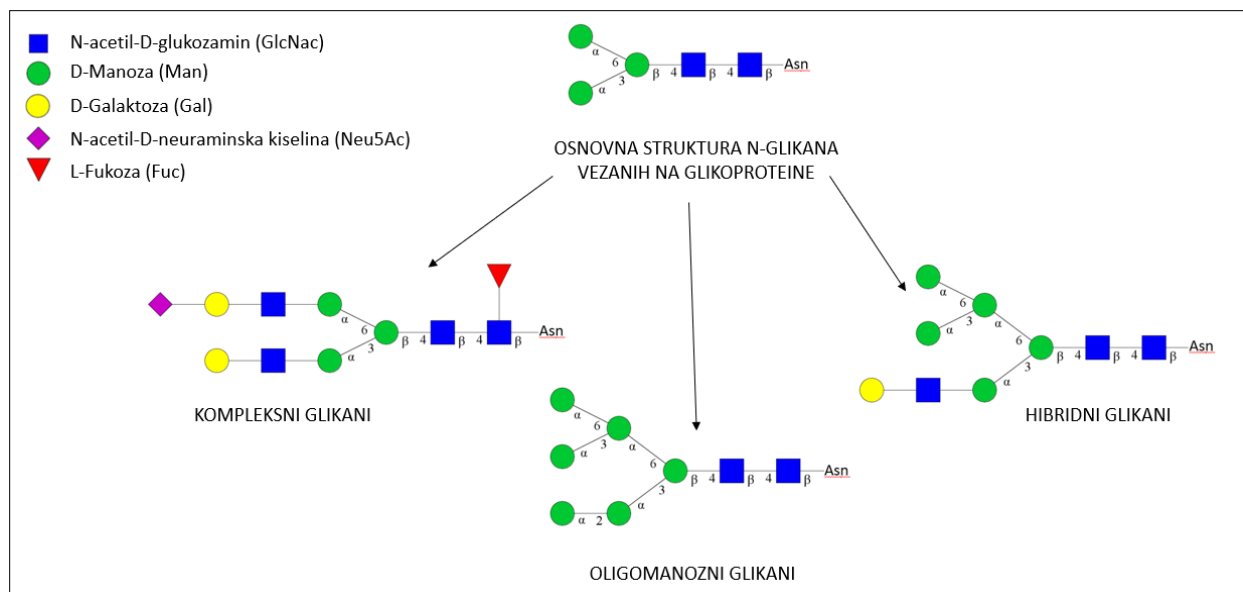
Glikokonjugati se ne razlikuju samo po ugljikohidratnoj podjedinici već i po vrsti aglikona na kojeg je ona vezana. Prema tome razlikujemo nekoliko kategorija glikokonjugata koje nalazimo u prirodi: glikani vezani na aminokiseline (peptidoglikani), glikani vezani na proteine (glikoproteini, glikopeptidi), glikani vezani na lipide (glikolipidi, lipopolisaharidi) te glikani vezani na druge male molekule (glikozidi).^{1, 3}

1.4 GLIKOPROTEINI (N-VEZANI GLIKANI I N-GLIKOZILACIJA)

Glikoproteini se nalaze u svim dijelovima stanica, a mogu biti i vezani na membranu ili sekretorni. Uključeni su u staničnu signalizaciju, interakciju i prepoznavanje i neophodni su za pravilno funkcioniranje kako pojedinih stanica, tako i organizma u cjelini. Glikani vezani na proteine značajno utječu na samu strukturu glikoproteina, njegovo smatanje, funkciju i stabilnost.⁴

Najčešći načini vezanja glikana na proteine je ili preko amidnog dušikovog atoma na bočnom lancu asparagina (Asn) u proteinskoj okosnici (N-vezani glikani) ili preko kisikovog atoma na bočnom lancu serina (Ser) ili treonina (Thr) u proteinskoj okosnici (O-vezani glikani). Da bi se glikani mogli vezati na asparagin, asparagin se mora nalaziti u trijadi aminokiselina: Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr, gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu osim prolina.

Kod eukariota svi N-vezani glikani započinju N-acetilglukozaminom (GlcNAc) β -1 vezanim na asparagin, također svi imaju jednake monosaharide u sržnom dijelu glikana: $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ (*slika 1*). Na osnovnu se strukturu zatim vežu ostali monosaharidi, a ovisno o vezanim monosaharidima glikani se dijele na: kompleksne glikane (osnovna struktura ima jednu ili više antena koje počinju N-acetilglukozaminom), oligomanozne (različit broj manozna vezan na osnovnu strukturu) te hibridne glikane (na $\text{Man}\alpha 1-3$ krak osnovne strukture dodane su jedna ili dvije antene koje počinju N-acetilglukozaminom, a na $\text{Man}\alpha 1-6$ krak osnovne strukture vezane su isključivo manoze).^{1, 5}



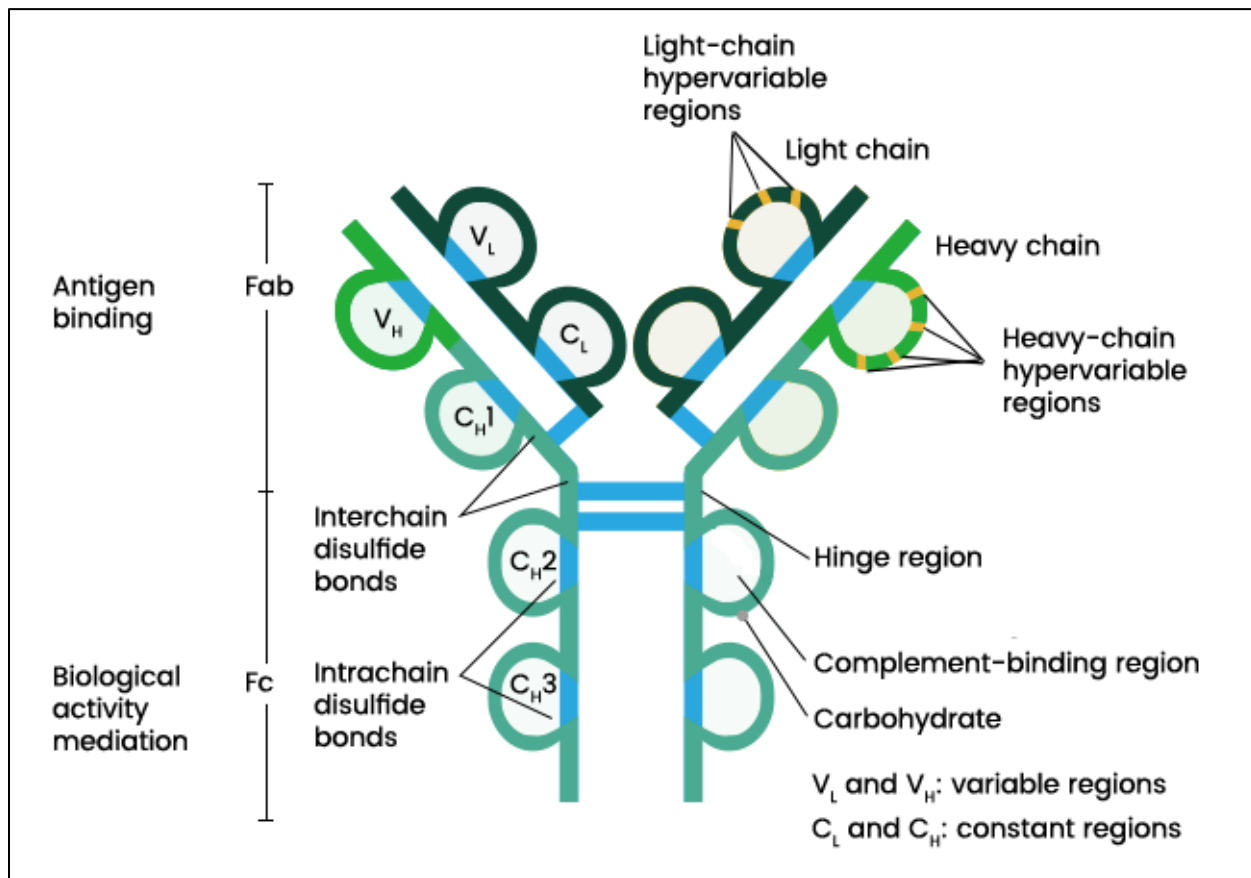
Slika 1. Na slici je prikazana osnovna (sržna) struktura N-vezanih glikana imunoglobulina G te tri vrste mogućih glikanskih struktura, kompleksni, oligomanozni i hibridni glikani. U lijevom gornjem kutu dana je legenda svih monosaharida koji mogu biti prisutni na IgG-u.

Proces vezanja glikana na proteine zove se glikozilacija. N-glikozilacija je i kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina. Vezanje N-glikana na protein započinje u endoplazmatskom retikulumu dok još traje translacija proteina, a nastavlja se u Golgijevom aparatu, dok se O-glikozilacija odvija isključivo posttranslacijski u Golgijevom aparatu.^{1,5} Za razliku od sinteze peptida, glikozilacija se ne odvija prema kalupu, no svejedno je strogo regulirana na više razina. U regulaciji sudjeluju takozvani „glikoenzimi“ (enzimi vezani za glikozilaciju). Kod ljudi je dosada pronađeno oko 500 glikoenzima, od čega 209 glikoziltransferaza, 76 glikozidaza, 114 enzima uključenih u metabolizam i transport monosaharida, 54 enzima vezana uz sulfataciju i 31 enzim uključen u regulaciju biosinteze glikolipida i GPI (N-glikozilfosfatidil inozitol) sidra.⁶

1.5 IMUNOGLOBULIN G

Imunoglobulin G (IgG) jedan je od najzastupljenijih glikoproteina plazme, sintetiziran je u plazma stanicama te čini važan dio humoralnog imunološkog odgovora. Koncentracija u plazmi zdravih osoba je između 7 i 18 mg/mL.⁷ Dio je superporodice imunoglobulina (IgSF) koja se sastoji od 5 različitih razreda, tj. izotipova, IgM, IgG, IgA, IgD i IgE, prema aminokiselinskom slijedu teškog lanca u Fc domeni. Imunoglobulin G se zatim dijeli u 4 podrazreda IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, također prema aminokiselinskom poretku i broju disulfidnih veza između teških lanaca. IgG se sastoji od dva teška (H) polipeptidna lanca (50 – 70 kDa) i dva laka (L) polipeptidna lanca (25 kDa), *slika 2*. Svaki težak lanac vezan je disulfidnim vezama za jedan laki lanac, a teški lanci su međusobno također vezani disulfidnim vezama u području zgloba. Područje zgloba dijeli IgG u dvije domene, Fab

domenu (Fragment antigen binding) i Fc domenu (Fragment crystallizable). Fab domena odgovorna je za prepoznavanje i vezanje antigena, dok je kristalizabilna Fc domena odgovorna za vezanje na FcγR receptor na površini stanica imunološkog sustava i efektorsku funkciju IgG-a. Fab domena sastoji se od C_{H1} (C dolazi od „Constant“, a H od „Heavy chain“) i V_H (V dolazi od „variable“) regija teških lanaca te C_L (L dolazi od „light chain“) i V_L regija lakih lanaca koje vežu određene antigene. Varijabilne regije odgovorne su za prepoznavanje i antigensku specifičnost. Fc domena sastoji se od dviju evolucijski visokokonzerviranih regija, C_{H2} i C_{H3} na svakom teškom lancu. U C_{H2} regijama na oba teška lanca se nalaze asparaginski ostaci (Asn-297) na kojima se nalaze N-vezani glikanski lanci. Također, 15 – 20% IgG molekula sadrži dodatna glikozilacijska mjesta na Fab domeni. Fc N-vezani glikani nalaze se u hidrofobnom džepu, smatra se da su poprilično rigidni kako bi održali Fc domenu u otvorenoj konformaciji i omogućili vezanje na FcγR receptor, dok su Fab vezani glikani puno fleksibilniji. Također, postoji razlika u sastavu glikana na Fc i Fab domeni, količina glikana sa sijalinskom kiselinom i račvujućim N-acetilglukozaminom u strukturi je veća kod Fab vezanih glikana.^{4, 8, 9} Kod imunoglobulina G3 pronađeni su i O-vezani glikani u području zglobove regije.¹⁰ Zbog svog širokog spektra djelovanja i važnosti u imunološkom odgovoru, IgG je jedan od najproučenijih glikoproteina.



Slika 2. Građa imunoglobulina G. Fab – domena koja veže antigen, Fc – kristalizabilna domena. Slika preuzeta s <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/antibody-structure-function>.

Promjene u glikozilaciji Fc domene imunoglobulina G mogu mu drastično promijeniti funkciju, a ovisе o starosti, spolu i prisustvu ili odsutnosti bolesti.⁴ Primijećeno je da starenjem dolazi do porasta glikanskih struktura s račvajućim N-acetilglukozaminom i agalaktoziliranih glikanskih struktura (glikana bez galaktoze, G0), a smanjenja digalaktoziliranih (glikani s dvije galaktoze u strukturi, G2). Kod nekih autoimunih bolesti, poput reumatoidnog artritisa, također dolazi do značajnog porasta agalaktoziliranih struktura. Suprotno tome, tijekom trudnoće privremeno dolazi do smanjenja imunoglobulina G s agalaktoziliranim glikanskim strukturama, dapače, kod trudnica koje boluju od artritisa primijećena je remisija bolesti što je povezano upravo sa smanjenjem agalaktoziliranih N-glikana IgG-a.¹¹ Promjene u glikozilaciji uočene su i u drugim autoimunim bolestima, karcinomima, upalnim bolestima, kao i kod nekih zaraznih bolesti, što glikane stavlja u fokus istraživanja kao potencijalnih biomarkera.⁴

IgG molekule bez sržne fukoze na glikanima su i do 100 puta uspješnije u aktivaciji stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima, u odnosu na fukoze molekule, zbog većeg afiniteta za vezanje na FcIIIR receptor, a prisutnost glikana sa sijalinskim kiselinama mijenja aktivnost IgG molekule iz proupalne u protuupalnu. Činjenica da specifične glikoforme IgG-a mogu imati protuupalno djelovanje, koristi se kod intravenske primjene imunoglobulina G (IVIg), kao terapija za suzbijanje mikrobne infekcije te kod upalnih i autoimunih bolesti. Obogaćivanje pripravka terminalnom sijalinskom kiselinom pospješuje protuupalno djelovanje IVIg-a.⁴ Važnost analize glikozilacije proteina sve više dolazi do izražaja i u farmaceutskoj industriji, posebice kod razvoja monoklonskih protutijela (mAb, monoclonal antibody). Većina monoklonskih protutijela na tržištu spada u razred imunoglobulina G te se pokazalo kako glikozilacija ne utječe samo na stabilnost već i na vezanje mAb pripravaka na receptore, uspješnost terapije i nuspojave.¹²

1.6 VISOKOPROTOČNE ANALIZE GLIKOZILACIJE

Analizama glikozilacije velikim studijama, gdje se istovremeno analiziraju velike skupine pacijenata s nekom specifičnom bolešću i zdravih pojedinaca (kontrola), mogu se razjasniti specifične promjene u glikozilaciji koje su povezane s nekom bolešću i kako, ako uopće, variraju tijekom bolesti. Tako otkriveni glikanski biomarkeri mogu potencijalno utjecati na smjer i vrstu terapije. Ovako velike studije često uključuju od nekoliko stotina do nekoliko tisuća uzoraka koji se mogu analizirati mjesecima. Stoga je za analizu glikozilacije ključan razvoj osjetljivih, robusnih i pristupačnih visokoprotlačnih metoda.⁴

2. VISOKOPROTOČNE ANALIZE N-GLIKANA IMUNOGLOBULINA G

Opsežne studije glikoma omogućuju identifikaciju netipičnih uzoraka glikozilacije u pojedinim bolestima te pružaju informaciju o funkcionalnoj važnosti pojedinih glikana.

Derivatizacija glikana se provodi u svrhu vezanja kromofora na glikane i poboljšanja ionizacijskih svojstava, čime se omogućuje analiza glikanskih struktura separacijskim tehnikama s optičkom (tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama s fluorescencijskom detekcijom, HILIC-UHPLC-FLR i kapilarna gel elektroforeza s laserom potpomognutom detekcijom, CGE-LIF) ili maseno spektrofotometrijskom detekcijom (tekućinska kromatografija spregnuta s elektronsprej masenom spektroskopijom LC-ESI-MS te matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija s masenom spektroskopijom, MALDI-MS).⁴

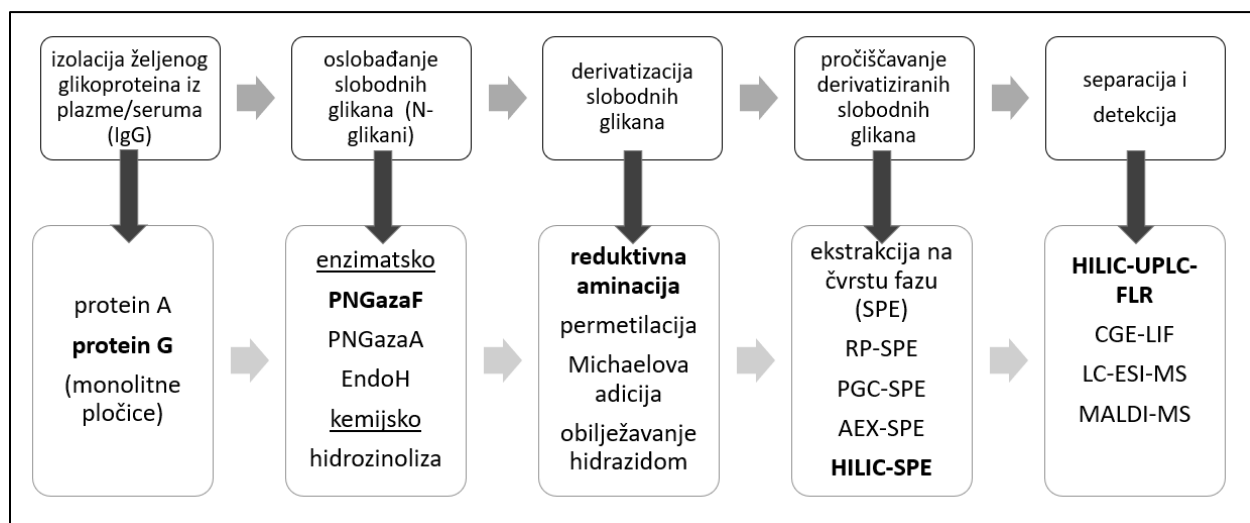
Većina razvijenih visokoprotičnih metoda odnosi se na analizu slobodnih i derivatiziranih N-glikana imunoglobulina G za HILIC-UHPLC ili CGE-LIF separaciju i detekciju. Prednost takvih metoda je što omogućuju detaljnu analizu strukture glikana s obje domene IgG-a, Fab i Fc. Iako su takve tehnike pouzdane za kvantifikaciju struktura, treba imati na umu da ne pružaju nikakvu informaciju o mjestu vezanja glikana na protein. Masenom se spektroskopijom najčešće analiziraju glikopeptidi (samo s Fc domene) koji pružaju informaciju o mjestu vezanja glikana na protein, a također je moguće odrediti specifičnu Fc glikozilaciju pojedinih podrazreda IgG-a, no masena spektroskopija pruža slabiju kvantifikaciju, posebice sijalinskih kiselina, te iziskuje dodatne korake derivatizacije za stabilizaciju sijaliniziranih struktura.⁴

Najčešće korištene derivatizacijske tehnike su redom: reduktivna aminacija i permetilacija, a koriste se još i Michaelova adicija i obilježavanje hidrazidom. Odabir prikladne metode derivatizacije ne ovisi samo o tome koja će se separacijska metoda kasnije koristiti za analizu, već i o načinu oslobađanja slobodnih glikana iz glikoproteina. Naime, reduktivna aminacija, Michaelova adicija i obilježavanje hidrazidom zahtijevaju slobodan reducirajući kraj glikana, što ih čini prikladnima za derivatizaciju N-glikana, no ne i za derivatizaciju O-glikana koji se oslobađaju reduktivnom β -eliminacijom.¹³

Većina protokola za analizu N-glikana ljudskog imunoglobulina G počinje izolacijom IgG-a iz plazme ili seruma, zatim slijedi otpuštanje glikana s IgG-a te derivatizacija slobodnih glikana. Prije separacije i detekcije glikana, smjesu s obilježenim glikanima potrebno je pročistiti od suviška soli i sredstva za derivatizaciju.¹³

Kod visokoprotičnih analiza, gdje se kreće iz velikog broja uzoraka, izuzetno je bitno da se što više uzoraka može obraditi odjednom te je većina metoda modificirana na način da se odjednom može analizirati 96 uzoraka, tj. sav potrošni materijal dolazi u formatu pločice s 8 x 12 jažica.

Shema analize N-glikana imunoglobulina G dana je na slici 3.



Slika 3. Shema analize N-glikana imunoglobulina G u visokoprotocnim metodama analize. Najčešće korištene tehnike su podebljane. RP-SPE – ekstrakcija na čvrstu fazu kromatografijom obrnutih faza, PGC-SPE – ekstrakcija na čvrstu fazu kromatografijom poroznim grafitnim ugljikom, AEX-SPE – ekstrakcija na čvrstu fazu kromatografijom izmjene iona, HILIC-SPE - ekstrakcija na čvrstu fazu tekućinskom kromatografijom temeljenoj na hidrofiličnim interakcijama, HILIC-UPLC-FLR - tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofiličnim interakcijama s fluorescencijskom detekcijom, CGE-LIF – kapilarna gel elektroforeza s laserom induciranom fluorescencijskom detekcijom, LC-ESI-MS – tekućinska kromatografija spregnuta s elektrosprej masenom spektroskopijom, MALDI-MS - matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija s masenom spektroskopijom.

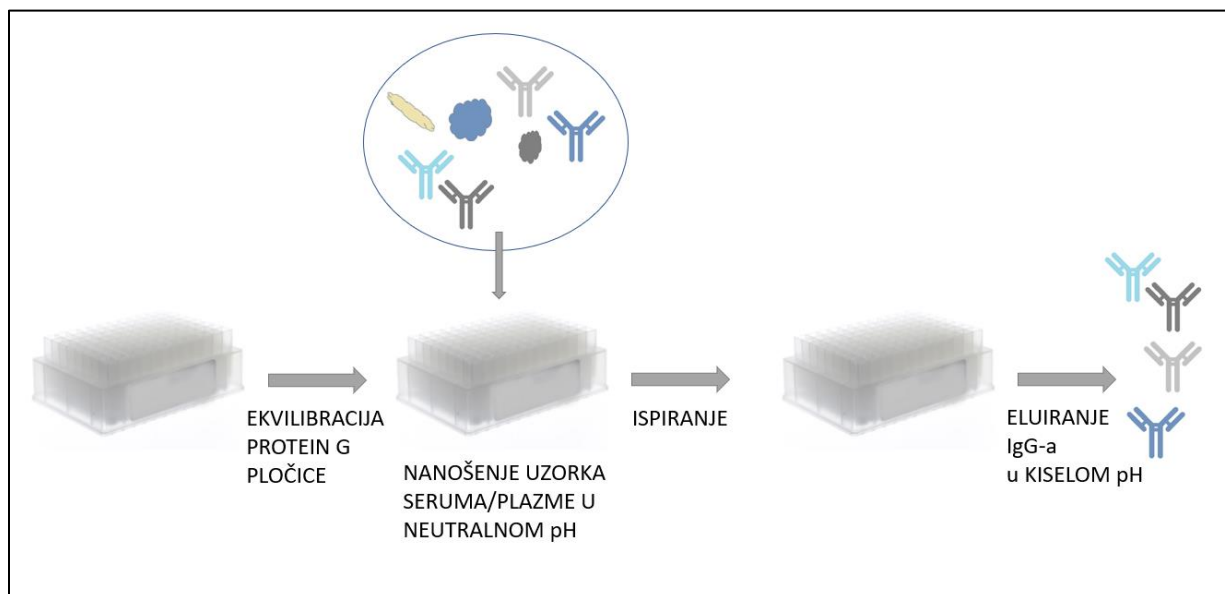
2.1 IZOLACIJA IMUNOGLOBULINA G

Za izolaciju imunoglobulina G iz uzoraka seruma ili plazme u visokoprotocnim metodama analize najčešće se koristi afinitetna kromatografija pomoću imobiliziranog proteina A ili proteina G. Protein A i protein G su bakterijski proteini koji na sebe vežu ne samo IgG iz ljudske plazme, već i mnogih drugih vrsta, a na tržište dolaze u raznim oblicima, kao zrnca (sefrozna zrnca, agarozna zrnca, magnetna zrnca) ili kao monolitne pločice s različitim brojem jažica. Za visoko protočne analize se koriste pločice s 96 jažica.¹¹

Razlika između proteina A i proteina G je u tome što protein G veže sva četiri podrazreda IgG-a, IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 (srednja konstanta disocijacije za sva četiri podrazreda $K_d \sim 2 \times 10^{-10} \text{ mol/dm}^3$) dok protein A veže samo IgG1, IgG2 i IgG4 (srednja konstanta disocijacije za sva tri podrazreda $K_d \sim 2 \times 10^{-9} \text{ mol/dm}^3$). Optimalan pH za vezanje IgG-a na protein G je između 4 i 5, dok je za vezanje na protein A optimalan pH 8.0. Za obje vrste proteina glavno mjesto vezanja na IgG-u je u području Fc domene i to kod spoja

regija CH₂-CH₃, pri čemu u vezanju sudjeluju tri aminokiselinska ostatka s CH₂ regije i četiri s CH₃ regije. Kompleks proteina G s Fc domenom uključuje nabijene i polarne interakcije, dok se kompleks proteina A s Fc domenom stabilizira uglavnom nespecifičnim hidrofobnim interakcijama.^{14, 16}

Korištenje pločica s 96 jažica omogućuje jednostavno nanošenje uzoraka pri neutralnom pH, dok se IgG eluira pri niskom pH (npr. 0.1 M amonijev formijat), nakon čega ga je potrebno neutralizirati (npr. 1 M amonijev bikarbonat) odmah nakon eluiranja kako ne bi došlo do neželjene hidrolize sijalinskih kiselina.¹⁷ Velika prednost ovakvog afinitetnog pročišćavanja je mogućnost regeneracije proteina A i G, njihovim pravilnim ispiranjem i skladištenjem osigurava se veći broj ciklusa izolacije IgG-a.¹⁵ Nedostatak ovakvog načina izolacije je što se dobiveni IgG nalazi u velikoj količini soli, stoga je vrlo često potrebno odsoljavanje (npr. hladnim metanolom)¹⁸ ili izmjena pufera prije daljnje analize glikozilacije.¹³ Shema izolacije IgG-a primjenom protein G pločice s 96 jažica dana je na slici 4.



Slika 4. Shema izolacije sva 4 podrazreda imunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) primjenom protein G monolitne pločice s 96 jažica.

2.2 OTPUŠTANJE N-GLIKANA S IZOLIRANOG IMUNOGLOBULINA G

Nakon izolacije IgG-a iz inicijalnog uzorka potrebno je osloboditi glikane iz kompleksa s proteinom. Oslobođanje N-glikana s proteinske okosnice IgG-a može se izvesti enzimatski ili kemijski, no u visokoprotocnim analizama se najčešće primjenjuje enzimatsko oslobađanje.¹³

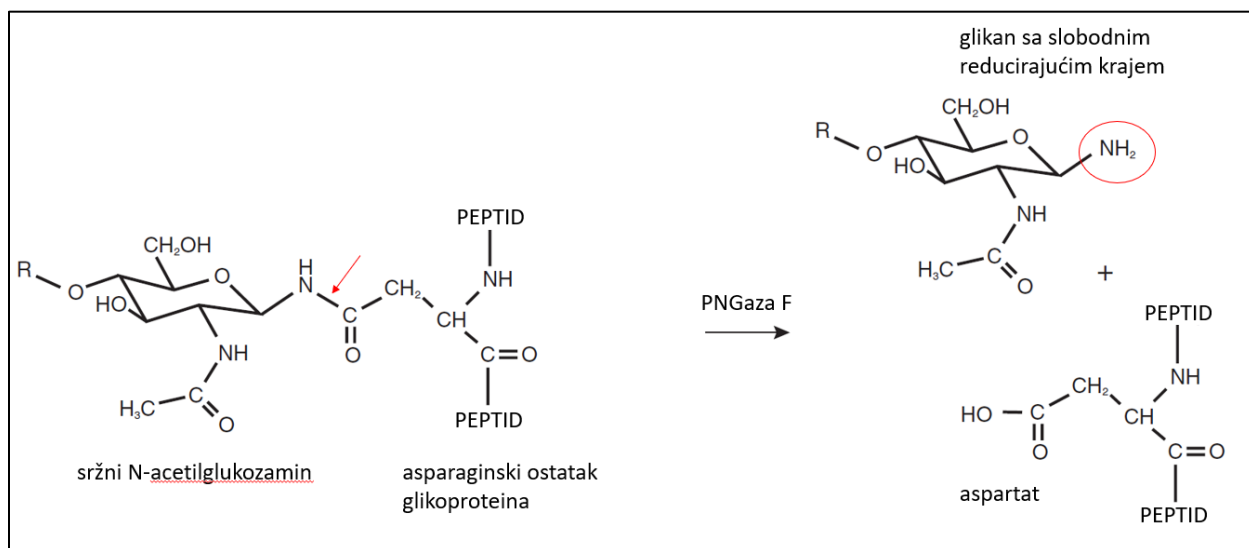
2.2.1 ENZIMATSKO OTPUŠTANJE N-GLIKANA

Neposredno prije enzimatskog otpuštanja glikana, IgG je potrebno denaturirati kako bi se postepo pristup enzima veznom mjestu glikana. Za kidanje disulfidnih veza se najčešće koristi SDS (natrijev dodecil sulfat), β -merkaptotanol, ditiotretol (DTT) ili njihova kombinacija pri povišenim temperaturama.

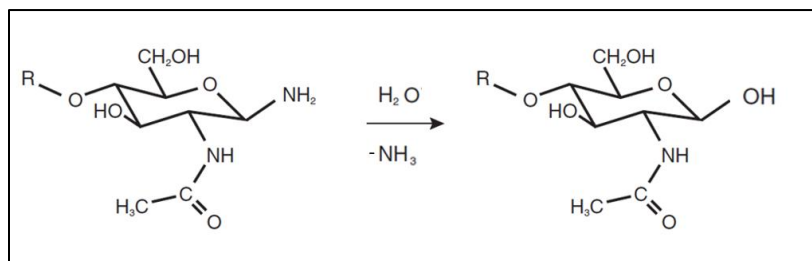
Za enzimatsko otpuštanje glikana u otopini koriste se endoglikozidaze koje kataliziraju cijepanje unutarnje glikozidne veze glikokonjugata. Najčešća je u upotrebi PNGaza F, a koriste se još i PNGaza A i Endo H, ovisno o potrebama daljnje analize.^{13, 4}

PNGaza F (N-glikozidaza F; peptidil-N4-(N-acetil- β -glukozaminil) asparagin amidaza F) je enzim koji uspješno otpušta sve na asparagin N-vezane oligosaharide, osim onih koji sadrže α 1-3 sržnu fukozu (sržna modifikacija glikana koja nije prisutna kod sisavaca), uključujući i visokomanozne, hibridne i kompleksne glikane. Mehanizam deglikozilacije prikazan je na slici 5. Nakon deglikozilacije dobije se glikan sa slobodnim reducirajućim krajem koji je spreman za daljnju derivatizaciju te protein kod kojeg dolazi do deaminacije asparaginskog ostatka u asparaginsku kiselinu (slika 5A). Slobodni glikan je u obliku glikozilamina, no u vodenom mediju dolazi do spontane hidrolize primarnog amina u hidroksilnu skupinu te se otpušta amonijak (slika 5B). Optimalni radni pH enzima je 8.6, no enzim je aktivan u pH području od 6 do 10. Još jedna prednost ovog enzima je što zadržava aktivnost u uvjetima reakcije (37 °C) i preko tri dana, zbog čega je prikladan za dulje inkubacije s nativnim glikoproteinima.^{19, 13, 20}

A)



B)



Slika 5. Mehanizam enzimske deglikozilacije glikoproteina pomoću enzima PNGaze F, produkti reakcije su protein s asparaginskom kiselinom umjesto asparaginom i glikan s amino skupinom na slobodnom reducirajućem kraju (A)¹⁹, koja u vodenom mediju spontano hidrolizira (B)²⁰. B slika modificirana, preuzeta s <https://icggdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t58>, R- monosaharidi povezani glikozidnim vezama.

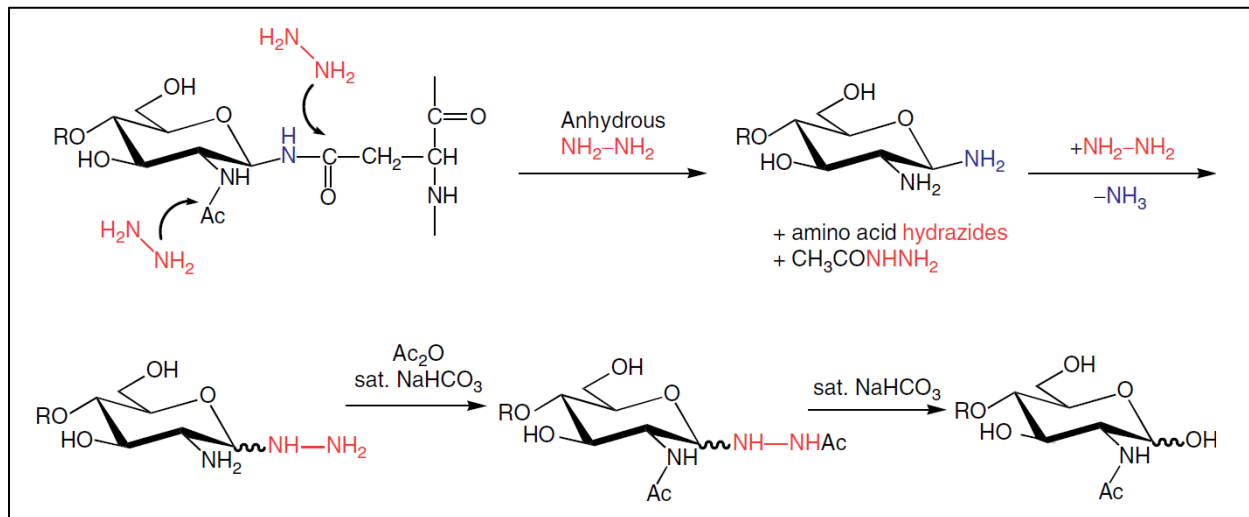
PNGaza A (N-glikozidaza A; peptidil-N4-(N-acetil-β-glucosaminil) asparagin amidaza A) otpušta glikane otporne na PNGazu F, dakle one oligosaharide koji sadrže α1-3 sržnu fukozu. Mehanizam djelovanja je sličan onom PNGaze F, nakon cijepanja dobiju se slobodan glikan i deaminirani peptid s aspartatom umjesto asparagina. No za razliku od PNGaze F, PNGaza A ne može katalizirati deglikozilaciju nativnog imunoglobulina G, već samo glikopeptida.^{13, 4, 15}

Endo H (endoglikozidaza H; endo-β-N-acetilglucosaminidaza H) je visoko specifična endoglikozidaza koja otpušta isključivo oligomanozne i hibridne glikane. Nije prikladna za većinu analiza N-glikana s obzirom da ne hidrolizira glikozidnu vezu kompleksnih glikana. Također, za razliku od prethodno spomenuta dva enzima, mjesto cijepanja glikozidne veze je između dva sržna N-acetilglucosamina, dakle ostavlja jedan GlcNac vezan na asparaginski ostatak proteina. Sličan mehanizam ima i endoglikozidaza F1, osim što je manje osjetljiva na konformaciju proteina, što znači da prije digestije s Endo F1 nije potrebno denaturirati protein.^{13, 4, 15}

2.2.2 KEMIJSKO OTPUŠTANJE N-GLIKANA

Kemijski princip otpuštanja glikana s pročišćenog glikoproteina jest alkalna hidroliza, tj. hidrazinoliza. Kod ovog pristupa treba biti na oprezu jer se uz N-vezane glikane otpuštaju i O-glikani. Hidrazinoliza nije toliko praktična za rutinske analize kao enzimatsko otpuštanje zbog kompliciranijih uvjeta analize, naime reakcija se odvija 8-12 sati na temperaturi od 100 °C, a sam hidrazin je izuzetno anhidrična, toksična i eksplozivna kemikalija te je potrebno paziti kako ne bi došao u kontakt s vodom. Mehanizam reakcije nije u potpunosti razjašnjen, a pretpostavljeni mehanizam reakcije prikazan je na slici 6. Glikoprotein se u potpunosti pocijepa, aminokiseline se otpuštaju u obliku hidrazida, a oslobođeni N-glikani gube N-acetilnu skupinu, stoga je nakon hidrazinolize potrebno

ponovno N-acetilirati glikane te pocijepati popratne acetohidrazonske derivate kako bi se dobili slobodni reducirajući krajevi. ^{13,21}



Slika 6. Pretpostavljeni mehanizam reakcije alkalne hidrolize glikoproteina anhidričnim hidrazinom ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$). ²¹

Također, količina ovako oslobođenih slobodnih glikana može biti premala za daljnju pripremu uzoraka, što zbog manje učinkovitosti deglikozilacije, što zbog mogućih nuspojava i gubitka glikana tijekom postupka. Iz tih se razloga kemijska deglikozilacija koristi rijetko u visokoprotočnim analizama glikana.⁴

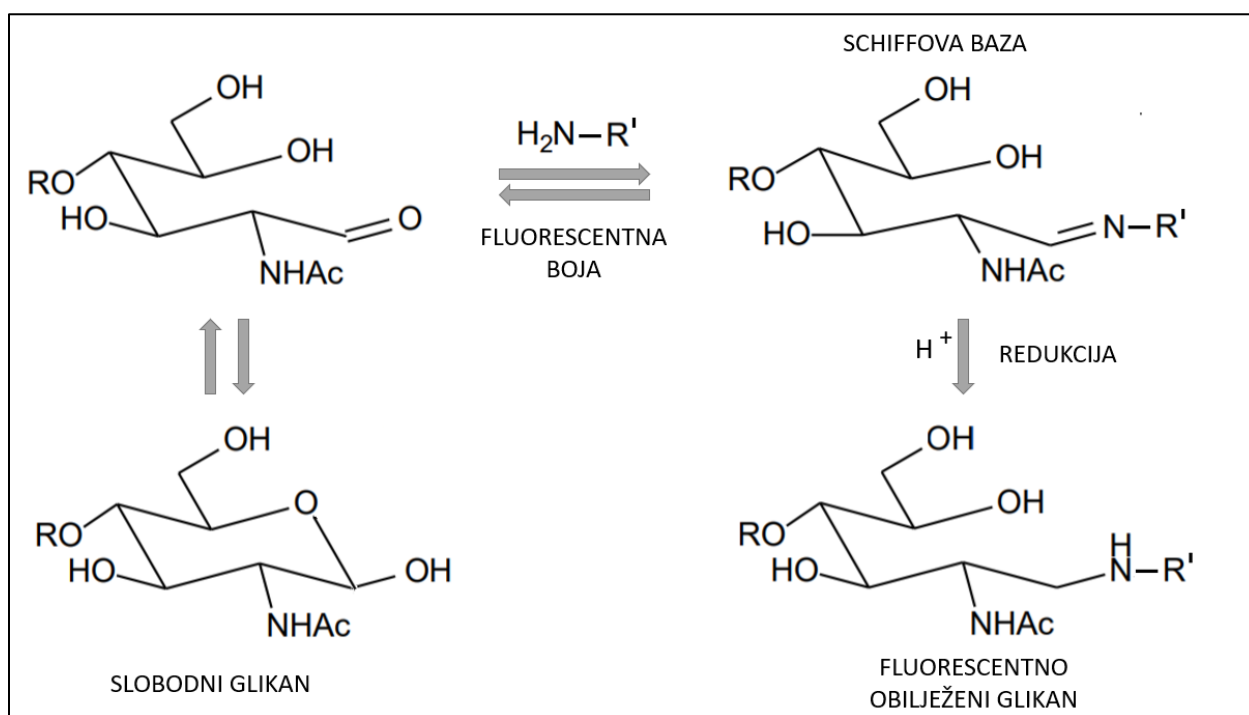
2.3 DERIVATIZACIJA

Daljnja analiza oslobođenih N-glikana s IgG-a može teći u nekoliko koraka:

1. obilježavanje reducirajućeg kraja slobodnih N-glikana reduktivnom aminacijom (najčešće), Michaelovom adicijom ili obilježavanjem hidrazidom, nakon čega slijedi separacija tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti, kapilarnom gel elektroforezom ili masenom spektrofotometrijom;
2. permetilacija svih slobodnih hidroksilnih, amino i karboksilnih skupina, nakon čega se provodi masena spektrofotometrija – MALDI ili ESI;
3. nativni, neobilježeni, reducirajući kraj glikana moguće je analizirati MALDI-TOF (detekcija vremena preleta elektrona) masenom spektrofotometrijom.¹³

2.3.1 REDUKTIVNA AMINACIJA

Reducirajući kraj glikana obilježi se fluorescentnom ili UV-apsorbirajućom bojom što omogućava detekciju i kvantifikaciju glikana, ovisno o primijenjenoj razdvajajućoj tehnici. Limit detekcije za oligosaharide obilježene fluorescentnom bojom je otprilike 10 puta viši u odnosu na UV-apsorbirajuće boje, stoga se za obilježavanje glikana najčešće koriste fluorescentne boje koje u svojoj strukturi sadrže aromatske amine, a vežu se svojim primarnim aminom na aldehidnu skupinu glikana i reakcijom kondenzacije dolazi do stvaranja Schiffove baze, *slika 7*. Medij u kojem dolazi do reakcije je najčešće dimetil-sulfoksid s dodatkom octene kiseline (70:30), a alternativno se još koriste i tetrahidrofuran i metanol. Prednost ovakve vrste obilježavanja je stehiometrijski odnos 1:1, odnosno, jedna molekula boje na jednu molekulu glikana, što omogućuje direktnu kvantifikaciju prema intenzitetu fluorescencije ili UV-apsorbancije.^{22, 4, 13}

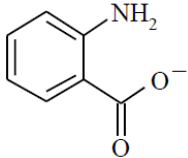
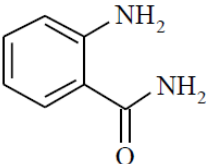
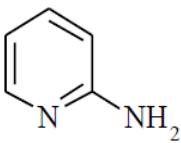


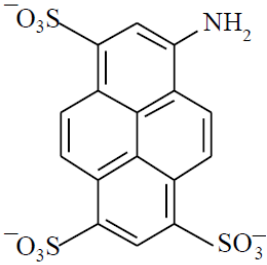
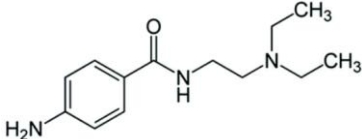
Slika 7. Mehanizam reduktivne aminacije. R – monosaharidi vezani glikozidnom vezom, R' – fluorofor.

Za fluorescentno obilježavanje glikana koristi se velik broj boja slične strukture, a najčešće korištene fluorescentne boje nabrojane su u *tablici 1*. S obzirom na široku upotrebu, za većinu navedenih boje na tržištu postoje komercijalni setovi sa svim potrebnim reagensima za brzu i reproducibilnu analizu. U skladu sa zahtjevom za fluorescenciju, sve boje sadrže u strukturi aromatski prsten s delokaliziranim π-elektronima koji moraju biti u koplanarnoj konformaciji i s funkcionalnim skupinama za postizanje maksimalnog intenziteta. Amino skupina, koja je neophodna za stvaranje Schiffove baze, također pridonosi intenzitetu fluorescencije svojom elektrodonorskom prirodom. Trenutno se na tržištu nalaze i „rapidne“ verzije klasičnih boja, koje se razlikuju

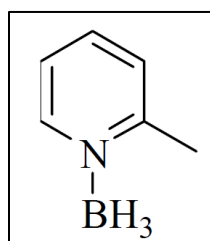
u funkcionalnim skupinama te posljedično brzini reakcije obilježavanja i intenzitetu fluorescencije, no često su i puno skuplje te stoga nisu prvi izbor kod obilježavanja velikog broja uzoraka. ²²

Tablica 1. Najčešće korištene fluorescentne boje u visokoprotočnim analizama s UHPLC, CGE i MS detekcijom.

FLUORESCENTNA BOJA	KRATICA	STRUKTURA	PRIMJENA
2-aminobenzoična kiselina (2-antranilna kiselina)	2-AA (AA)	 <p>λ Ex: 230/360 nm λ Em: 425 nm</p>	Obilježavanje u vodi/metanolu, pH 5.0, 80 °C, 15–60min. Sadrži jedan negativan naboj što ju čini prikladnom i za CGE separacije i separacije MALDI-TOF-MS-om u pozitivnom i negativnom načinu rada. Osjetljivija detekcija u odnosu na 2-AB. ⁴
2-aminobenzamid	2-AB	 <p>λ Ex: 330 nm λ Em: 420 nm</p>	Obilježavanje u smjesi DMSO/octena kiselina (7:3), 60 °C, 120 min. Neutralna je i s obzirom na nedostatak naboja priklana je za kromatografske analize. Omogućuje točno kvantitativno mjerenje relativnih količina glikana zahvaljujući stehiometrijskom odnosu glikan: boja 1:1. S obzirom da je u širokoj upotrebi, razvijena je online baza podataka sa standardnim vremenima eluiranja 2-AB obilježenih glikana separiranih HILIC-UHPLC-FLR. ¹⁷
2-aminopiridin	2-AP (PA)	 <p>λ Ex: 310/320 nm λ Em: 380/400 nm</p>	Obilježavanje u octenoj kiselini, 90 °C, 95 min. Primjenjuje se kod pripreme glikana za UHPLC analizu. Također i za nju postoji online baza podataka standardnih vremena eluiranja za analizu glikanskih struktura. Nedostatak ove boje je nedostatna čistoća komercijalno dostupne PA te ju je nužno rekristalizirati prije upotrebe. ¹³

8-aminopiren-1,3,6-trisulfonat	APTS	 <p>λ Ex: 488 nm λ Em: 520 nm</p>	Obilježavanje u limunskoj kiselini s 2-metilpiridin boranom ili 37 C, 16 h. Sadrži tri negativna naboja što ju čini odličnim izborom za separaciju glikana kapilarnom gel elektroforezom (CGE). ²³
4-amino-N-[2-(dietilamino)etil] benzamide (prokainamid)	ProA	 <p>λ Ex: 250 nm λ Em: 428 nm</p>	Obilježavanje može u istim uvjetima kao 2-AB, koristi se za UHPLC analize (veća osjetljivost). S obzirom da sadrži u strukturi tercijarni amin s visokim afinitetom za protone, odličan je izbor i za ESI-MS u pozitivnom načinu rada. ^{4, 24}

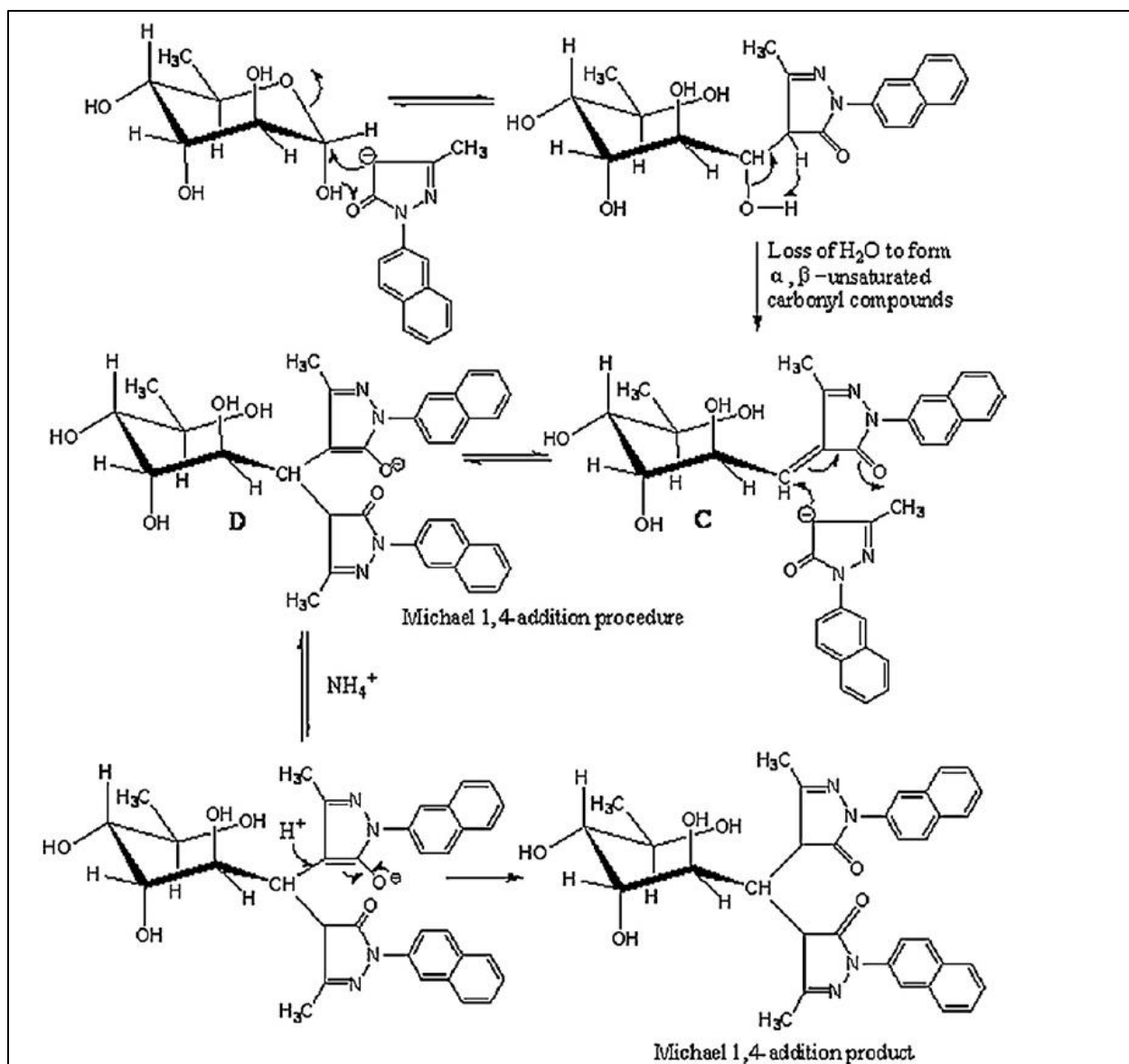
Redukcijska sredstva se najčešće dodaju izravno u reakcijsku smjesu s glikanima i željenom bojom. Odabir prikladnog reducensa je kritičan korak kako bi se selektivno reducirao intermedijarni imin (Schiffova baza) te izbjegla neželjena redukcija ostalih skupina (na glikanu i boji) podložnih redukciji. Do danas je razvijen velik broj reducensa za korištenje u reduktivnoj aminaciji, iako mnogi od njih ispoljavaju neželjena svojstva u smislu selektivnosti, sekundarnih reakcija, reakcijskih uvjeta te opasnosti za sigurnost i toksičnost. Donedavno je najprimjenjiviji reducens u reduktivnoj aminaciji bio natrijev cijanoborohidrid (NaBH_3CN). Odlikuje se visokom selektivnošću, dobrom topljivošću u mnogim otapalima i stabilnošću u kiselom mediju (do pH 2). Unatoč tome, NaBH_3CN nije preporučen za visokoprotodne analize zbog stvaranja visokotoksičnih nusprodukata, cijanovodika (HCN) i natrijevog cijanida (NaCN). U visokoprotodnim analizama, NaBH_3CN je danas skoro u potpunosti zamijenjen 2-metilpiridin boran kompleksom (2-pikolin boran), struktura na slici 8. 2-metilpiridin boran ispoljava sličnu selektivnost kao i NaBH_3CN , a prednost je što se može primijeniti i u vodenom i ne-vodenom mediju.^{25, 13, 3}



Slika 8. Struktura 2-metilpiridin borana, netoksičnog i povoljnog reducensa za korištenje u reakcijama obilježavanja glikana u visokoprotodnim metodama analize.²⁵

2.3.2 MICHAELOVA ADICIJA

Obilježavanje reducirajućeg kraja glikana moguće je provesti i u alkalnim (najčešće amonijev hidroksid) uvjetima Michaelovom adicijom, čime se smanjuje rizik gubitka sijalinskih kiselina u kiselom mediju, svojstvenom reakcijama reduktivne aminacije. Michaelova reakcija je reakcija nukleofilne adicije karbaniona na α , β -nezasićeni karbonilni spoj, čime dolazi do stvaranja C-C veze u blagim reakcijskim uvjetima. Reagensi koji se koriste za obilježavanje su 1-fenil-3-metil-5-pirazolon (PMP), njegov metoksi analog 1-(p-metoksi)-fenil-3-metil-5-pirazolon te 1-(2-naftil)-3-metil-5-pirazolon (NMP), UV-apsorbirajuće boje. Reakcija se odvija u dva koraka. U prvom koraku, jedna molekula boje (donor) veže se na reducirajući kraj glikana, prilikom čega dolazi do otpuštanja molekule vode i stvaranja α , β -nezasićenog karbonila. U drugom koraku dolazi do stvaranja Michaelovog 1,4-adicijskog produkta konjugacijom α , β -nezasićenog karbonila s drugom molekulom boje. Mehanizam reakcije Michaelove adicije 1-(2-naftil)-3-metil-5-pirazolona prikazan je na slici *slici 9*.^{13, 26, 27}



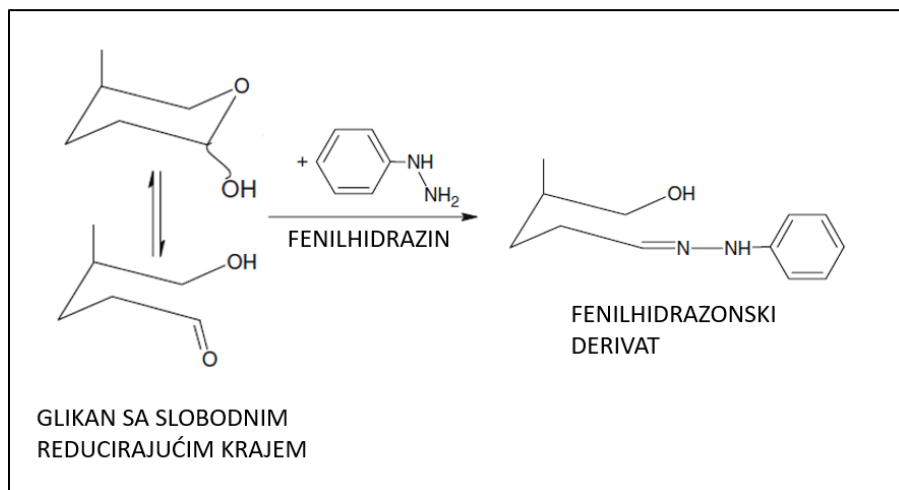
Slika 9. Mehanizam reakcije Michaelove adicije dvije molekule 1-(2-naftil)-3-metil-5-pirazolona na glikan sa slobodnim reducirajućim krajem.²⁶

Nedostatak obilježavanja Michaelovom adicijom je stehiometrijski odnos između molekule glikana i boje, 1:2, stoga kromatografska svojstva ovako derivatiziranih glikana više ovise o samoj boji, što nepovoljno utječe na razdvajanje izomera.

2.3.3 OBILJEŽAVANJE HIDRAZIDOM

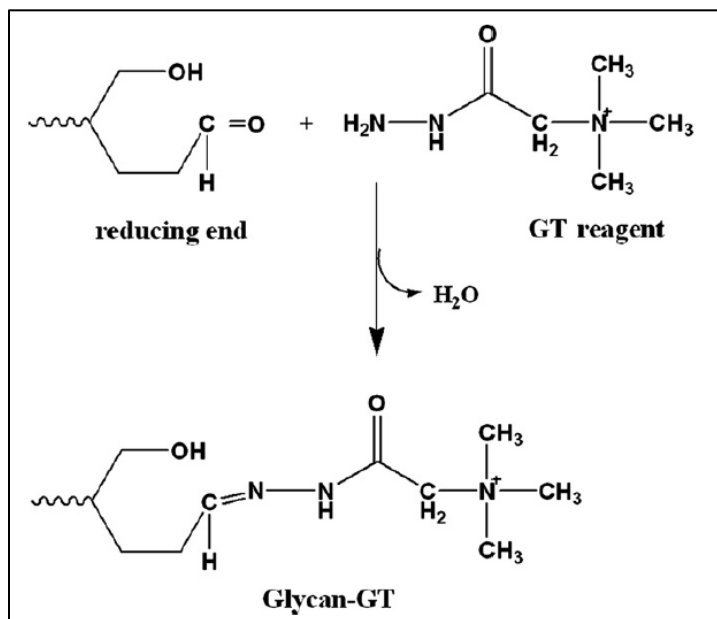
Obilježavanje slobodnog reducirajućeg kraja N-glikana hidrazidom ne koristi se samo kod separacije i detekcije kromatografskim tehnikama i masenom spektrofotometrijom, već i kod ispitivanja bioloških interakcija. Od derivata hidrazida najčešće se koristi fenilhidrazin

zbog jednostavnosti reakcije (ne dolazi do stvaranja viška soli pa nije potrebno pročišćavanje), visoke osjetljivosti i kvantitativnog prinosa dobivenih derivata, fenilhidrazona glikana. Reakcija fenilhidrazina sa slobodnim glikanima prikazan je na *slici 10*.²⁸



Slika 10. Reakcija obilježavanja slobodnog glikana fenilhidrazinom.

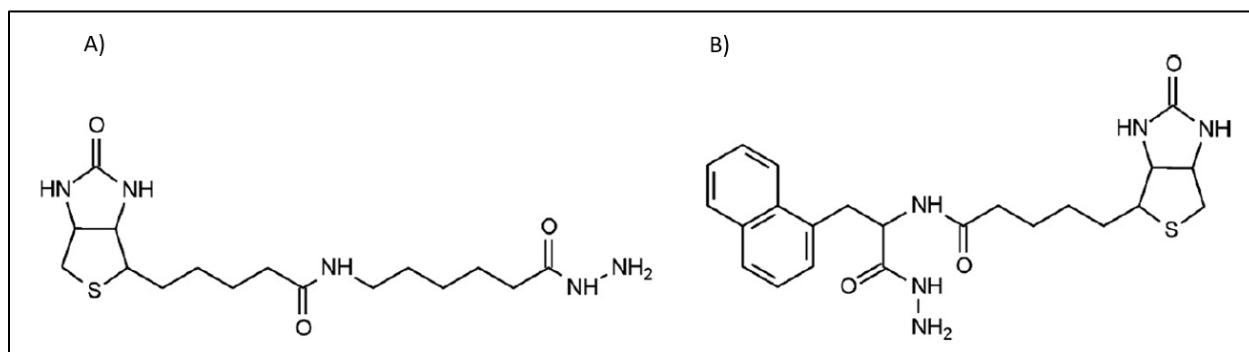
Od ostalih derivata hidrazida koristi se i Girardov T reagens (karboksimetil-trimetilamonijev hidrazid). S obzirom da glikani derivatizirani pomoću ovog reagensa dobivaju trajni pozitivni naboj, tako obilježeni glikani povoljni su za separacije i detekcije masenom spektrofotometrijom (MALDI-TOF-MS), *slika 11*.²⁸



Slika 11. Obilježavanje reducirajućeg kraja glikana Girardovim T reagensom.

Kod ispitivanja biomolekularnih interakcija glikana za obilježavanje se koriste derivati hidrazina i biotina. Tako obilježeni glikani imobiliziraju se na nosače sa streptavidinom te

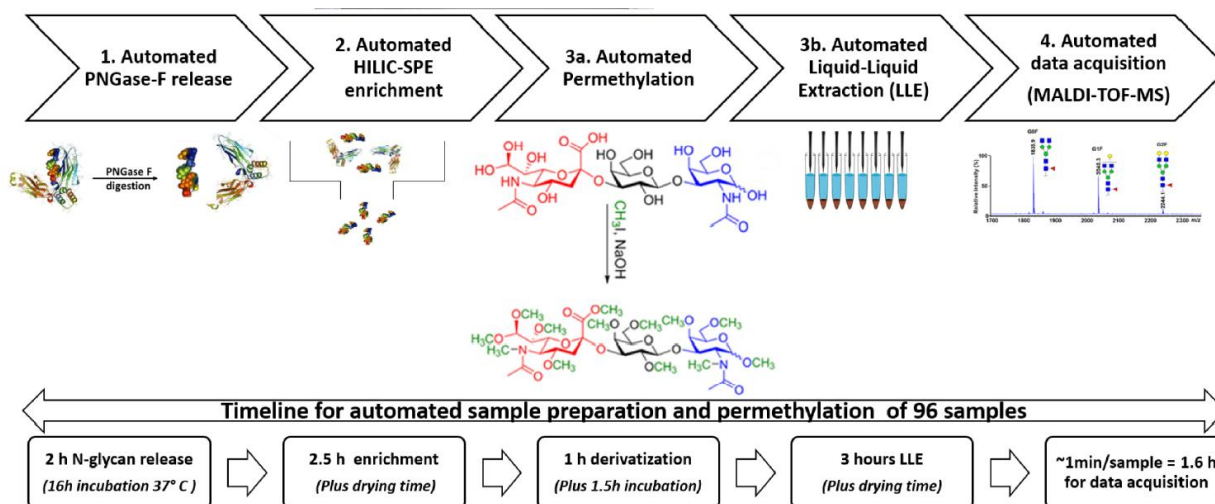
se koriste kod tehnike lektinskih mikročipova. Od biotin-hidrazinskih derivata najčešće se primjenjuju biotini-L-3-(2-naftil)-alanin hidrazid (BNAH) i 6-(biotinil)-aminokaproil hidrazid (BACH), obje molekule sadrže i UV-apsorbirajuću i fluorescirajuću skupinu, *slika 12*.^{30,31}



Slika 12. Struktura 6-(biotinil)-aminokaproil hidrazida, BACH (A) i biotini-L-3-(2-naftil)-alanin hidrazida, BNAH (B).³¹

2.3.4 PERMETILACIJA

Za razliku od prethodno opisanih derivatizacijskih tehnika kod kojih se derivatizacija glikana provodi isključivo na reducirajućem kraju šećera, kod permetilacije dolazi do metiliranja svih slobodnih hidroksilnih, amino i karboksilnih skupina, čime se dobivaju izuzetno hidrofobni derivati šećera. Ovakva derivatizacija se koristi za stabilizaciju sijalinskih kiselina na glikanima te poboljšava ionizaciju kod istovremene analize neutralnih i kiselih glikana u pozitivnom ionskom načinu rada MALDI-MS-a. Za potrebe visokoprotičnih analiza razvijen je set za brzu i automatiziranu permetilaciju i separaciju MALDI-TOF-MS-om, *slika 13*. Za metilaciju se u ovom slučaju koristi metil jodid (CH_3I) u dimetil-sulfoksidu (DMSO).^{13, 4, 32}



Slika 13. Shema automatizirane pripreme uzoraka N-glikana za MALDI-TOF-MS (TOF= analizator vremena preleta elektrona) permetilacijom slobodnih N-glikana.³²

2.4 PROČIŠĆAVANJE OTPUŠTENIH I DERIVATIZIRANIH N-GLIKANA

S obzirom na zaostalu količinu proteina i soli u reakcijskoj smjesi i da se većina reagensa za derivatizaciju dodaje glikanima u suvišku, obilježene glikane je potrebno pročistiti prije separacije i detekcije. U visokoprotlačnim analizama najviše se koriste ekstrakcije na čvrstu fazu (solid phase extraction, SPE), no može se primijeniti još i filtracija na gelu, precipitacija i ekstrakcija tekućina s tekućinama.¹³

Za pročišćavanje glikana filtracijom na gelu koristi se komercijalno dostupan „Bio-gel“³³ ili „Sephadex“³⁴ smole. Pročišćavanje se zasniva na razdvajanju molekula prema njihovoj veličini. Moguće je razdvojiti obilježene glikane od soli, ostatka reagensa i nativnih proteina, no ne i zaostalih peptida s obzirom da su slične veličine.¹¹ Precipitacija se koristi rijetko, a precipitacija u acetonu omogućuje otklanjanje zaostalih proteina iz smjese.³⁵ Pročišćavanje ekstrakcijom tekućina s tekućinama je metoda izbora nakon Michaelove adicije (kloroform - voda)³⁶ i permetilacije (također kloroform - voda),³⁷ iako je kod permetilacije često potreban dodatan korak ekstrakcije na čvrstu fazu (reverzna faza C18, oktadecil/silika).³⁸

Daleko najčešće korištene metode su razne ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE), modificirane na način koji omogućuje brzu i efikasnu primjenu u visokoprotlačnim analizama nakon reduktivne aminacije ili obilježavanja hidrazidom. Ekstrakcije na čvrstu fazu prema vrsti stacionarne faze dijelimo na tekućinsku kromatografiju temeljenu na hidrofilnim interakcijama (HILIC-SPE), kromatografiju obrnutim fazama (RP-SPE), kromatografiju poroznim grafitnim ugljikom (PGC-SPE) te kromatografiju izmjene aniona (AEX-SPE).¹³

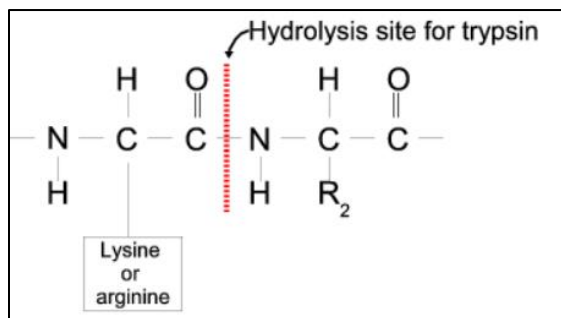
S obzirom da su nativni glikani hidrofilne molekule, tijekom derivatizacije npr. 2-aminobenzamidom (2-AB) uvodimo im hidrofobna svojstva, što omogućuje razdvajanje kromatografijom obrnute faze. Stacionarna faza je najčešće C18 (trifunkcionalna oktadecil silika) koja čvrstim hidrofobnim interakcijama veže nepolarne molekule. Kromatografija na poroznom grafitnom ugljiku (PGC) se doduše najviše primjenjuje kod pročišćavanja nederivatiziranih glikana, no optimizacijom metode postiže se i visoka specifičnost za obilježene glikane. Mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, a veliki nedostatak ove metode je cijena poroznog grafitnog ugljika. Kromatografijom anionske izmjene pročišćavaju se glikani obilježeni 2-aminopiridinom ili 2-aminobenzamidom, a omogućuje razdvajanje neutralnih od sijaliniziranih glikana.^{13,11,4}

Kod ekstrakcije na čvrstu fazu pomoću tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (HILIC-SPE) koriste se razni adsorbensi. Hidrofilniji obilježeni glikani se zadržavaju na stacionarnoj fazi dok se višak nepolarnijeg slobodnog sredstva za derivatiziranje ne veže. HILIC-SPE pločice je najčešće potrebno prekondicionirati kako bi se aktivirale polarne skupine, zatim se nanose uzorci koji se ispiru od nevezanih

nepolarnih reagensa te se na poslijetku glikani eluiraju polarnim otapalom. Glikani se najčešće eluiraju vodom što je još jedna prednost ovih metoda, naime u vodenom mediju ne dolazi do hidrolize sijalinskih kiselina kao što se događa u kiselom mediju. Nedostatak metode je što se glikani prvo moraju otopiti u visokim koncentracijama organskog otapala (npr. 100% acetonitril), što može dovesti do njihove precipitacije.⁴ Različite stacionarne faze dolaze u obliku pločica s 96 jažica ili u obliku filtera za nastavke za pipete, npr. „cotton-HILIC-SPE“, gdje se komadići vate nalaze se u vrhovima nastavaka za pipete te omogućuju uklanjanje soli, većine neglikoziliranih peptida i deterdženata kao što je SDS.³⁹ Često korišteni adsorbensi su: mikrokristalinična celuloza (MCC),⁴⁰ poliamidna smola (DPA-6S, Merck), polipropilen (GHP, Pall),⁴ vodomočivi politetrafluoroetilen (wwPTFE, Pall), hidrofilni polietersulfon (Supor, Pall) te drugi polimeri.

2.5 ANALIZA GLIKOPEPTIDA

Glikopeptidi se analiziraju u svrhu određivanja specifičnosti mjesta glikozilacije na proteinu te se analiziraju isključivo masenom spektroskopijom. Za specifično proteolitičko cijepanje izoliranog imunoglobulina G najčešće se koristi tripsin. Tripsin je serinska proteaza koja cijepa glikoprotein na karboksilnoj strani lizina (Lys) ili arginina (Arg), što rezultira cijepanjem IgG-a na peptide i glikopeptide (*slika 14*). Inkubacija glikoproteina s tripsinom se odvija na 37 °C. Po potrebi, da se pospješi cijepanje, može se dodati denaturirajući reagens (npr. gvanidin hidroklorid, urea, acetonitril) ili reducens (ditiotreitol- DTT ili β-merkaptotanol) te alkilirajuće sredstvo (jodoacetamid, IAA) kako bi se stabilizirale reducirane sulfhidrilne skupine.^{11,4}



slika 14. Mjesto proteolitičkog cijepanja glikoproteina pomoću tripsinom. Slika skinuta s http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/BE_Proteolytic_cleavage.html.

S obzirom da se u reakcijskoj smjesi nakon tripsinizacije uz glikopeptide, soli i ostatke reagensa, nalaze još i peptidi (koji imaju bolja ionizacijska svojstva od glikopeptida te ometaju MS signal), glikopeptidi se moraju ukoncentrirati i pročititi. Za to se najčešće koriste RP-SPE (ekstrakcija na čvrstu fazu kromatografijom obrnutih faza) s C18 adsorbensom te HILIC-SPE (ekstrakcija na čvrstu fazu pomoću tekućinske

kromatografije temeljene na hidrofiličnim interakcijama) s raznim adsorbensima (maltozna zrnca, magnetne nanočestice, nastavci za pipete s vatom).⁴

2.6 KOMERCIJALNI SETOVI ZA BRZU PRIPREMU UZORAKA

Najčešće korišteni protokoli za pripremu derivatiziranih uzoraka N-glikana imunoglobulina G za separaciju UHPLC i LC-ESI-MS tehnikama traju do 3 radna dana (za 96 uzoraka). Najviše vremena odlazi na inkubacije (npr. deglikozilacija PNGazom F na 37 °C traje 18 sati) koje predstavljaju prazni hod unutar analize. Svaki set od 96 uzoraka iziskuje posebnu pripremu svježih reagensa, a kod analiza velikog broja uzoraka takve pripreme mogu trajati mjesecima pa često dolazi do korištenja kemikalija različitih proizvodnih serija pa čak i različitih proizvođača, korištenja različitog laboratorijskog posuđa te sudjelovanja većeg broja analitičara u analizama. Sve te vanjske varijable unose svojstvene varijacije u metode analize. Kako bi se takve varijacije smanjile razvijeni su posebni komercijalni setovi sa svim potrebnim reagensima za brzu deglikozilaciju, obilježavanje i pročišćavanje uzoraka N-glikana.

2.6.1 GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit

Tvrtka Waters (Milford MA, USA) nudi set reagensa za rapidnu deglikozilaciju, bojanje i pročišćavanje N-glikana pod nazivom „GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit“. Set se sastoji od deterdženta, pufera i enzima potrebnih za denaturaciju i deglikozilaciju, boje i organskog otapala za obilježavanje slobodnih N-glikana, pločice s 96 jažica za HILIC-SPE pročišćavanje obilježenih glikana te otopina za ispiranje i eluiranje pročišćenih glikana (slika 15).⁴¹

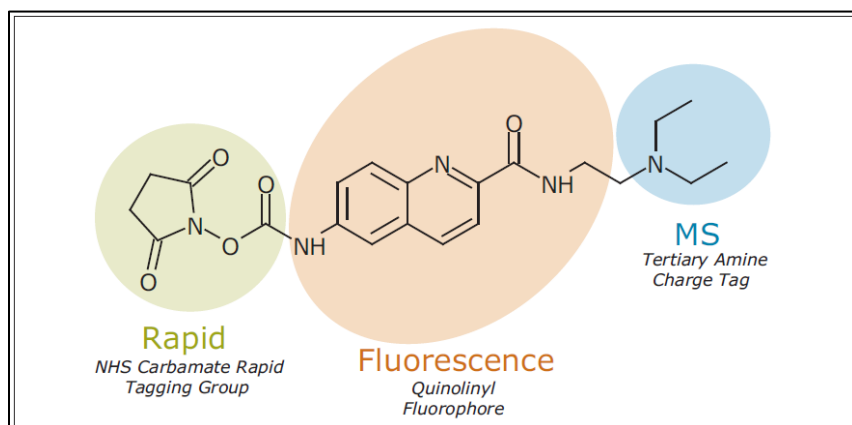


Slika 15. GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit (Waters Corp., Milford MA, USA) – kompletni set kemikalija i potrošnog materijala za brzu pripremu obilježenih N-glikana za UHPLC ili LC-ESI-MS analizu.⁴¹

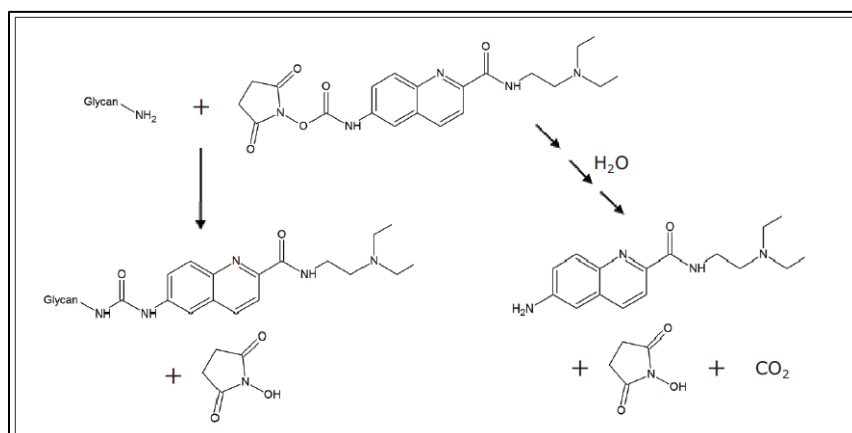
Za brzu denaturaciju uzorci IgG-a se najprije inkubiraju 3 minute na 99 °C s *RapiGest SF* deterdžentom i *Rapid PNGase F* puferom. Nakon 3 minute hlađenja slijedi deglikozilacija

pomoću *GlycoWorks Rapid™ PNGase F*, rekombinantno razvijenog enzima koji u nekoliko minuta kvantitativno deglikozilira N-vezane glikane s proteina. Reakcija traje 5 minuta na 55 °C. U tih 5 minuta inkubacije i 3 minute hlađenja, *RapiFluor-MS* boja (slika 16) se otopi u anhidričnom dimetilformamidu (DMF). Inkubacija uzoraka s bojom odvija se 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon bojanja, uzorci su odmah spremni za HILIC-SPE pročišćavanje na pločici od 96 jažica s adsorbiranom stacionarnom fazom, *GlycoWorks μElution Plate*. Uzorci se ispiru u visokom postotku organskog otapala (acetonitril uz dodatak vode i mravlje kiseline), a eluiraju u amonijevom acetatu uz dodatak 5% acetonitrila. Ovako pročišćeni uzorci mogu se odmah separirati UHPLC ili LC-ESI-MS tehnikom.^{41,42}

A)



B)



Slika 16. Prikaz strukture RapiFluor-MS boje (A). N-hidroksi-sukcinimidna karbamatna skupina odlikuje se izuzetno brzom reakcijskom kinetikom.⁴¹ Mehanizam reakcije (B): prije doticaja s uzorcima, boja se nalazi u anhidričnom mediju (DMF), nakon kontakta s vodenim medijem u kojem se nalaze uzorci, N-hidroksi-sukcinimidna skupina brzo i spontano hidrolizira, što

omogućuje elektrofilnoj karbamatnoj skupini brzu reakciju s glikozilaminom na slobodnim N-glikanima. Kinolinski kromofor omogućuje visoku osjetljivost fluorescencijske detekcije, a dodatak tercijarnog amina na boju uvodi naboj na obilježene glikane što uvelike pospješuje osjetljivost ESI-MS detekcije u pozitivnom načinu rada (+ESI).⁴²

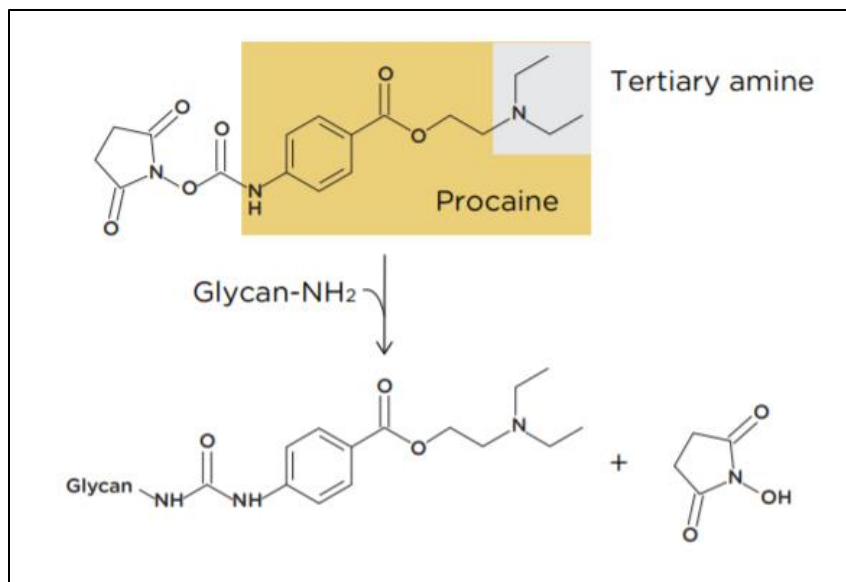
Ovako opisana priprema uzoraka traje do 2 sata, što ju definitivno čini metodom izbora u odnosu na standardne protokole od 2 dana. Nedostatak ove metode je naravno cijena. Usporedbom ove tehnike u visokoprotočnom načinu rada s klasičnom tehnikom obilježavanja 2-aminobenzamidom i prokainamidom te LC-ESI-MS separacijom i detekcijom (HILIC-UHPLC-FLR-ESI-MS), pokazano je kako 2-AB pokazuje najslabiju osjetljivost i FLR i MS detekcijom, ProA se pokazao kao najosjetljivija metoda za FLR detekciju, dok se RapiFluor-MS pokazao kao najosjetljivija metoda za MS detekciju. Usporedbom validacija metode, ponovljivost je najbolja za 2-AB i ProA obilježene glikane, dok RF-MS boja pokazuje varijabilnost u obilježavanju disijaliniziranih struktura.⁴³

2.6.2 Agilent AvanceBio Gly-x N-Glycan Prep with InstantPC Kit

Kao u prethodnom slučaju, tvrtka Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) također nudi set za brzu deglikozilaciju, bojanje i pročišćavanje obilježenih N-glikana. Set se sastoji od tri modula. Prvi je modul za deglikozilaciju u kojem se nalazi pločica za deglikozilaciju s 96 jažica „Gly-X Deglycosylation Plate“, enzim „Gly-X N-Glycanase“ i pufer za digestiju „Gly-X Digestion Buffer“ te deterdžent „Gly-X Denaturant“. Denaturacija IgG-a traje 3 minute na 90°C, nakon čega slijedi hlađenje od 2 minute i deglikozilacija od 5 minuta na 50°C.⁴⁴

Modul za obilježavanje sastoji se od liofilizirane boje „InstantPC Dye“ (struktura na slici 17) i organskog otapala za boju „InstantPC Dye Solvent“. Bojanje se također odvija pri temperaturi od 50°C i traje samo 1 minutu.

Modul za pročišćavanje sastoji se od dvije pločice s 96 jažica, jedna za HILIC-SPE, „Gly-X Cleanup Plate A“, druga za skupljanje eluiranih uzoraka „Gly-X Collection Plate“, folija i kapica za zatvaranje i skladištenje pločica te pufera za eluiranje uzoraka „Gly-X InstantPC Eluent“. Uzorci se euliraju u amonijevom formijatu s 10% acetonitrila. Ovisno o volumenu uzoraka potrebnom za UHPLC ili LC-MS analizu, uzorci se mogu još dodatno razrijediti u smjesi ACN/DMF (acetonitril/ dimetilformamid) 1:1.⁴⁴



Slika 17. InstantPC boja je aktivirana forma prokaina koja se veže na slobodne glikozilamine sličnim mehanizmom kao i RapiFluor-MS boja. Dolazi do stvaranja čvrste veze (urea) između glikana i kromofora (prokaina) što poboljšava fluorescentnu detekciju kod UHPLC-FLR separacije te također sadrži terciarni amin koji pospješuje osjetljivost LC-MS signala.⁴⁵

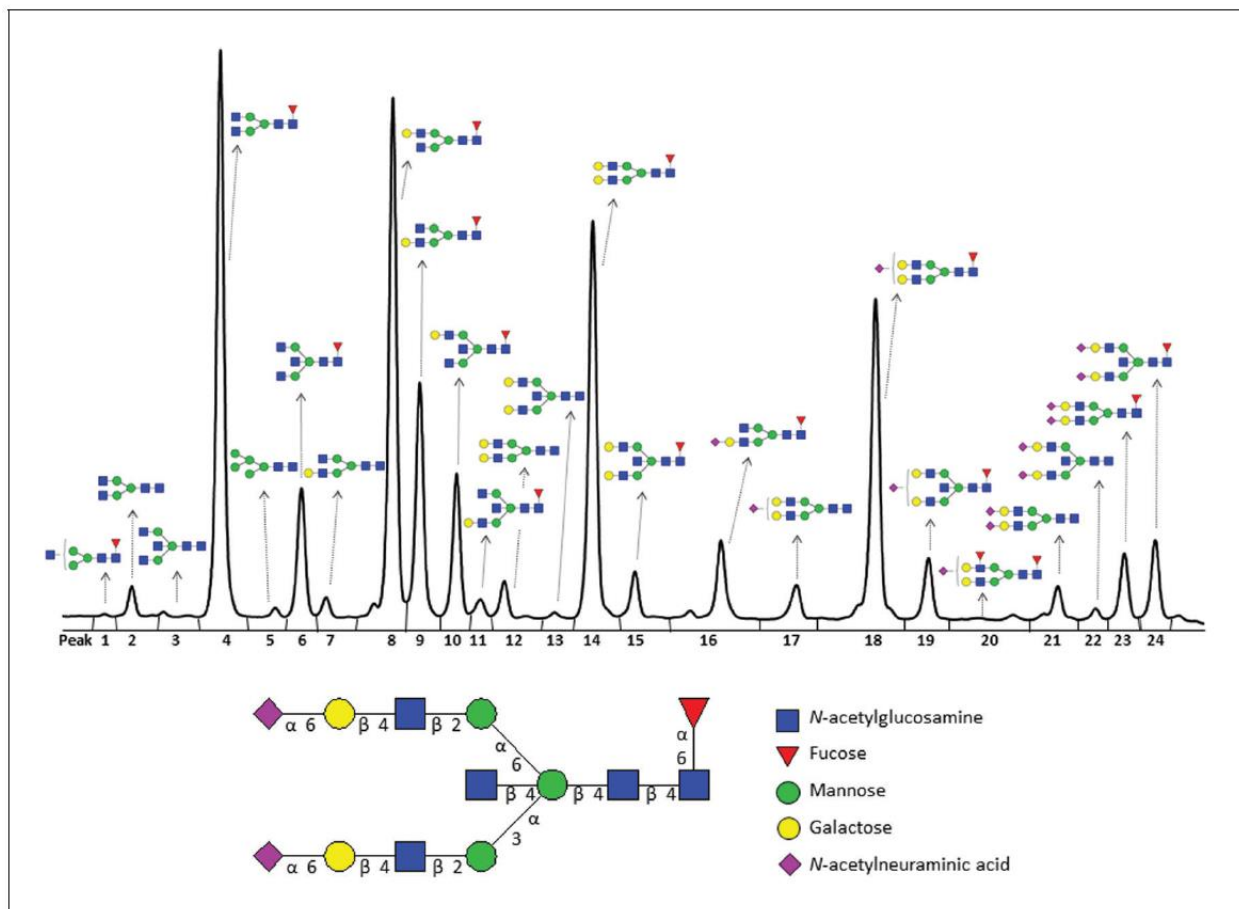
2.7 SEPARACIJA I DETEKCIJA

Da bi tehnike separacije koje se rutinski koriste u visokoprotocnim studijama iz glikomike bile isplative moraju moći analizirati velik broj uzoraka u što kraćem vremenu, a da su pritom visoke osjetljivosti, reproducibilnosti i robusnosti. Najraširenija tehnika je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofилnim interakcijama s fluorescencijskom detekcijom (HILIC-UHPLC-FLR), a slijede ju kapilarna gel elektroforeza s laserom potpomognutom detekcijom (CGE-LIF), tekućinska kromatografija spregnuta s elektronsprej masenom spektroskopijom (LC-ESI-MS) te matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija s masenom spektroskopijom (MALDI-MS).⁴

2.7.1 HILIC-UHPLC-FLR

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti je najčešće korištena robusna analitička metoda separacije N-vezanih glikana u visokoj rezoluciji. Jednostavna je za korištenje, UPLC strojevi i potrošni materijal su relativno jeftini u usporedbi s drugim metodama, odlikuje se visokom reproducibilnošću i robusnom kvantifikacijom glikana. Omogućuje odvajanje izomera glikana i istovremenu analizu neutralnih i nabijenih glikana. HILIC je varijacija kromatografije na obrnutoj fazi, kod koje je stacionarna faza

polarna, a mobilna faza se sastoji od visokog postotka organskog otapala (najčešće acetonitril) i malog postotka vodenog otapala (npr. amonijev formijat). Voda iz mobilne faze stvara vodeni sloj adsorbiran na površinu stacionarne faze koji čvrsto veže polarne i hidrofilne molekule, stoga se najprije eluiraju nepolarne i manje molekule, a zatim polarne.⁴ Reprezentativni kromatogram 2-AB-obilježenih N-glikana IgG-a prikazan je na slici 18.

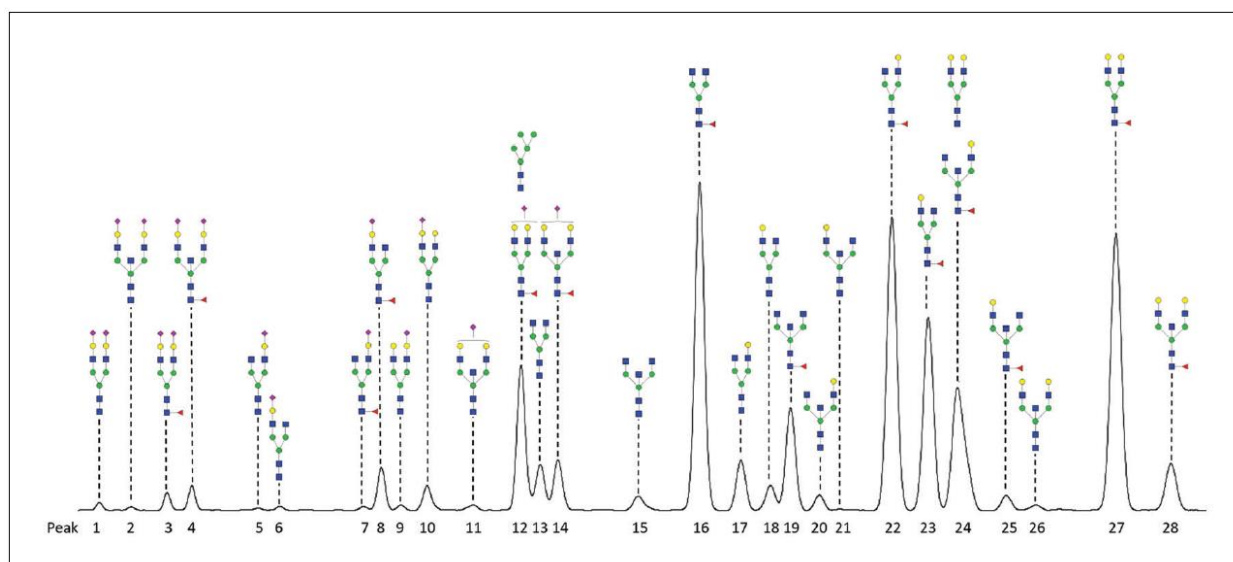


Slika 18. Reprezentativni kromatogram 2-aminobenzamidom (2-AB) obilježenih N-glikana imunoglobulina G, razdvojenih u 24 N-glikanska pika tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti temeljenoj na hidrofilnim interakcijama s fluorescencijskom detekcijom (HILIC-UHPLC-FLR).²³

2.7.2 CGE-LIF

Kapilarna gel elektroforeza je analitička separacijska metoda kod koje se nabijene molekule razdvajaju prema veličini u kapilari napunjenoj poroznim gelom. Obično se analiziraju negativno nabijeni glikani obilježeni APTS bojom na DNA sekvenatoru s laserski induciranom fluorescentnom detekcijom. Koristeći višestruki CGE-LIF sustav (multiplexed, xCGE-LIF) s više kapilara, moguće je istovremeno analizirati više uzoraka.

Priprema uzoraka N-glikana IgG-a za analizu kapilarnom gel elektroforezom, usporedna je pripremi uzoraka za analizu HILIC-UHPLC-om (ortogonalne metode). Obje pripreme za standardni set od 96 uzoraka traju 3 dana; prvi dan izolacija IgG-a, drugi dan deglikozilacija i treći dan bojanje i pročišćavanje, no s obzirom da se kapilarnom gel elektroforezom može analizirati više uzoraka odjednom, xCGE-LIF analiza uzoraka može biti gotova u jednom danu, dok HILIC-UHPLC-FLR analiza traje i do 3 dana. Teoretski je moguće paralelno analizirati uzorke na 96 kapilara.^{23, 46} Također, kao i UHPLC, kapilarna gel elektroforeza je osjetljiva i robusna metoda, uspješno odvaja izomere glikana i pouzdano kvantificira glikane sa sijalinskim kiselinama u strukturu. Unatoč svom potencijalu, rijetko se upotrebljava za analizu glikana što se može pripisati nedostatku glikanskih standarda, poteškoćama u anotaciji pikova (ne može se izravno spregnuti s masenom spektrofotometrijom što otežava identifikaciju struktura) i nedovoljno razvijenoj online bazi podataka sa strukturama N-glikana.⁴ Reprezentativni elektroferogram APTS-obilježenih N-glikana IgG-a prikazan je na slici 19.



Slika 19. Reprezentativni elektroferogram APTS-om obilježenih N-glikana imunoglobulina G, odvojenih višestrukom kapilarnom gel elektroforezom s laserom induciranom fluorescencijom (xCGE-LIF) u 28 N-glikanskih pikova. Za razliku od HILIC-UHPLC dobivenih kromatograma, na elektroferogramu se manje i polarnije strukture (glikani sa sijalinskim kiselinama) nalaze na početku elektroferograma jer putuju brže kroz polimer kapilare.²³

2.7.3. MASENA SPEKTROFOTOMETRIJA

Masena spektrofotometrija omogućuje detaljno objašnjavanje strukture N-glikana kada se koristi u tandemskom načinu rada (MS/MS) te razlučuje glikanske strukture Fc fragmenta po podrazredima IgG-a (što nije moguće kod kromatografske separacije i separacije kapilarnom gel elektroforezom). Glavni izazovi tehnika temeljenih na MS-u su

određivanje glikanske strukture prema izmjerenoj masi u slučaju izobarnih struktura i djelomični ili potpuni gubitak sijalinskih kiselina.

LC-ESI-MS

Metoda LC-ESI-MS se najčešće koristi za analizu glikopeptida Fc fragmenta određenog podrazreda IgG-a, nakon separacije na C8 ili C18 koloni (RP-LC-ESI-MS). Moguća je i analiza slobodnih glikana nakon razdvajanja na koloni s poroznim grafitnim ugljikom (PGC- LC-ESI-MS), što omogućuje i razdvajanje glikanskih izomera. Također je moguća i analizirati permetilirane glikana u pozitivnom načinu rada.^{13,4}

MALDI – MS

Za razliku od ESI-MS tehnika koja mora biti spregnuta s nekom separacijskom tehnikom (najčešće tekućinska kromatografija), MALDI-MS ne zahtjeva dodatnu separaciju. MALDI-TOF-MS (detekcija vremena preleta elektrona) je najčešće korištena tehnika za analizu permetiliranih glikana i glikana derivatiziranih Girardovim T reagensom. Od glikana obilježenih reduktivnom aminacijom, MALDI-MS se najčešće koristi za 2-AA (2-aminobenzoična kiselina) obojane glikane.^{13,11,4}

3. TEHNIKA MIKROČIPOVA

Prethodno navedene metode analize odnose se na obilježavanje i pročišćavanje glikana u svrhu njihove identifikacije i karakterizacije struktura. Analiza tehnikom lektinskih mikročipova se odnosi na obilježavanje glikana i kombiniranu karakterizaciju struktura s analizom biomolekularnih interakcija.¹³ Ova tehnika razvijena je 2005. godine i od tada se radi na njenom unaprjeđivanju.⁴⁷

Prednost upotrebe lektinskih mikročipova u odnosu na tradicionalne metode (LC, MS) jest jednostavnost metode uz visoku razinu osjetljivost. Naime, lektinskim mikročipovima mogu se analizirati i nativni uzorci glikoproteina. S obzirom da često nema potrebe za oslobađanjem glikana i njihovim pročišćavanjem, sama priprema uzorka je brža i jednostavnija. Posljedično, ne dolazi do gubitka količine glikoproteina u inicijalnom uzorku te se tijekom analize oni nalaze u nativnoj konformaciji. Dakle, lektinski mikročipovi prikladni su za analizu diferencijalnih glikomskih profila bioloških uzoraka.

Međutim, ova tehnika nije kvantitativna i ne dopušta potpuno određivanje glikanskih struktura poput MS-a. Umjesto toga, lektinski mikročipovi prikladniji su za komparativne svrhe, na primjer za analizu razlika između glikanskih profila. Trenutna primjena ograničena je na procjenu karakteristika tumora, pretraživanje novih tumorskih biomarkera i karakterizaciju terapijskih glikoproteina (monoklonskih protutijela), a šira primjena ove metode zahtjeva poboljšanje osjetljivosti i robusnosti.⁴⁷

LEKTINI

Lektini su proteini koji vežu ugljikohidrate (carbohydrate-binding proteins, CBP), tj. specifično vežu određene monosaharide i preferiraju određene glikanske strukture (određen oligosaharidni slijed).¹³ Lektini koji se koriste za profiliranje glikana mogu biti prirodnog porijekla ili rekombinantni. Najčešće se koriste biljni lektini koji se još zovu i fitohemaglutinini, a odlikuju se raznolikošću vezne specifičnosti za glikane, dostupnošću i stabilnošću. Nedostatak lektina prirodnog porijekla je inherentna glikozilacija i nedosljednost u aktivnosti zbog razlika koje proizlaze iz postupaka pročišćavanja. Rekombinantni lektini biljnog i životinjskog podrijetla proizvode se pomoću ekspresijskih sustava mikroorganizama rekombinantnom tehnologijom, najčešće u bakterijama i kvascima čiji se ekspresijski sustavi odlikuju jednostavnošću i dobrim prinosom rekombinantnih proteina.⁴⁷

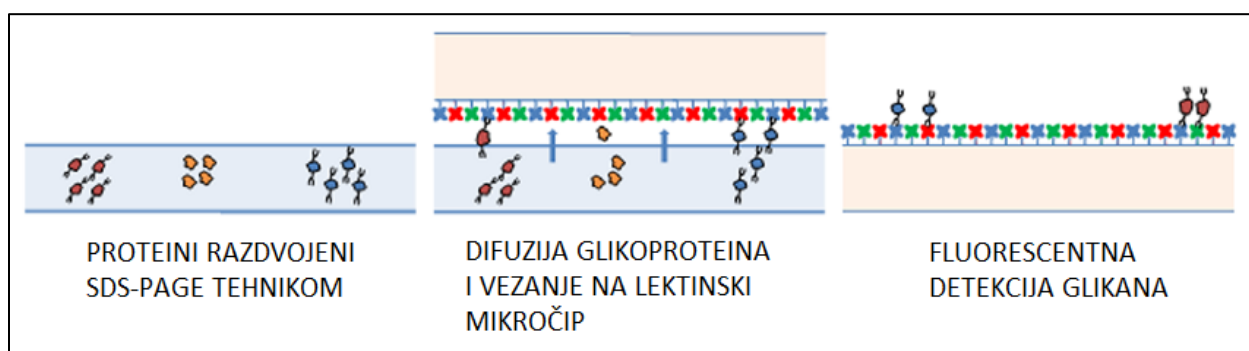
Postoje četiri osnovna principa rada s lektinskim mikročipovima:

A. DIREKTNI TEST

Lektini s poznatom specifičnošću za određene monosaharidne strukture najprije se imobiliziraju na čipove ili kovalentnim vezanjem ili fizičkom adsorpcijom, a zatim se inkubiraju s fluorescentno obilježenim uzorkom, dok se vezanje prati fluorescencijskom

detekcijom. Direktni test primjenjuje se kod analize diferencijalnih glikozilacijskih obrazaca kod zdravih uzoraka i glikoproteina u nekoj bolesti ili za istraživanje učinka različitih uvjeta liječenja. Nedostatak tradicionalnih direktnih testova je pristranost prema najzastupljenijem glikoproteinu u uzorku (uzorci su najčešće biološke tekućine koje sadržavaju smjesu proteina).

Kako bi se smanjila ta pristranost, razvijena je metoda za brzu analizu glikoproteina u biološkim tekućinama. Fluorescentno obilježeni glikoproteini razdvoje se diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) te se difuzijski prenesu na staklene pločice s višestrukim kopijama raznih lektina. Proteini zadrže onu poziciju koju su imali na gelu nakon elektroforeze. Ovom tehnikom moguće je odrediti specifično vezanje lektina za pojedini glikoprotein, neovisno o koncentraciji proteina u uzorku (*slika 20*).⁴⁸



Slika 20. Razdvajanje proteina SDS-PAGE tehnikom prije imobilizacije na nosač s imobiliziranim lektinima.⁴⁸

B. PROTUTIJELO – GLIKOPROTEIN – OBILJEŽENI LEKTIN „SENDVIČ“ TEST

Nitrocelulozna pločica s imobiliziranim protutijelima inkubira se glikoproteinima na koje se zatim vežu obilježeni lektini. Kako bi se spriječilo vezanje lektina na glikane protutijela, nužan je preliminaran korak kemijske derivatizacije glikana protutijela. Ukratko, cis-hidroksilna skupina glikana protutijela oksidira se do aldehida koji zatim reagira s hidrazid maleimidom (4-(4-N-maleimidofenil)butanska kiselina hidrazid hidroklorid, MPBH) te dolazi do stvaranja imina, nakon čega se na maleimid veže dipeptid cistein-glicin koji blokira vezanje lektina. Ovakva metoda je korisna za određivanje varijacija određene glikanske strukture na različitim proteinima.⁴⁹ Kombinacijom ove metode s metodom dvostrukog sendviča protutijela (kojom se određuje količina glikoproteina), može se odrediti stopa promjene glikanskih struktura i odnos između glikana i glikoproteina. Ne koristi se za analizu N-vezanih glikana glikoproteina imunoglobulina G, već se protutijela koriste za analizu drugih glikoproteina⁵⁰

C. LEKTIN – GLIKOPROTEIN – OBILJEŽENO PROTUTIJELO „SENDVIČ“ TEST

Kao i kod prethodne tehnike, protutijela se koriste za analizu drugih glikoproteina. Nitrocelulozom prevučena staklena pločica s imobiliziranim lektinima najprije se inkubira s glikoproteinima te ih selektivno veže, zatim se na glikoproteine vežu direktno ili indirektno obilježena protutijela.⁴⁷

D. OBRNUTI TEST

Glikoproteini se najprije ukoncentriraju pomoću kolone obložene lektinima i zatim se razdvajaju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC). Pročišćeni glikoproteini se zatim imobiliziraju na mikročip i inkubiraju lektinima. Ovaj test omogućuje profiliranje rasprostranjenosti glikana u ljudskom glikoproteomu praćenje individualnih glikozilacijskih promjena na globalnoj razini.⁴⁷

DETEKCIJA

Najčešće metode detekcije kod tehnike lektinskih mikročipova su fluorescencija, kemiluminescencija i radioaktivnost, a samo obilježavanje može biti direktno ili indirektno. Za interakcije glikana s lektinima najčešće se primjenjuje direktno obilježavanje fluorescentnom bojom nakon čega se obojani kompleks ispire i detektira fluorescentnim skenerom. Nedostaci ovog pristupa su zahtjev za velikom koncentracijom glikoproteina, niska osjetljivost i potencijalno remećenje interakcija glikoproteina i lektina. Indirektna metoda obilježavanja najčešće se koristi kod testova u „sendvič“ formatu. Interakcija glikoprotein – lektin detektira se pomoću protutijela ili lektina modificiranog biotinom (BACH, BNAH, strukture objašnjene kod obilježavanja hidrazidom), i odgovarajućom fluorescentnom bojom koja amplificira fluorescencijski signal, npr. HRP-streptavidin (streptavidin konjugiran s peroksidazom hrena) ili cijanin-3 obilježen streptavidin.⁴⁷

Detekcija bez obilježavanja svodi se na mjerenja inherentnih svojstava (dielektričnih i optičkih svojstava te mase) molekula vezanih na lektinske mikročipove. U tu svrhu koriste se rezonancija površinskih plazmona, optička mikroskopija i MALDI-TOF-MS. Optička mikroskopija koristi se za promatranje različitih obrazaca vezanja glikana za lektine, dok rezonancija površinskih plazmona prati interakcije lektina i glikoproteina u stvarnom vremenu putem mjerenja promjena u raspršivanju svjetla, koje se odražava na unutarnjoj strani metala mikročipova. Osjetljiva je metoda i koristi se za procjenu afiniteta, kinetike, specifičnosti vezanja i koncentracije. S obzirom da se primjenom lektinskih čipova ne dobiva detaljna informacija o strukturi glikana, kombinacija s masenom spektrofotometrijom omogućuje precizno mjerenje masa glikoproteina i otkrivanje nespecifičnih vezanja.⁴⁷

4. ZAKLJUČAK

Prethodno opisane metode derivatizacije i tehnike separacije i detekcije koje se koriste u visokoprotočnim analizama N-glikana imunoglobulina G većinom zadovoljavaju zadane uvjete robusnosti i osjetljivosti, no ne i zahtjeve jednostavnosti i brzine. Unatoč tome što postoje alternativne brze i automatizirane metode pripreme uzoraka, njihova aplikacija u visokoprotočnim analizama nije povoljna u pogledu cijena analiza. Također, s obzirom na velik broj različitih metoda derivatizacije i pripreme uzoraka koje je moguće primijeniti u različitim kombinacijama i s obzirom na rast visokoprotočnih istraživanja glikozilacije proteina, nameće se potreba za standardizacijom. Kako bi se ubrzao i pospješio daljnji razvoj glikomike, nužno je uvesti standardne protokole i razviti opširnije online baze podataka.

LITERATURA

1. Varki A. et al. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press (2017).
2. Smoluch M., Silberring J. A brief history of mass spectrometry. *Mass Spectrom. An Appl. Approach* 5–8 (2019).
3. Taylor M., Drickamer K. Introduction to Glycobiology 3rd Edition. Oxford University Press (2011).
4. Trbojević-Akmačić I. et al. High-throughput analysis of immunoglobulin G glycosylation. *Expert Rev. Proteomics* 13, 523–534 (2016).
5. Berg J., Tymoczko J., Stryer L. Biochemistry, 5th edition. Biochemistry, W H Freeman (2002).
6. Neelamegham S., Mahal L. K. Multi-level regulation of cellular glycosylation: from genes to transcript to enzyme to structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 40, 145–152 (2016).
7. Gudelj I. et al. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell. Immunol.* 333, 65–79 (2018).
8. Russell A. et al. Unravelling immunoglobulin G Fc N-glycosylation: A dynamic marker potentiating predictive, preventive and personalised medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 19, (2018).
9. Schroeder H. W., Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–S52 (2010).
10. Plomp R. et al. Hinge-region O-glycosylation of human immunoglobulin G3 (IgG3). *Mol. Cell. Proteomics* 14, 1373–1384 (2015).
11. Huhn C. et al. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 9, 882–913 (2009).
12. Zheng, K. et al. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *MAbs* 3, 568–576 (2011).
13. Ruhaak L. R. et al. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3457–3481 (2010).
14. Rispens T., Vidarsson G. Human IgG Subclasses. *Antib. Fc Link. Adapt. Innate Immun.* 159–177 (2013).
15. Sigma-Aldrich, Inc. (Merck) - Technical Bulletin - Ddr01, Product information 3–6.
16. Nezlin R., Ghetie V. Interactions of Immunoglobulins Outside the Antigen-Combining Site. *Adv. Immunol.* 82, 155–215 (2004).
17. Trbojević-Akmačić I. et al. Comparative Analysis and Validation of Different Steps in Glycomics Studies. *Methods Enzymol.* 586, 37–55 (2017).

18. Schaffert A. et al. Minimal B Cell Extrinsic IgG Glycan Modifications of Pro- and Anti-Inflammatory IgG Preparations in vivo. *Front. Immunol.* 10, 1–16 (2020).
19. Sigma-Aldrich (Merck Corp.) – Product information, Enzymatic Deglycosylation. 1–2 (2014).
20. Makino M. et al. Enzymatic cleavage of glycopeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 535–540 (1966).
21. Kamerling J. P., Gerwig G. J. Strategies for the Structural Analysis of Carbohydrates. *Compr. Glycosci. From Chem. to Syst. Biol.* 2–4, 1–68 (2007).
22. Anumula K. R. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem.* 350, 1–23 (2006).
23. Hanić M. et al. N-Glycan Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gel Electrophoresis with Fluorescent Labeling. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 97, 1–21 (2019).
24. Klapoetke S. et al. The evaluation of a novel approach for the profiling and identification of N-linked glycan with a procainamide tag by HPLC with fluorescent and mass spectrometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 315–324 (2010).
25. Cosenza V. A. et al. Usage of α -picoline borane for the reductive amination of carbohydrates. *Arkivoc* 2011, 182–194 (2011).
26. You J. et al. Detection of carbohydrates using new labeling reagent 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone by capillary zone electrophoresis with absorbance (UV). *Anal. Chim. Acta* 609, 66–75 (2008).
27. Wang C. et al. Simultaneous Release and Labeling of O- and N-Glycans Allowing for Rapid Glycomic Analysis by Online LC-UV-ESI-MS/MS. *J. Proteome Res.* 17, 2345–2357 (2018).
28. Lattova E., Perreault H. Labelling saccharides with phenylhydrazine for electrospray and matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 793, 167–179 (2003).
29. Gil G. C. et al. A relative and absolute quantification of neutral N-linked oligosaccharides using modification with carboxymethyl trimethylammonium hydrazide and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 379, 45–59 (2008).
30. Leteux C. et al. Biotinyl-L-3-(2-naphthyl)-alanine hydrazide derivatives of N-glycans: Versatile solid-phase probes for carbohydrate-recognition studies. *Glycobiology* 8, 227–236 (1998).

31. Harvey D. J. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879, 1196–1225 (2011).
32. Shubhakar A. et al. Automated High-Throughput Permethylaton for Glycosylation Analysis of Biologics Using MALDI-TOF-MS. *Anal. Chem.* 88, 8562–8569 (2016).
33. Nakagawa H. et al. Detection of altered N-glycan profiles in whole serum from rheumatoid arthritis patients. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 853, 133–137 (2007).
34. Higel F. et al. Small scale affinity purification and high sensitivity reversed phase nanoLC-MS N-glycan characterization of mAbs and fusion proteins. *MAbs* 6, 894–903 (2014).
35. Pabst M. et al. Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method. *Anal. Biochem.* 384, 263–273 (2009).
36. Yang X. et al. Development and application of a capillary electrophoretic method for the composition analysis of a typical heteropolysaccharide from *Codonopsis pilosula* NANNF. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1860–1865 (2008).
37. Kang P. et al. Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3421–3428 (2005).
38. Morelle W. et al. Structural characterization of 2-aminobenzamide-derivatized oligosaccharides using a matrix-assisted laser desorption/ionization two-stage time-of-flight tandem mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2075–2084 (2005).
39. Selman M. H. J. et al. Cotton HILIC SPE Microtips for Microscale Purification and Enrichment of Glycans and Glycopeptides. *Anal. Chem.* 83, 2492–2499 (2011).
40. Zhang Q. et al. Purification of derivatized oligosaccharides by solid phase extraction for glycomic analysis. *PLoS One* 9, (2014).
41. Waters Corp. GlycoWorks Rapi Fluor-MS N -Glycan Kit – 96 Sample. Care and use manual. Printed in the U.S.A. (June 2017).
42. Lauber, M. A. et al. Rapid preparation of released N -glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection. *Anal. Chem.* 87, 5401–5409 (2015).
43. Keser T. et al. Comparison of 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS as derivatizing agents for high-throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan analysis. *Front. Chem.* 6, 1–12 (2018).
44. Agilent Technologies. Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with InstantPC Kit, 96-ct (formerly ProZyme). User manual. Printed in the U.S.A. (June 2019).

45. Haxo T. et al. Automated N-Glycan Sample Preparation with an Instant Glycan Labeling Dye for Mass Spectrometry. 94545 (2019).
46. Shubhakar A. et al. High-Throughput Analysis and Automation for Glycomics Studies. *Chromatographia* 78, 321–333 (2015).
47. Dang K. et al. Application of Lectin Microarrays for Biomarker Discovery. *ChemistryOpen* 9, 285–300 (2020).
48. Etxebarria J. et al. Lectin-array blotting: Profiling protein glycosylation in complex mixtures. *ACS Chem. Biol.* 7, 1729–1737 (2012).
49. Chen S. et al. Multiplexed analysis of glycan variation on native proteins captured by antibody microarrays. *Nat. Methods* 4, 437–444 (2007).
50. Yue T. et al. The prevalence and nature of glycan alterations on specific proteins in pancreatic cancer patients revealed using antibody-lectin sandwich arrays. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 1697–1707 (2009).