|  |
| --- |
| **Matija Salopek** |
| **Naslov diplomskog rada** |
| DIPLOMSKI RAD |
| Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu |

Zagreb, 2018.

**SADRŽAJ**

1. Uvod 1

**1.1 Glikokonjugati** 2

**1.2 Uloge glikana** 2

1.2.1 Stanične interakcije 2

1.2.2 Kontrola kvalitete i poluvremena cirkulirajućih i membranskih proteina 3

1.2.3 Modulacija funkcije glikoproteina 3

1.2.4 Glikani u bolesti 3

**1.3 Izvori raznolikosti glikana** 4

1.3.1 Monosaharidi 4

1.3.2 Ključni čimbenici raznolikosti 5

**1.4 N-glikozilacija proteina** 6

1.4.1 Kratki pregled 6

1.4.2 Početna sinteza oligosaharida i aktivnost oligosahariltransferaze 7

1.4.3 Obrada i sazrijevanje glikoproteina 8

1.4.4 Mikroheterogenost glikoproteina 9

**1.5 Posebnosti N-glikozilacije proteina mozga** 10

1.5.1 Uloge N-glikana u živčanom sustavu 10

1.5.2 Selekcija N-acetilneuraminske kiseline 11

**1.6 Strukturna analiza N-glikana** 12

1.6.1 Metode deglikozilacije 13

1.6.2 Derivatizacija 13

1.6.3 Pročišćavanje i ukoncentriravanje 13

1.6.4 Separacijske tehnike 14

1.6.5 Masena spektrometrija 15

**1. Uvod**

Ovo poglavlje daje kratki pregled do sada stečenih znanja i eksperimentalno utvrđenih činjenica, uz poseban osvrt na najznačajnije metode korištene u području glikobiologije. Prije svega, važno je naglasiti što je to glikobiologija i koja je svrha ove relativno mlade moderne znanosti.

Glikobiologija je znanost koja proučava strukturu, biosintezu, biološku ulogu i evoluciju molekula ugljikohidrata (saharida, šećernih lanaca, glikana) i proteine koji služe njihovom prepoznavanju. Proces enzimskog vezanja šećernog lanca za molekulu proteina, proces glikozilacije, danas se smatra jednom od najčešćih post-translacijskih modifikacija proteina (Varki i Kornfeld, 2017). U prilog ovoj tvrdnji ide činjenica da je samo u miša otkriveno više od 2300 različitih N-glikoproteina, sa više od 5000 ukupno dostupnih potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta (Zielinska i sur, 2010). Budući da ugljikohidrati imaju ulogu u svim procesima koji uključuju više od jedne stanice, prema nekim teorijama evolucijska pojava glikoziliranih proteina mogla je biti okidač razvoja višestaničnih organizama, (Lauc i sur, 2014).

Posebna zanimljivost ovog područja proizlazi iz činjenice da relativno mali broj gena (u tipičnom genomu) sudjeluje u sintezi i doradi ovih kompleksnih struktura inherentno važnih za rast, razvoj i normalnu funkciju svih dosad poznatih organizama. Glikani su sekundarni produkti gena, što znači da za razliku od slijeda aminokiselina koje sačinjavaju protein, slijed monosaharidnih jedinica koje sačinjavaju strukturu glikana nije izravno zapisan u genomu. Usto, profil glikozilacije pojedinog organizma, pa čak i svakog tkiva i stanice danog organizma, nije nepromjenjiv već je izrazito dinamičan -- čak i male promjene okolišnih čimbenika dovode do značajnih strukturnih raznolikosti (prema Varki i Kornfeld, 2017).

## **1.1 Glikokonjugati**

O glikanima se obično raspravlja u kontekstu glikokonjugata - makromolekula koje se sastoje od aglikona (protein ili lipid) i glikana koji je za tu strukturu vezan glikozidnom vezom pri čemu glikan može biti mono- ili oligosaharid (Seeberger, 2017).

Glikoprotein je molekula sačinjena od proteinske osnovice za koju je N- ili O-glikozidnom vezom kovalentno vezan šećerni lanac. U slučaju N-glikozilacije enzimskim djelovanjem nastaje kovalentna veza između N-acetilglukozamina (GlcNAc) šećernog lanca i bočnog ogranka aminokiseline asparagina (Asn) unutar konsenzusne peptidne sekvence **Asn-X-Ser/Thr** gdje je *X* bilo koja aminokiselina osim prolina. U slučaju O-vezanih šećerinih lanaca (O-glikani) enzimskim djelovanjem nastaje veza između bočnih ogranaka serina (Ser) ili treonina (Thr) proteinske osnovice i N-acetilgalaktozamina (GalNAc) šećernog lanca (Varki i Kornfeld, 2017).

Od ostalih često proučavanih skupina glikokonjugata važno je spomenuti glikozilfosfatidilinozitolna sidra (GPI-sidra), glikosfingolipide (šećerni lanac vezan za molekulu ceramida) i gangliozide (anionski glikolipid koji sadrži jednu ili više vezanih sijalinskih kiselina) (Varki i Kornfeld, 2017).

## **1.2 Uloge glikana**

Dosad nije poznat nijedan organizam koji može funkcionirati bez glikana. Jednako tako, zna se da je potpuni izostanak sposobnosti glikozilacije embrioletalan (Lauc i sur, 2014). Točnu ulogu pojedine glikanske strukture nemoguće je sa sigurnošću odrediti, stoga što se specifična glikanska struktura u proučavanom organizmu može pojavljivati u različitim razdobljima ili na različitim lokacijama. U širem smislu, uloge glikana uključuju procese specifičnog prepoznavanja i posredovanja bioloških procesa od kojih su neki ključni za razvoj, rast, funkciju i sposobnost preživljavanja danog organizma (Varki, 1993).

### *1.2.1 Stanične interakcije*

Većina međustaničnih interakcija i interakcija stanica sa vanstaničnim matriksom ovisna je o glikanima. O ovome svjedoči pojava glikokaliksa - sloja ugljikohidrata vezanih za membranske glikoproteine, proteoglikane i glikolipide koji obavija vanjsku površinu svake stanice. Glikokaliks je bitno većeg obujma od same stanične membrane. Glikani stanične površine služe kao ligandi proteinima koji ih prepoznaju i vežu, a najbolji primjer ove skupine proteina predstavljaju lektini koje karakterizira visoka specifičnost za određene glikanske strukture. Interakcije lektina i glikana igraju ključnu ulogu u staničnoj adheziji, migraciji, prijenosu signala, prepoznavanju vlastitih tkiva, oplodnji jajne stanice, upalnom odgovoru i imunom odgovoru naspram patogena (Krištić i Lauc, 2017).

### *1.2.2 Kontrola kvalitete i poluvremena cirkulirajućih i membranskih proteina*

Prvi koraci obrade N-glikoproteina glikozidazama endoplazmatskog retikuluma (ER) (uklanjanje 3 glukoze i specifičnih manoza) mogu igrati važnu ulogu u pravilnom smatanju glikoproteina. Postoje naznake da određene strukture N-glikana mogu promicati pravilno smatanje glikoproteina, dok se drugim tipovima struktura nepravilno smotani glikoproteini mogu označavati za degradaciju (Roth i sur, 2010). Različitost terminalnih šećernih ostataka i različit stupanj grananja N-glikana vezanih za glikoprotein može utjecati na vrijeme poluživota cirkulirajućih i membranskih proteina. U slučaju membranskih proteina ova pojava vidljiva je kod citokina, receptora za faktore rasta i receptora za neuroprijenosnike. (Krištić i Lauc, 2017). Izlučivanje proteina iz organizma može biti bitno promijenjeno, što je pokazano u slučaju folikul stimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Smatra se da cirkulirajući proteini kod kojih je sijalinizacija terminalnih šećera obimnija od sulfatacije pokazuju dulje vrijeme poluživota u plazmi (Krištić i Lauc, 2017).

### *1.2.3 Modulacija funkcije glikoproteina*

U literaturi su najbolje opisani slučajevi modulacije efektorske uloge imunoglobulina G (IgG). IgG posjeduje dva evolucijski očuvana mjesta glikozilacije unutar Fc-regije. Pokazano je da modifikacija N-glikozilacije IgG mijenja konformaciju molekule IgG čime se mijenja afinitet vezanja IgG za različite tipove receptora za Fc-regiju (FcR) djelovanjem na koje IgG izvršava svoju efektorsku ulogu. Smatra se da fukozilacija sržne strukture vezane na Asn297 Fc-regije dovodi do smanjenog vezanja IgG na FcγRIIIa što za posljedicu ima smanjenje razine stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC). Također, ovisno o profilu glikozilacije IgG može djelovati kao pro- ili protuupalna molekula. U slučaju O-glikozilacije važno je spomenuti reverzibilnu reakciju kojom se na Ser ili Thr proteina veže GlcNAc (O-GlcNAc). Ova modifikacija je u kompeticiji s reakcijom fosforilacije te se njome može mijenjati razina aktivnosti proteina (Krištić i Lauc, 2017).

### *1.2.4 Glikani u bolesti*

Promjene profila glikozilacije zabilježene su u mnogim fiziološkim stanjima, kao što je primjerice trudnoća (Ruhaak i sur, 2014), ali i u mnogim kroničnim bolestima. Najviše istraživanja postoji na području raka, neurodegenerativnih bolesti, metaboličkih bolesti (dijabetes), upalnih te autoimunih i infektivnih bolesti. Zbog uključenosti glikana u ova stanja smatra se da je opravdana uporaba glikana kao markera tijeka bolesti ili odgovora na terapiju, ili kao markera podložnosti određenim kroničnim bolestima (Krištić i sur, 2017). Također, smatra se da postoji povezanost između plazmatskog profila N-glikozilacije i dobi, dugovječnosti i općeg zdravlja pojedinca (Ruhaak i sur, 2011).

## **1.3 Izvori raznolikosti glikana**

### *1.3.1 Monosaharidi*

Monosaharidi su jednostavni ugljikohidrati (polihidroksialdehidi, polihidroksiketoni) opće formule *Cx(H2O)n* , gdje je *n*  cijeli broj između 3 i 9, koje je nemoguće hidrolizirati u jednostavniji oblik. Ove kiralne molekule (ukupni broj sreteoizomera iznosi 2k, gdje je *k* broj asimetričnih ugljikovih atoma) karakterizira lanac hidroksimetilenskih skupina koji na jednom kraju završava hidroksimetilnom skupinom, a na drugom aldehidnom skupinom (C-1 ugljikov atom) ili α-hidroksi ketonskom skupinom (C-2 ugljikov atom). Prema ovim svojstvima monosaharidi se dijele na u aldoze i ketoze. (Varki i Kornfeld, 2017; Seeberger, 2017). Ukupna konfiguracija molekule može biti D ili L, ovisno o apsolutnoj konfiguraciji asimetričnog C-atoma najudaljenijeg od karbonilne skupine. Većina prirodnih monosaharida kralježnjaka javlja se u D-konfiguraciji, s izuzetkom L-fukoze (Fuc) i iduronske kiseline (IdoA) (Seeberger, 2017). U otopini monosaharidi postoje u ravnoteži cikličkog i acikličkog oblika. Formiranjem prstena, monosaharidi dobivaju dodatni asimetrični centar koji se naziva anomerni centar. Prema konfiguraciji anomernog centra mogu se prepoznati α ili β anomeri. (Seeberger, 2017).

Monosaharidi se povezuju glikozidnom vezom (reakcija poluacetala s alkoholnom skupinom), koja nastaje između anomernog C-atoma jednog od monosaharida i neke od hidroksilnih skupina drugog monosaharida, budući da bilo koja slobodna -OH skupina monosaharida može sudjelovati u nastanku veze s anomernim centrom drugog monosaharida znači da jedan monosaharid može biti povezan s više drugih monosaharida što daje obrasce grananja koji nisu prisutni kod proteina ili DNA. Osim toga, glikozidna veza može nastati između monosaharida i aminokiselina ili lipida koji posjeduju slobodnu hidroksilnu skupinu formirajući time O-glikozidnu vezu (Seeberger, 2017). Reakcijom monosaharida i aminokiselina ili lipida koji posjeduju slobodnu amino skupinu, kao što je to kod amidne skupine bočnog ogranka asparagina dolazi do formiranja N-glikozidne veze (Varki i Kornfeld, 2017). Povezivanjem monosaharida glikozidnom vezom nastaju oligosaharidi (< 20 monosaharida) ili polisaharidi (>20 monosaharida). Oligosaharide karakterizira polarnost strukture: kraj oligosaharida koji nosi slobodni anomerni centar i zadržava reaktivnost aldehida naziva se reducirajući kraj, dok se drugi kraj naziva nereducirajućim (Seeberger, 2017).

Usprkos postojanju više stotina različitih prirodnih monosaharida, samo mali broj skupina monosaharida pojavljuje se u stanicama kralježnjaka. Pronađene skupine uključuju neutralne šećere s 5 ili 6 C-atoma (pentoze, heksoze), heksozamine (heksoze s amino skupinom koja može biti N-acetilirana, npr GlcNAc), 6-deoksiheksoze (L-fukoza), uronske kiseline (heksoze s karboksillnom skupinom na C-6 atomu), nonulosonske kiseline (kiseli šećeri s 9 C-atoma, npr N-acetilneuraminska kiselina - Neu5Ac, NeuAc) (Varki i Kornfeld, 2017). Često prisutne monosaharidne jedinice s njihovim kraticama i simboličnim prikazima prikazuje **Slika 1.1**.

**Slika 1.1** Simbolični prikazi često prisutnih monosaharida. *Ovdje navedena notacija kotištena je u daljnjem tekstu*.

### *1.3.2 Ključni čimbenici raznolikosti*

Strukturnu raznolikost glikana uvjetuje više različitih čimbenika od kojih većina proizlazi iz kemijskih svojstava monosaharida. Važni čimbenici raznolikosti su: kvantitativni i kvalitativni sastav monosaharida koji sačinjavaju šećerni lanac, kombinacije niza monosaharida unutar šećernog lanca, položaj veze između susjednih monosaharida - mogućnost grananja strukture, modifikacije strukture monosaharida (oksidacija, sulfatacija, fosforilacija, N-acetilacija, metilacija, laktonizacija) i tip glikozidne veze s aglikonom - formiranje N- ili O-glikozidne veze. Strukturna različitost glikokonjugata može biti dodatno uvjetovana diferencijalnom glikozilacijom - u vidu izostanka glikozilacije dostupnog veznog mjesta ili prisutnosti različitih glikanskih struktura na istom veznom mjestu pri čemu mogu nastati različite glikoforme glikoproteina. (Varki i Kornfeld, 2017; Seeberger, 2017; Prestegard i sur 2017).

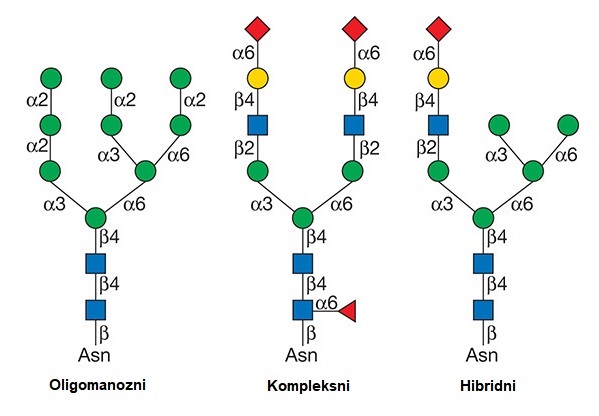
## **1.4 N-glikozilacija proteina**

### *1.4.1 Kratki pregled*

N-glikozilacija proteina enzimski je proces formiranja kovalentne veze između N-acetilglukozamina (GlcNAc) šećernog lanca i bočnog ogranka aminokiseline asparagina unutar konsenzusne peptidne sekvence Asn-X-Ser/Thr gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Ukoliko je aminokiselina "X" kiselina (asparaginska ili glutaminska kiselina) efikasnost vezanja može biti niža, a u slučaju fenilalanina efikasnost vezanja obično je povećana (Stanley i sur, 2017). U nekim slučajevima N-glikozilacija se događa na mjestima Asn-X-Cys (Takeshi i sur, 2011), dok su druge aminokiseline na položaju 3 konsenzusne sekvence rijetke s udjelom 1-3% (Zielinska i sur, 2012; Sun i Zhang, 2015). Glikozilacija može biti spriječena zbog konformacijskih promjena prilikom smatanja proteina, što će reći da je prisutnost konsenzusne sekvence nužan, ali ne i dovoljan uvjet za uspješnu glikozilaciju. Danas se smatra da oko 70% proteina sadrži N-X-S/T konsenzusnu sekvencu te da je oko 70% dostupnih konsenzusnih sekvenci zapravo glikozilirano (Stanley i sur, 2017). Većina potencijalnih glikozilacijskih mjesta nalazi se unutar regija proteina bogatih β-naboranim pločama (Zielinska i sur, 2012).

Svi eukariotski N-glikani sadrže zajedničku sržnu strukturu, **Manα1-3(Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1–4GlcNAcβ1–Asn-X-Ser/Thr**, te se mogu podijeliti u tri različite skupine. Prvu skupinu čine *oligomanozni* N-glikani gdje su na sržnu strukturu dodane isključivo manoze. Sljedeću skupinu čine *kompleksni* N-glikani kod kojih je grananje, stvaranje tzv. *antena*, započeto produljivanjem sržne strukture jednim GlcNAc ostatkom. Posljednju skupinu čine *hibridni* N-glikani, gdje se na Manα1-6 ogranak sržne strukture dodaju isključivo manoze, dok se Manα1-3 ogranak sržne strukture započinje jednom ili dvije molekule GlcNAc (**Slika 1.2)** (Stanley i sur, 2017).

Sinteza N-glikana odvija se u endoplazmatskoj mrežici (ER) i Golgijevom aparatu i može se podijeliti u dvije etape. Prva etapa sinteze konzervirana je u svih eukariota, a ključni događaj predstavlja prijenos cjelovitog oligosaharida od 14 jedinica (Glc3Man9GlcNAc2) s dolikol-fosfata (Dol-P) na nascentne sekretorne ili transmembranske proteine na luminalnoj strani ER. Druga etapa uključuje enzime, glikozidaze i glikoziltransferaze, koji sudjeluju doradi nereducirajućih krajeva glikana vezanih za protein. Ova faza započinje u lumenu ER i nastavlja se u Golgijevom aparatu na način ovisan o vrsti, staničnom tipu i supstratnom proteinu (Stanley i sur, 2017).

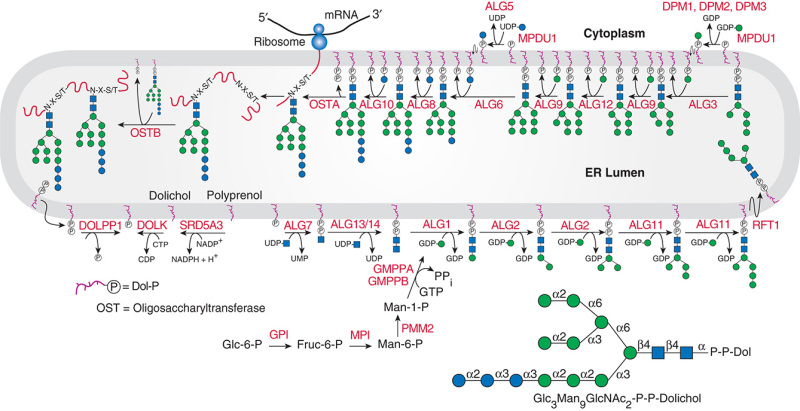


**Slika 1.2** Tipovi N-glikana. *Slika prikazuje poznate tipove N-glikana. Korištene simbole opsuje* **Slika 1.1**. *Preuzeto i modificirano prema:* (Stanley i sur, 2017).

### *1.4.2 Početna sinteza oligosaharida i aktivnost oligosahariltransferaze*

Sinteza oligosaharidne Glc3Man9GlcNAc2 jedinice započinje na citosolnoj strani ER. Za sintetske korake koji se odvijaju na citostolnoj strani kao izvor monosaharida koriste se aktivitani, nukleotidni šećeri. Geni koji kodiraju konzervirane biosintetske proteine uključene u N-glikozilaciju nalaze se na ALG (Asn-linked glycosylation) lokusu u *Saccharomyces cerevisiae*  i imaju homologe u mnogim vrstama. Prvi korak kataliziran je GlcNAc-1-fosfotransferazom (ALG7, DPAGT1 u sisavaca) koja prenosi GlcNAc-1-P s molekule uridil-difosfo aktiviranog šećera (UDP-GlcNAc) na Dol-P, formirajući time molekulu N-acetilglukozamino dolikol-pirofosfata (Dol-PP-GlcNAc). Zatim se na nastala molekula Dol-PP-GlcNAc produljuje dodatkom još jednog GlcNAc i 5 Man u enzimski kataliziranom procesu pri čemu nastaje Man5GlcNAc2-PP-Dol. Ovaj prekursor biva prebačen djelovanjem enzima kodiranog genom na RFT1 lokusu u kvasca, tzv *flipazom,* na luminalnu stranu ER, gdje kao izvor aktiviranih monosaharida u daljnjim reakcijama sudjaluju Dol-P-Man i Dol-P-Glc vezani za membranu ER. Enzim MPDU1, vezan za membranu ER, nužan je za nadograđivanje oligosaharidnog prekursora do završne strukture **Glc3Man9GlcNAc2-P-P-Dol** (Stanley i sur, 2017).

Ključni enzim ovog dijela procesa je oligosahariltransferaza, heteropolimerni membranski protein ER sastavljen od 8 podjedinica koji prenosi oligosaharidni prekursor s 14 jedinica s Dol-P na Asn-X-Ser/Thr sekvon proteina u jednom koraku i to u cijelostu ("en bloc") (Aebi, 2013). Ovu reakciju pokreće cijepanje visokoenergetske veze između Dol-P i GlcNAc-P oligosaharidnog prekurosra u molekuli **Glc3Man9GlcNAc2-P-P-Dol** (Stanley i sur, 2017).

**Slika 1.3** Sažeto prikazuje korake početne sinteze N-glikana u ER.

**Slika 1.3** Sinteza Dolikol-P-P-GlcNAc2Man9Glc3. *Dolikol (crveno-ljubičasta zavijena linija) fofat (Dol-P) lociran na citoplazmatskoj strani ER membrane prima GlcNAc-1-P sa UDP-GlcNAc iz citoplazme čime nastaje Dol-P-P-GlcNAc koji biva produljen enzimskim djelovanjem do Dol-P-P-GlcNAc2Man5 prije okretanja prema luminalnoj strani (tzv „flip“). Nakon okretanja molekula se produljuje s 4 manoze primljene s Dol-P-Man i 3 glukoze primljene s Dol-P-Glc. Dol-P-Man/Glc sintetiziraju se s citoplazmatske strane ER i također okreću na luminalnu stranu ER membrane. Enzim oligosahariltransferaza (OST) prebacuje GlcNAc2Man9Glc3 s* *Dol-P-P-GlcNAc2Man9Glc3 na protein sa konsenzusnom sekvencom N-X-S/T*. Enzimi su imenovani prema Human Genome Nomenclature Committee (HGNC) nomenklaturi. Preuzeto iz (Stanley i sur, 2017)

### *1.4.3 Obrada i sazrijevanje glikoproteina*

Nakon "en bloc" prijenosa oligosaharidnog prekurosora Glc3Man9GlcNAc2 na protein započinje faza rane obrade N-glikana u ER-u. Enzim α-glukozidaza I (MOGS) uklanja α1-2 Glc s oligosaharidnog prekursora, a α-glukozidaza II (GANAB) uklanja dvije α1-3 Glc. Ovi koraci mogu igrati ulogu u pravilnom smatanju proteina, a ukoliko se na prekursor ponovno doda jedna molekula Glc povećava se vrijeme zadržavanja glikoproteina u ER. Inhibicija ovih enzima *in vitro* kemijskim agensima rezultira pojavom Glc3Man7-9GlcNAc2 oligosaharida na zrelim glikoproteinima. Većina glikoproteina koji napuštaju ER ima na sebi vezan Man8-9GlcNAc2  N-glikan. Man8GlcNAc2 struktura nastaje djelovanjem α-manozidaze MAN1B1 koja uklanja α1-2 Man ostatak s centralne grane Man8-9GlcNAc2 oligosaharida. U *cis-*Golgi odjeklju α1-2 manozidaze MAN1A1 i MAN1A2 uklanjaju 3 Man ostatka čime nastaje Man5GlcNAc2  struktura. Ova struktura služi kao osnovica za sintezu hibridnih i kompleksnih N-glikana. U slučaju da glikoprotein stigne do *cis-*Golgijevog odjeljka, enzim endo-α-manozidaza kida glikansku strukturu do Man8GlcNAc2 - ova struktura se razlikuje od Man8GlcNAc2 koja nastaje prilikom normalne obrade i transporta glikoproteina kroz ER/Golgi sustav odjeljaka. (Stanley i sur, 2017)

Biosinteza hibridnih i kompleksnih N-glikana započinje u *medijalnom*-Golgijevom odjeklju djelovanjem N-acetilglukozaminil transferaze GlcNAcTI (MGAT1) koja postavlja 1 GlcNAc na C-2 atom α1-3 Man ostatka u Man5GlcNAc2 oligosaharidu čime nastaje GlcNAcMan5GlcNAc2 struktura. Ukoliko se dodatno ne modificira, ova strkutura služi kao polazište biosinteze hibridnih oligosaharida. Aktivnošću dvije α-manozidaze tipa II (MAN2A1, MAN2A2) dolazi do uklanjanja α1-3 i α1-6 manoznih ostataka sa GlcNAcMan5GlcNAc2 i formiranja GlcNAcMan3GlcNAc2 strukture. Djelovanjem enzima MGAT2 na navedenu strukturu se na C-2 položaj α1-6 manoze postavlja još jedna molekula GlcNAc čime nastaje osnovica *bi-antenarnih* kompleksnih N-glikana. Osnovica *tri-* ili *tetra-antenarnih* kompleksnih N-glikana nastaje djelovanjem enzima GlcNAc-TIV (MGAT4A, MGAT4B) C-4 atom sržne α1-3Man i djelovanjem GlcNAc-TV (MGAT5) na C-6 atom sržne α1-6Man GlcNAc-TV (MGAT5). (Stanley i sur, 2017)

Dodatne modifikacije kompleksnih i hibridnih N-glikana sastoje se od dodavanja monosaharida na srž N-glikana - u kralježnjaka, najčešće se događa α1-6 fukozilacija GlcNAc reducirajućeg kraja djelovanjem α1-6-fukoziltransferaze (FUT8). Produljenje antena postiže se opetovanim dodavanjem monosaharida. Česti motiv predstavlja Galβ1-4GlcNAc („LacNac“) čijim ponavljanjem nastaju poli-LacNAc slijedovi. Modifikacija samih krajeva grana N-glikana naziva se dekoracija ili postavljanje kape (engl. „capping“), a najčešće reakcije uključuju dodavanje sijalinske kiseline (sijalinizacija), fukoze, galaktoze ili GlcNAc u α-položaju. Ove modifikacije obično imaju ulogu u prezentaciji glikana lektinima ili antitijelima, budući da monosaharidi dodani u α-položaju izlaze iz ravnine koju tvore β-vezane poli-LacNAc strukture (Stanley i sur, 2017).

### *1.4.4 Mikroheterogenost glikoproteina*

Pojam mikroheterogenosti glikoproteina odnosi se na postojanje više različitih glikoformi glikoproteina (molekule s identičnom proteinskom osnovicom koje nose različite glikanske strukture) unutar populacije čija pojavnost ovisi o kompleksnoj mreži međudjelovanja različitih čimbenika glikozilacije (Stanley i sur, 2017). Iz ovoga postaje jasno da glikozilacija značajno doprinosi strukturnoj heterogenosti proteoma organizma (Krištić i Lauc, 2017). U istraživanju (Zielinska i sur, 2012) utvrđeno je da većina glikoproteina ima vezan samo jedan šećerni lanac (oko 50%), dok 20% posjeduje po dva dokazana mjesta glikozilacije, a 25% proteina čak 3 dokazana mjesta glikozilacije. Mikroheterogenost može biti uzrokovana promjenama u konformaciji proteina koje utječu na dostupnost vezanih glikana enzimima ER i Golgijevog aparata, dostupnosti nukleotidnih šećera, brzini transporta glikoproteina kroz ER/Golgi sustav i blizinom potencijalnog glikozilacijsog mjesta transmembranskoj domeni proteina. Također, glikoziltransferaze i glikozidatze ER/Golgi sustava konstantno su u kompeticiji za modifikaciju iste akceptorske (glikanske) strukture, a važno je naglasiti da aktivnost pojedinih glikoziltransferaza zahtjeva prethodnu modifikaciju akceptorske strukture djelovanjem drugih glikoziltransferaza ili glikozidaza (Stanley i sur, 2017).

## **1.5 Posebnosti N-glikozilacije proteina mozga**

### *1.5.1 Uloge N-glikana u živčanom sustavu*

Uključenost N-glikozilacije u razvoj živčanih struktura vidljiva je iz studija prirođenih poremećaja glikozilacije, ova skupina podražaja gotovo uvijek uključuje ozbiljne neurološke abnormalnosti (Freeze i sur, 2012). Proučavanjem sadržaja N-glikana mozga štakora utvrđena je jedinstvenost profila N-glikozilacije tkiva mozga. Prema dostupnim podacima, tkivo mozga pokazuje veću zastupljenost oligomanoznih struktura u usporedbi s drugim tipovima tkiva, pa tako udio Man5-9GlcNAc2 iznosi oko 15% ukupnog sadržaja N-glikana što može implicirati postojanje funkcionalne uloge ovih struktura (Chen i sur, 1998). Osim toga, zastupljenost struktura koje posjeduju sijalinsku kiselinu kao jedinu nabijenu komponentu iznosi oko 40% ukupnih N-glikana, s udjelima od 12% za mono-, 10% za di-, 7% za tri- i 7% za tetrasijalinizirane strukture. Smatra se da raznolikost terminalno sijaliniziranih struktura ima ulogu u lektin-ovisnim interakcijama (Zamze i sur, 1998). Važnost kompleksnih i hibridnih struktura N-glikana demonstrirana je eksperimentima koji su uključivali inaktivaciju konzerviranih proteina MGAT1 (N-acetilglukozaminil transferaze GlcNAcTI) i MGAT2 ( GlcNAcTII) u mišjim embrijima te ciljanu inaktivaciju ovih enzima u stanicama živčanog sustava. Ovime je utvrđeno da nedostatak MGAT1 (katalizira početni korak sinteze hibridnih N-glikana) u vrijeme embrionalnog razvoja ima letalan ihod, što svjedoči uključenosti hibridnih N-glikana u embriogenezi. Neuralni gubitak MGAT1 rezultira normalnom embriogenezom, međutim, živorođeni organizmi pokazivali su značajne razvojne teškoće koje uključuju smanjenje lokomotorne sposobnosti, pojavu tremora i paralizu. Također, pri neuronalnoj deleciji MGAT1 primijećena je povećana apoptoza živčanih stanica uslijed povećane aktivnosti kaspaze 3, što sugerira uključenost N-glikana u regulaciji procesa apoptoze. Gubitak MGAT2 za vrijeme embrionalnog razvoja nije letalan, ali živorođeni organizmi pokazuju značajne patološke promjene, što upućuje da razina hibridnih glikana ne može kompenzirati gubitak kompleksnih struktura (MGAT2 katalizira početni korak sinteze kompleksnih N-glikana). Organizmi s neuronalnom delecijom gena koji kodira MGAT2 nisu pokazivali značajne abnormalnosti (Ye i Marth, 2004).

Uloga terminalno modificiranih N-glikana pokazana je studijama (Weinhold i sur, 2005) i (Angata i sur, 2007). Uloga poli-α2-8-sijalinizacije (poliSia) terminalnih ostataka N-glikana proučavana je u kontekstu neuralne plastičnosti i razvoja. Istaživanjima je utvrđeno da poliSia modifikacija neuronalne stanične adhezijske molekule (NCAM) ima važnu ulogu u regulaciji i koordinaciji ove molekule u vrijeme razvoja živčanog sustava miša. Molekule NCAM kojima nedostaje poliSia modifikacija pokazuju povećanu aktivnost, što rezultira defektima aksonalnog razvoja, progresivnim hidrocefalusom i ranom postnatalnom smrtnosti ogranizma.

Osim uloge u neuronalnom razvoju, pokazano je da N-glikani imaju svoje mjesto i u funkciji zdravih neuronalnih tkiva. Ovdje je važno spomenuti uključenost u sinaptički prijenos signala, regulaciju aktivnosti ionskih kanala neurona kralježnjaka i modulaciju membranske ekscitabilnosti (Scott i Panin 2014). Zbog opsežnosti ovog područja, uloge pojedinih glikanskih struktura ne mogu biti detaljno obrađene u ovome radu.

### *1.5.2 Selekcija N-acetilneuraminske kiseline*

Pojam sijalinske kiseline može se odnositi na više različitih nonulosonskih kiselina: N-acetilneuraminsku (Neu5Ac, NeuAc), N-glikolilneuraminsku (Neu5Gc, NeuGc) i 2-keto-3-deoksinonsku kiselinu (Kdn). U životinja koje mogu sintetizirati NeuAc i NeuGc (sinteza iz NeuAc) pokazana je velika varijabilnost omjera NeuAc : NeuGc u različitim tkivima, međutim - ono što je zajedničko svim kralježnjacima je izostanak prisutnosti NeuGc u tkivu mozga, odnosno očita selekcija NeuAc u ovoj vrsti tkiva. U tkivu mozga NeuAc nalazi se uglavnom vezana na glangliozide (65%), glikoproteine (32%) dok se samo 3% nalazi nevezano. Eksperimentalnim radom utvrđeno je da je vjerojatni uzrok ovoj pojavi represija ekspresije hidroksilaze citidin-N-acetilneuraminske kiseline (CMAH, *katalizira pretvorbu CMP-NeuAc u CMP-NeuGc*) u živčanom sustavu životinja koje u drugim tkivima sintetiziraju NeuGc, dok u čovjeka postoji defekt gena za CMAH koji onemogućava endogenu sintezu NeuGc u svim tkivima. Dodatno, nije moguće isključiti postojanje mehanizama represije CMAH na razini mRNA, transkripcije ili posttranslacijskih modifikacija. Osim toga, nije moguće sa sigurnošću isključiti postojanje mehanizma eliminacije NeuGc iz moždanog tkiva, što potkrepljuje dokaz da se čak i pri ishrani uz prisutnost NeuGc ova molekula i dalje ne pojavljuje u tkivu mozga. (Davies i Varki, 2015). Radom (Naito-Matsui i sur, 2017) zaključeno je da prisilna ekspresija CMAH u mozgu miša rezultira abnormalnim lokomotornim sposobnostima, smanjenjem pamćenja i promjenama mijelinizacije. Usto, ovi organizmi pokazali su veću letalnu osjetljivost na subtilizin citotoksin (SubAB toksin). Osim ranije navedenih činjenica, smatra se da zamjena NeuAc za NeuGc zbog velikog udjela NeuAc na staničnim površinama dovodi do povećanja hidrofilnosti i nepoželjnih promjena naboja staničnih membrana. (Davies i Varki, 2015).

Naposljetku, vjeruje se da je prisutnost NeuGc opasna na razini mozga kao tipa tkiva, a ne za same živčane stanice. Ovome svjedoči činjenica da se primarne kulture neurona *in vitro*  obično uzgajaju u prisustvu goveđeg fetalnog seruma koji sadrži značajnu količinu NeuGc (Davies i Varki, 2015).

## **1.6 Strukturna analiza N-glikana**

Glikobiološke analize, u užem smislu, mogu se svrstati u područje *glikomike -* određuje se potpuni repertoar stanično ili tkivno eksprimiranih glikana pri definiranim vremenskim ili okolišnim čimbenicima. Suprotno, *glikoproteomičkim* analizama utvrđuje se odnos glikanske i proteinske komponente pojedinog glikoproteina, odnosno udio pojedine glikoforme u skupu glikoproteina proučavanog uzorka. (Rudd i sur, 2017).

Tipičan primjer *glikomičke* analize N-glikana obično uključuje paralelnu obradu uzoraka velikih populacija (kohorti), s naglaskom na visoku protočnost primijenjenih metoda. Nakon izolacije proteina, analiza se obično sastoji od sljedećih koraka (Ruhaak i sur, 2008):

**1. deglikozilacija** - uporabom peptidne N-glikozidaze F (PNGaza F)

**2. obilježavanje**- reducirajući kraj N-glikana obilježava se fluoroforom

**3. pročišćavanje/koncentriranje**- ekstrakcija na čvrstoj fazi, često ekstrakcija na čvrstoj fazi potpomognuta hidrofilnim interakcijama (HILIC-SPE)

**4. razdvajanje obilježenih N-glikana** - tekućinska kromatografija visoke (ili ultravisoke) učinkovitosti (HILIC-UPLC/HPLC) uz fluorescencijsku detekciju (FLR); analiza dobivenih podataka

**5. masena spektrometrija** - *online* ili *offline* elektrosprej ionizacijska spektrometrija masa (ESI-MS) ili matriksom potpomognuta lasersko desorpcijska ionizacija spregnuta s detekcijom vremena preleta (MALDI-TOF); analiza masenih spektara.

### *1.6.1 Metode deglikozilacije*

Uklanjanje vezanih N-glikana s glikoproteina može se provoditi enzimskim ili kemijskim reakcijama. Enzimske metode koriste PNGazu F koja uklanja oligomanozne, hibridne i kompleksne N-glikane s Asn veznog mjesta u proteinu, uz konverziju Asn u Asp, osim u slučaju prisutnosti α1-3 vezane sržne fukoze (tada se koristi PNGaza A), dok endoglikozidaza H (endo H) uklanja hibridne i oligomanozne N-glikane (Stanley i sur, 2017; Ruhaak i sur, 2010). Hidrazinom je moguće ukloniti O- i N-vezane glikane, ali uporaba ovog kemijskog agensa relativno je rijetka zbog težine rukovanja uslijed visoke potencijalne toksičnosti i eksplozivnosti (Ruhaak i sur, 2010).

### *1.6.2 Derivatizacija*

Uporaba reakcije reduktivne aminacije za obilježavanje reducirajućih krajeva N-glikana fluorescentnom sondom uz prisustvo reducirajućeg agensa (natrijev cijenoborhidrid ili pikolin boran) široko je rasprostranjena, a kao otapalo za reakciju obično se koristi octena kiselina u dimetil sulfoksidu. Prednost ove reakcije je stehiometrijski omjer 1:1 za glikan i fluorofor, što olakšava izravnu kvantifikaciju FLR-metodom. Kao fluorescentne sonde koriste se različiti aromatski spojevi kao što su 2-aminobenzamid (2-AB), 2-aminobenzojeva kiselina (2-AA), 2-aminopiridin (PA) i mnoge druge (Ruhaak is sur, 2010). Pri odabiru sonde važno je imati na umu energiju ekscitacije i emisije pri FLR detekciji kao i ionizacijska svojstva sonde pri uvjetima ESI-MS (Kozak i sur, 2015). Permetilacija je još jedna česta modifikacija kojom se postiže povećanje hidrofobnosti N-glikana što može povoljno utjecati na osjetljivost detekcije neutralnih i nabijenih N-glikana pri ESI-MS ili MALDI-MS analizi u pozitivnom načinu rada. Ova reakcija metilira slobodne hidroksi, amino i karboksilne skupine molekule N-glikana. (Ruhaak i sur, 2010).

### *1.6.3 Pročišćavanje i ukoncentriravanje*

Neposredno prije uporabe separacijskih tehnika, iz uzorka glikana potrebno je ukloniti suvišak reagensa za derivatizaciju i ostale moguće nečistoće iz postupka pripreme. Dostupne su različite metode: ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE) u slučaju permetiliranih N-glikana, gel filtracija, papirna kromatografija, ionsko izmjenjivačka kromatografija (uporaba ionsko izmjenjivačkih kolona omogućava separaciju neutralnih i nabijenih frakcija N-glikana; IEC), a najčešće ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE). Prednost SPE ove metode dobro skaliranje, dakle omogućava visoku protočnost, a dostupan je i različitih čvrstih faza kao što su HILIC ili porozni grafitni ugljik (PGC). Pri uporabi HILIC-SPE, hidrofilni N-glikani bivaju zadržani dok hidrofobne nečistoće slobodno eluiraju. Nakon uklanjanja nečistoća zadržani N-glikani mogu se eluirati mobilnom fazom s visokim udjelom vode (Ruhaak i sur, 2010).

### *1.6.4 Separacijske tehnike*

Često korištene separacijeske metode uključuju uporabu kapilarno elektroforetskih tehnika, kao i širok spektar kromatografskih tehnika. U literaturi postoje navodi uporabe HILIC, PGC, IEC i različitih obrnutofaznih (RP) stacionarnih faza (Ruhaak i sur, 2010).

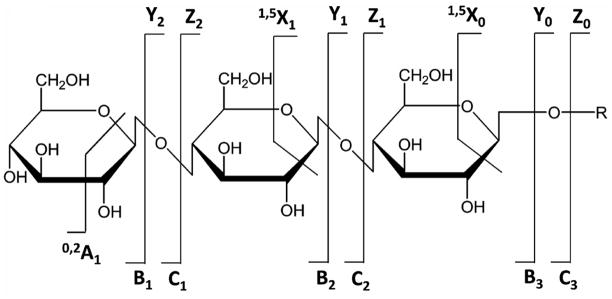
HILIC-tekućinska kromatografija u širokoj je uporabi za separaciju oligosaharida. Ova metoda srodna je kromatografiji normalne faze (NP), ali važnu razliku među njima čini mehanizam separacije - u slučaju NP dominira adsorpcija, dok se separacija na HILIC kolonama odvija uz razdiobu (Ruhaak i sur, 2010). Komercijalno su dostupne aminske, amidne, *zwitterionske* (ZIC) i diolne HILIC kolone. Uporabom amidnih ili diolnih kolona smanjuje se utjecaj ionskih interakcija, dominantne postaju interakcije vezanja vodikovim vezama (Ruhaak i sur, 2010; Zauner i sur, 2011). Tipični uvjeti mobilne faze uključuju uporabu 50-100mM amonijeva formijata (pH 4.4; moguć dodatak kiseline) kao vodene faze i manje polarnog otapala kao što je acetonitril (ACN), dok se ravnotežno stanje za mono- i oligosaharide postože se pri 10-25% vode u acetonitrilu (ACN) s malim udjelom soli ili kiseline. Eluacija s kolone postiže se povećanjem udjela vode u mobilnoj fazi. (Ruhaak i sur, 2010; Zauner i sur, 2011).

Zadržavanje molekula na HILIC stacionarnoj fazi ovisi o **hidrofilnom potencijalu molekule**. U slučaju glikana čimbenici koji utječu na zadržavanje su veličina, naboj, monosaharidni sastav, međusobno vezanje monosaharida i grananje. Međutim, separacija oligosaharida primarno je uvjetovanja brojem polarnih skupina (Zauner i sur, 2011). Zbog korelacije vremena zadržavanja s veličinom molekule glikana, ova tehnika može se svrstati u tehnike razdvajanja po veličini (engl. *size separation*) (Ruhaak i sur, 2010). Ova pojava omogućava normalizaciju vremenske osi primjenom vanjskog standarda koji sadržava parcijalni hidrolizat dekstrana (engl. *dextran ladder*) koji je obično 2-AB obilježen - ovim postupkom vrijeme retencije transformira se u broj glukoznih jedinica (GU) (Royle i sur, 2008). Važno je napomenuti da fluorescentno obilježeni N-glikani obično pokazuju niža vremena retencije nego neobilježene molekule istog sastava. (Ruhaak i sur, 2010).

Smanjenje čestica stacionarne faze sa 3-5μm (HILIC-HPLC) na sub-2μm veličinu (1,7 μm, UPLC uvjeti) za posljedicu ima povećanje kapaciteta pika i bolje razdvajanje, što može rezultirati povećanom rezolucijom (Ahn i sur, 2009). Ostali važni parametri za optimizaciju analize uključuju temperaturu kolone, brzinu protoka (0.3-0.5 mL/min) i nagib gradijenta. Posljednja dva uvjeta od posebne su važnosti zbog ovisnosti separacije oligosaharida o uvjetima gradijenta (Ahn i sur, 2009).

### *1.6.5 Masena spektrometrija*

Masena spektrometrija tehnika je proizvodnje i detekcije iona razdijeljenih prema omjeru njihove mase i naboja (*m/z*). Detekcija iona rezultira zapisom relativne zastupljenosti iona kao funkcije njegove *m/z* vrijesnosti, što daje karakterističan *maseni spektar* (Han i Costello, 2014). Ranije glikobiološke studije koristile su metodu bombardiranja brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*; FAB), ali u novije vrijeme ovu metodu naslijedile su MALDI i ESI tehnologije koje omogućavaju znatno veću osjetljivost i brzinu analize. Poboljšanu osjetljivost (uslijed povećanja hidrofobnosti i učinkovitosti ionizacije) moguće je postići derivatizacijom glikana reduktivnom aminacijom ili permetilacijom (Haslam i sur, 2006). Obje metode su tzv. *mekane* metode ionizacije, što znači da pri ionizaciji ne postoji dovoljan suvišak energije koji bi doveo do fragmentacije molekulskog iona što može predstavljati problem za detaljne strukturalne analize (Han i Costello, 2014). Svojstvo MALDI je da spektar sadrži niz jednostruko nabijenih molekulskih iona, pri čemu učinkovitost ionizacije raste s povećanjem molekule. U slučaju ESI ionizacijska učinkovitost opada s povećanjem veličine molekule. Međutim jedna od osnovnih prednosti ESI je smanjenje gubitka sijalinskih skupina nabijenih glikana. Osim toga, ESI obično generira višestruko nabijene specije (koje mogu komplicirati analizu spektara ukoliko se ne uklone računalnim metodama) te može generirati spektre u pozitivnom ili negativnom načinu rada (Han i Costello, 2014).

*Tandemska masena spektrometrija (MSn)* koristi metode nisko- i visokoenergetske sudarom izazvane disocijacije (CID), infracrvene multifotonske disocijacije i nešto novije elektronima izazvane disocijacijske metode za detaljnu stukturnu analizu oligosaharida. (Han i Costello, 2014). Pri uvjetima CID mogu se dogoditi dva glavna tipa cijepanja strukture glikana: cijepanje glikozidnih veza između susjednih monomera i cijepanja unutar prstena monomera (**Slika 1.4**) (Domon i Costello, 1988, Han i Costello, 2014). Cijepanje glikozidnih veza (često kod protoniranih oligosaharida) daje informaciju o sekvenci glikana, ali ne o položaju veza (Han i Costello, 2014). Cijepanja unutar prstena u pozitivnom modu češća su pri upotrebi oligosaharida s metalnim aduktima ili permetiliranih derivata (Han i Costello, 2014) i daju dovoljno informacija za detaljnu strukturnu analizu. CID analiza u negativnom načinu rada vrlo je korisna za analizu glikana koji u strukturi sadrže kisele skupine (Han i Costello, 2014).

**Slika 1.4** Obrasci fragmentacije ugljikohidrata s navedenim imenima pojedinih fragmenata. *A, X – pucanje prstena monosaharida, B, C, Y, Z – pucanje glikozidne veze. Reproducirano prema Domon i Costello, 1988)*

Potpuno ručno anotiranje masenih spektara glikana predstavlja vrlo vremenski zahtjevan zadatak zbog čega se obično pri rutinskim analizama upotrebljavaju računalni alati kao što je *Glycomod* (poglavlje *3.6. Određivanje pretpostavljenih struktura N-glikana*) čime se vrijeme anotacije uvelike skraćuje. Svaki proizvođač opreme obično uz uređaj distribuira i komercijalno dostupne alate koji osim što omogućavaju upravljanje uređajem mogu služiti za vizualizaciju i anotaciju masenih spektara (op.a).