

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Sofia Shkunnikova

**N-glikozilacija imunoglobulina A u šećernoj bolesti tipa 1 kod djece**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Olge Gornik Kljaić te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

## KRATICE

ACN	acetonitril
Asn	asparagin
DanDiabKids	Danski registar šećerne bolesti dječje i adolescentne dobi (eng. <i>The Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes</i> )
Dol	dolikol
Dol-P	dolikol fosfat
ER	endoplazmatski retikulum
Fuc	fukoza
GA	Golgijev aparat
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
Glc	glukoza
GlcA	glukuronska kiselina
GlcNAc	N-acetilglukozamin
HbA1c	glikirani hemoglobin
HILIC-UPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofobnim interakcijama (eng. <i>Hydrophilic Interaction Liquid Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )
HLA	eng. <i>human leukocyte antigen</i>
IdoA	iduronska kiselina
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
Man	manoza
NeuAc	acetilneuraminska kiselina
NeuGc	N-glikolilneuraminska kiselina

OGTT	oralni test na toleranciju glukoze (eng. <i>Oral Glucose Tolerance Test</i> )
RCF	relativna centrifugalna sila (eng. <i>Relative Centrifugal Force</i> )
Ser	serin
Sia	sijalinska kiselina
slgA	sekretorni IgA
T1DM	šećerna bolest tipa 1 (eng. <i>Type 1 Diabetes Mellitus</i> )
Thr	treonin
TNF- $\beta$	faktor tumorske nekroze (eng. <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\beta</math></i> )
UDP-GlcNAc	uridin difosfata N-acetilglukozamin
Xyl	ksiloza

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Šećerna bolest tipa 1.....	1
1.2. Glikozilacija.....	4
1.2.1. N-glikozilacija.....	6
1.2.2. N-glikozilacija u šećernoj bolesti tipa 1.....	8
1.3. Imunoglobulin A.....	9
1.3.1. Struktura i funkcija IgA.....	9
1.3.2. Imunoglobulin A u T1DM.....	11
2. HIPOTEZA.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Ispitanici.....	13
3.2. Priprema uzoraka.....	14
3.3. Priprema otopina.....	15
3.4. Izolacija IgA iz plazme i N-deglikozilacija.....	16
4. REZULTATI.....	19
4.1. Kromatogramski profil N-glikana imunoglobulina A.....	19
4.2. Usporedba izoliranih plazmatskih N-glikana imunoglobulina A.....	20
4.3. Usporedba zastupljenosti deriviranih svojstava u glikanskom profilu IgA.....	23
5. RASPRAVA.....	26
5. ZAKLJUČCI.....	28
6. ZAHVALE.....	29
7. POPIS LITERATURE.....	30
8. SAŽETAK.....	36
9. SUMMARY.....	37
10. ŽIVOTOPIS.....	38

## 1. UVOD

### 1.1. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (engl. *type 1 diabetes mellitus*, T1DM) kronična je autoimuna bolest koju karakterizira povišena koncentracija glukoze u krvi (hiperglikemija) i pojava autoprotutijela na  $\beta$ -stanice gušterače ili na inzulin.<sup>1</sup> Drugi naziv za ovu varijantu bolesti je inzulin ovisan tip šećerne bolesti, a odlikuje se apsolutnim manjkom inzulina. Terapija ovog tipa šećerne bolesti je konstantno unošenje nadomjesnog inzulina subkutanim injekcijama. Najčešće se javlja u djece i adolescenata s učestalošću oko 10% od ukupno oboljelih od šećerne bolesti.

Incidencija T1DM pokazuje značajne dobne, spolne, geografske i kalendarske varijacije.<sup>2</sup> U Europi incidencija varira od 1/100 000 stanovnika u Ukrajini do 49/100 000 u Finskoj.<sup>3</sup> Najveća incidencija je prisutna u Skandinavskim zemljama dok se prema jugu i istoku kontinenta incidencija smanjuje. Porast incidencije u većini zemalja Europe tijekom posljednjih desetljeća procjenjuje se na 3% prosječnog porasta incidencije godišnje.<sup>4</sup> U Republici Hrvatskoj prosječni broj oboljelih od T1DM je 9/100 000, a godišnji porast incidencije iznosi čak 9%.<sup>2</sup> Oba su spola podjednako pogođena bolešću u djetinjstvu, ali muškarci su češće pogođeni u ranom odraslom životu, što je u kontrastu s drugim autoimunim bolestima.<sup>1</sup>

Etiologija T1DM obuhvaća i genetske i okolišne čimbenike, kao i njihovu interakciju.<sup>5</sup> Najveći genetski faktor za povećanje rizika od oboljenja od T1DM pripisuje se genima iz porodice HLA (*engl.* human leukocyte antigen), posebno genotipovima HLA DR3 i HLA DR4, a povećan rizik povezuje se i uz inzulinski gen na kromosomu 11.<sup>6,7</sup> Međutim, porast pojavnosti T1DM na svjetskoj razini sugerira da okolišni čimbenici imaju veći učinak od genetskih na patogenezu bolesti. Mnoga istraživanja ukazuju na to da veliku ulogu u patogenezi T1DM imaju virusne infekcije (citomegalovirus, enterovirusi, echovirusi, Epstein Barr virus),<sup>8</sup> starija dob roditelja,<sup>9</sup> prehrana (kravlje mlijeko, deficit vitamina D, nizak unos cinka),<sup>10</sup> te produljeno izlaganje stresnim situacijama i toksičnim supstancama.<sup>11</sup>

Etiopatofiziologija T1DM može se podijeliti u tri stadija kod osoba s genetskim rizikom za oboljenje. Prvo, osoba naslijedi rizični HLA genotip. Sljedeći stadij je izlaganje jednom ili više okolišnih čimbenika koji mogu potaknuti autoimunu reakciju

na  $\beta$ -stanice gušterače. U zadnjem stadiju pojavljuje se prvo autoprotutijelo na inzulin i/ili na glutamin dekarboksilazu koje se veže na  $\beta$ -stanice i pokreće njihovo uništavanje.<sup>12</sup> Prva autoprotutijela mogu se detektirati već u ranome djetinjstvu.<sup>13</sup> Napredovanjem bolesti protutijela se mogu stvoriti i na antigene na površini  $\beta$ -stanica (IA-2) i ZnT8 transporter.<sup>14</sup> Uništenjem  $\beta$ -stanica smanjuje se koncentracija inzulina u plazmi što dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi. Mehanizam uništavanja  $\beta$ -stanica nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da veliku ulogu u tome imaju autoreaktivni CD8+ T-limfociti.<sup>15</sup> Vrlo je važno naglasiti da se jedno ili više navedenih autoprotutijela u plazmi mogu detektirati mjesecima, čak i godinama, prije kliničkog nastupa T1DM kod čak 95% pacijenata.<sup>16</sup>

Najčešći simptomi T1DM uključuju kroničan umor, smanjenje energije, poliuriju, polidipsiju, naglo debljanje ili mršavljenje, neuobičajenu glad i zamućenje vida te posljedičnu sljepoću.<sup>17</sup> Ovi se simptomi teže uočavaju kod mlađe populacije koja je najviše zahvaćena T1DM, pogotovo prvi simptomi hipoglikemije koje djeca ne mogu adekvatno komunicirati svojim roditeljima ili skrbnicima što predstavlja poseban izazov u tretiranju ovog stanja.<sup>18</sup> Uobičajena terapija za T1DM su pripravci inzulina odgovarajuće duljine terapijskog djelovanja za održavanje normoglikemije.<sup>5</sup> Ukoliko je adherencija terapiji slaba, može doći do razvoja komplikacija bolesti. Razlikujemo akutne i kronične komplikacije. Akutne komplikacije nastupaju u kratkom vremenu i mogu biti opasne po život, a uključuju dijabetičku ketoacidozu, laktacidozu te hipoglikemijsku i hiperosmolarnu komu. Kronične komplikacije nastaju kao posljedica dugotrajne neregulacije glikemije, a najčešće su kardiovaskularne bolesti, retinopatija, nefropatija, neuropatija, dijabetičko stopalo i posljedične amputacije donjih ekstremiteta.<sup>19,20</sup>

Dijagnoza šećerne bolesti postavlja se temeljem vrijednosti glukoze određenih u krvi nakon gladovanja (natašte), tijekom OGTT-a (engl. *Oral Glucose Tolerance Test*) ili slučajnim uzimanjem uzorka krvi. Patološkim se smatra glikemija natašte iznad 7 mmol/L, vrijednost OGTT iznad 11,1 mmol/L i glikemija slučajnog uzorka krvi iznad 12,2 mmol/L, uzimajući u obzir da za postavljanje konačne dijagnoze dva uzastopna nalaza moraju imati patološku vrijednost koncentracije glukoze u krvi. Za proučavanje dugoročnog glikemijskog statusa (2-3 mjeseca) koristi se mjerenje koncentracije glikiranog hemoglobina (HbA1c).<sup>21</sup>

Šećerna bolest spada u deset vodećih uzroka smrti u svijetu.<sup>22</sup> Iako mjere prevencije nisu poznate za T1DM, razvidno je da bi biomarker koji ukazuje na

potencijalnu sklonost pojedinca, a pogotovo djece i adolescenta, oboljenju od T1DM uvelike pomogao u ranom otkrivanju T1DM i smanjenju razvoja komorbiditeta koji se pojavljuju kao posljedica bolesti i skraćuju životni vijek oboljelih. Do sada, promjene N-glikozilacija proteina se pokazala kao izvrsni biomarker za patološke promjene u mnogim bolestima koje se manifestiraju nemogućnošću održavanja normoglikemije, uključujući šećernu bolest tipa 1 i 2, gestacijsku šećernu bolest, HNF1A-MODY i druge.<sup>23,24</sup>



## 1.2. Glikozilacija

Glikozilacija je jedna od najvažnijih kotranslacijskih i posttranslacijskih modifikacija proteina koja se odvija pretežno u citosolu, endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu.<sup>25</sup> Prije svega, glikozilacija utječe na svojstva proteina kao što je topljivost i stabilnost, te pomažu u poprimanju završne i aktivne konformacije.<sup>26</sup> Glikani su odgovorni za trodimenzionalnu strukturu proteina s kojom protein stupa u interakciju sa svojim okolišem te su sastavni i nerazdvojni dio proteinske strukture. Glikozilacija je uključena u mnoštvo bioloških procesa poput interakcije proteina s receptorom, imunskog odgovora, ekskrecije i transporta proteina.<sup>27</sup> Glikani sudjeluju i u većini interakcija na površini stanica s toksinima, bakterijama i virusima, ali i drugim stanicama. Koliko je važna ispravna sinteza glikoproteina može se vidjeti na primjeru nasljednih poremećaja glikozilacije.<sup>28</sup> Ti su poremećaji uzrokovani greškama u sintezi O- ili N-vezanih glikana, dolikola, prekursora ili glikozilfosfatidilinozitolnog sidra.<sup>29</sup> Osim toga, sve veći broj istraživanja povezuje promjenu glikozilacije s autoimunim bolestima, raznim oblicima karcinoma, kao i s težim oblicima/posljedicama infektivnih bolesti.<sup>30</sup>

Važno je naglasiti da proces glikozilacije nije izravno kodiran genima – sinteza glikoproteina regulira složena dinamička mreža enzima kodiranih preko više stotina gena koja se kontinuirano mijenja. Enzimi za glikozilaciju su brojni, a jednim imenom nazivaju se glikoziltransferaze. Njihov krajnji glikanski produkt ovisi o regulacijskim faktorima kao i o različitim polimorfizmima samih enzima, epigenetičkim faktorima, okolišnim čimbenicima, dostupnost supstrata i mnogim drugima.<sup>31</sup>

Postoji više od 7000 različitih glikana koji se mogu kovalentno povezati s polipeptidnom okosnicom i dati konačni glikoproteinski produkt. Raznolikost osnovnih gradivnih jedinica u glikokonjugatima je ograničena pri čemu se radi o svega desetak monosaharida: fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), glukuronska kiselina (GlcA), iduronska kiselina (IdoA), manoza (Man), ksiloza (Xyl) i sijalinske kiseline kao što su N-acetilneuraminske (NeuAc) i N-glikoilneuraminske (NeuGc) kiseline.<sup>32</sup> Ono što čini glikom eukariota tako kompleksnim jest različit slijed monosaharida, položaj glikozidne veze, anomerna konfiguracija glikozidne veze ( $\alpha$  ili  $\beta$ ), broj mjesta grananja i položaj mjesta grananja. Raznolikost glikana značajno povećava i kompleksnost proteoma jer

se jedan genski produkt može glikozilirati na mnogo načina pri čemu može tvoriti na tisuće glikoproteina koji mogu imati različite funkcije.<sup>31</sup>

Određeni protein može imati nekoliko glikozilacijskih mjesta, a njegove se glikoforme mogu razlikovati po zauzetosti glikozilacijskih mjesta (makroheterogenost) i raznolikosti glikanskih struktura (mikroheterogenost).<sup>33</sup> Regulacija biosintetskih puteva glikozilacije ovise o više parametara i na nju mogu utjecati mnogi čimbenici, uključujući genetske čimbenike, dostupnost aktiviranih šećera vezanih na nukleotide, vrijeme provedeno u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu, kao i dostupnost određenog mjesta glikozilacije.<sup>34</sup>

Glikozilacija proteina razlikuje se od osobe do osobe, ali je izuzetno stabilna u pojedincu.<sup>35</sup> Tek kada se homeostaza određene osobe promijeni, bilo načinom života ili patološkim procesima, glikozilacija će se značajno promijeniti.<sup>36</sup> Glikozilacija se u mnogim studijama također povezuje i s godinama, spolom i načinom života. Primjeri takvih promjena su povećani udio bisekcijskih glikana, smanjena galaktozilacija i sijalinizacija imunoglobulina G (IgG) starenjem.<sup>37</sup>

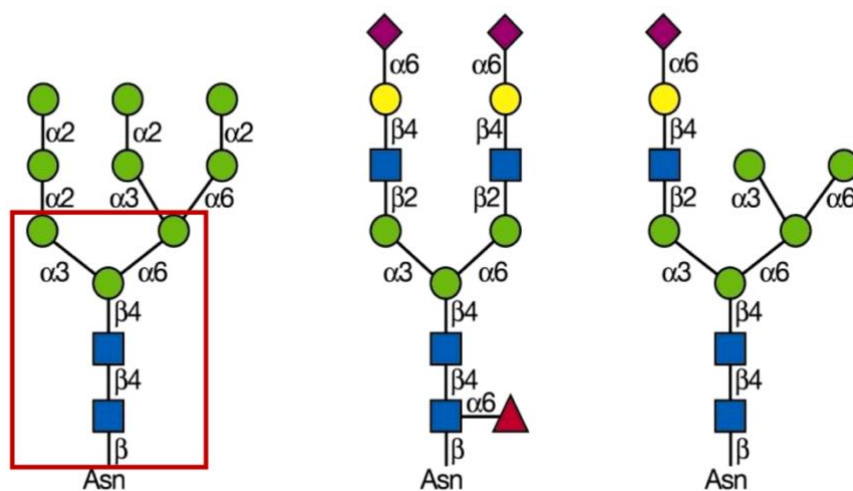
Brojne studije otkrile su promjene glikozilacije proteina plazme kod različitih bolesti, upalnih stanja, urođenih poremećaja glikozilacije, ali i u fiziološkim stanjima kao što je trudnoća.<sup>38</sup> Također, poznato je da specifične glikoforme služe kao mete vezanja za neke bakterije i viruse ili mogu imati proupalnu ili protuupalnu ulogu u imunosnom odgovoru.<sup>39</sup>

Pokazano je da brojni proteini plazme kao što su hemopektin i vitronektin imaju promijenjenu glikozilaciju kod pacijenata s hepatocelularnim karcinomom i histiocitomom Langerhansovih stanica.<sup>40</sup> Glikozilacija haptoglobina i  $\alpha$ 2-HS-glikoproteina se znatno mijenja u pacijenata s rakom gušterače i s pankreatitisom,<sup>41</sup> dok se glikozilacija  $\alpha$ 1-antitripsina i apoproteina B može povezati s razinom inzulina i kolesterola u krvi te s promijenjenim aterogenim svojstvima lipoproteina.<sup>42</sup> Sve navedeno otvara mogućnost korištenja glikana proteina plazme kao ranih prognostičkih ili dijagnostičkih biomarkera ili za pomoć u stratifikaciji pacijenata u personaliziranoj medicini.

### 1.2.1. N-glikozilacija

Šećerne strukture (glikani) mogu se vezati na proteine O- ili N-glikozidnom vezom. N-glikozidna veza nastaje kada se N-acetilglukozamin na reducirajućem kraju šećernog lanca (C1 atom) poveže s asparaginom na potencijalnom glikozilacijskom mjestu. Svi N-glikani dijele zajedničku šećernu jezgru slijeda  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ . Mjesto za N-glikozilaciju je slijed aminokiselina u nizu asparagin-X-serin/treonin unutar primarnog slijeda aminokiselina, pri čemu je X bilo koja aminokiselina.

N-glikani klasificirani su u tri osnovna tipa – oligomanozni, kompleksni i hibridni (redom, Slika 1). U oligomanoznom tipu jezgru nastavljaju se isključivo molekule manoze, dok se u kompleksnom tipu može naći i do 6 grananja koje započinju s GlcNAc, a svaka se od njih može produžiti ponavljanjem  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$  (LacNAc). U hibridnom tipu Man produžuje  $\text{Man}\alpha 1-6$  granu jezgre, dok jedna ili dvije molekule GlcNAc produžuju  $\text{Man}\alpha 1-3$  granu jezgre.



Slika 1. Tri osnovna tipa N-vezanih glikana, od kojih svaki sadrži sržnu strukturu  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$  označenu crvenim pravokutnikom krajnje lijevo. Zeleni krug – manoz, plavi kvadrat – N-acetilglukozamin, ružičasti romb – sijalinska kiselina, žuti krug – galaktoza, crveni trokut – fukoza<sup>31</sup>

Biosinteza N-glikana odvija se u dvije faze koje se odvijaju u dva različita stanična organela, endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu (GA). Dodavanje N-glikana na proteine započinje kotranslacijski na citoplazmatskoj strani

ER pri čemu se prvo stvara oligosaharidni prekursor na nosaču koji se zove dolikol fosfat. Dolikol je lipid koji se kod eukariota sastoji najčešće 19 izoprenskih 5C jedinica. Dolikol fosfat (Dol-P) smješten na citoplazmatskoj strani membrane ER prima GlcNAc-1-P iz UDP-GlcNAc za stvaranje Dol-P-P-GlcNAc. Dol-P-P-GlcNAc proširuje se na Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> koristeći GDP-Man kao prekursor prije nego što se okrene uz pomoć enzima flipaze preko ER membrane na njegovu luminalnu stranu. Na luminalnoj strani membrane ER, dodaju se četiri molekule manoze iz Dol-P-Man i tri ostatka glukoze iz Dol-P-Glc. Zreli Dol-P-P-glikan prenosi se na već spomenute slijedove Asn-X-Ser/Thr ciljnog proteina. Nakon prijenosa velike glikanske strukture Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> na protein, glukozidaze unutar ER uklanjaju tri molekule glukoze, a manozidaza uklanja molekule manoze. Te su reakcije usko povezane sa trodimenzionalnim smatanjem glikoproteina u konačnu aktivnu konformaciju uz pomoć pomoćnih proteina i određuju hoće li se protein prenijeti u GA gdje će se doraditi ili će biti razgrađen.

Nakon uspješnog smatanja glikoprotein se translocira u GA gdje se proces uklanjanja manozna nastavlja, te se početni glikanski prekursor svodi se na svega 5 šećera – Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Na tu se jezgru u procesu terminalne glikozilacije dodaju razni šećeri od kojih su najčešći N-acetilglukozamin, galaktoza, sijalinska kiselina i fukoza. Terminalna se glikozilacija događa uz pomoć glikoziltransferaza koje uspostavljaju glikozidne veze i time sintetiziraju glikanski lanac te glikozidaza koje hidrolizom veze uzrokuju njegovo pucanje. Međusobna interakcija tih enzima omogućuje stvaranje raznolikih i kompleksnih glikanskih struktura koje im omogućuju čitav spektar funkcija koje obavljaju u gotovom glikoproteinu.<sup>31</sup>

### 1.2.2. N-glikozilacija u šećernoj bolesti tipa 1

Još u prošlom stoljeću pokazano je da su razine specifičnih glikana vezanih za serumske proteine povećane u bolesnika s dijabetesom, što se može objasniti porastom koncentracije samih glikoproteina u krvi.<sup>43</sup> Međutim, potvrđeno je da se i sastav glikana koja se nalazi na glikoproteinima mijenja u šećernoj bolesti, iz čega se može zaključiti da glikani imaju izravnu ulogu u patofiziologiji te bolesti.<sup>44</sup> Paralelno uz glikozilacijske promjene, kod pacijenata sa šećernom bolesti može se odvijati i glikacija. To je neenzimatska reakcija reduktivnih šećera i proteina, a najčešći produkt takve reakcije je glikirani hemoglobin (HbA1c) koji u kliničkoj praksi služi za dugoročno praćenje održavanja normoglikemije kod oboljelih od šećerne bolesti.<sup>45</sup>

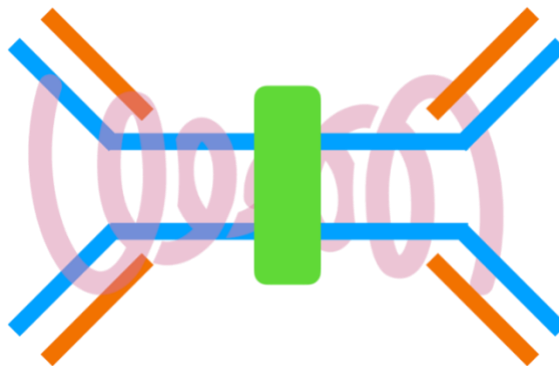
Pretpostavlja se da je jedan od glavnih mehanizama oštećenja tkiva glukozom posredovan putem biosinteze heksozamina.<sup>46,47</sup> Tim se putem u zdravih osoba iskorištava do 3% ukupne glukoze. Međutim, u uvjetima hiperglikemije postotak glukoze koja ulazi u taj biosintetski put će se povećati pri čemu će nastati više konačnog produkta, aktiviranog šećera vezanog na nukleobazu, odnosno uridin difosfata N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc).<sup>46</sup> Pretpostavlja se da je taj mehanizam odgovoran za uočeni porast visokorazgranatih N-glikana u plazmi pacijenata s T1DM, ali i kod zdravih ljudi s povećanim rizikom od razvoja dijabetesa u kasnijoj životnoj dobi.<sup>24</sup>

Promjena N-glikozilacije proteina plazme može se povezati i sa komplikacijama T1DM. Opaženo je povećanje udjela složenih N-glikana (visokorazgranate, tro- i tetra-antenske strukture), uz smanjenje udjela jednostavnijih biantenarnih N-glikana među prisutnim glikoformama.<sup>48</sup> Te su promjene u korelaciji s višim udjelom HbA1c i većim omjerom albumina i kreatinina što odražava lošu kontrolu glikemije.<sup>49</sup> Promjene glikozilacije u  $\alpha$ 1-kiselom glikoproteinu, povezane su s vaskularnim komplikacijama kod T1DM.<sup>23</sup>

### 1.3. Imunoglobulin A

#### 1.3.1. Struktura i funkcija IgA

Imunoglobulin A (IgA) drugi je po koncentraciji imunoglobulin u serumu (1-3 mg/mL), prvi u sekretima kao što je slina, suze, u probavnom i respiratornom sustavu te u kolostrumu. U serumu se nalazi kao monomer i to u dva podrazreda, IgA1 i IgA2, dok se u vanjskim navedenim sekretima nalazi u obliku dimera koji se naziva sekretorni IgA (slgA). Brzina sinteze IgA dvostruko je veća od ostalih imunoglobulina zbog njihovog kraćeg poluvremena u serumu (do 6 dana) i izlaska u sekrete.<sup>50</sup>



*Slika 2. Shematski prikaz slgA; plavom bojom su označeni teški lanci, narančastom bojom laki lanci, sivom bojom sekretorna komponenta, a zelenom bojom J-lanac*

IgA, kao i drugi imunoglobulini, građen je od dva teška i dva laka lanca. Dodatno, slgA ima J-lanac koji tvori dimer IgA i sekretornu komponentu koja ga usmjerava za sekreciju iz plazma stanica prilikom sinteze. Podrazredi IgA razlikuju se prema teškom lancu ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ) i prema tome imaju li zglobnu regiju koja ih štiti od proteaza mikroorganizama.<sup>39</sup> Zglobna regija, koja ima visok sadržaj prolina, serina i treonina, mjesto je vezivanja čak pet O-vezanih glikanskih lanaca koji se sastoje od N-acetilgalaktozamina s  $\beta 1,3$ -vezanom galaktozom koja može biti sijalizirana.<sup>51</sup> Sijalinska kiselina se također može vezati na N-acetilgalaktozamin pomoću  $\alpha 2,6$  veze. Sastav šećera ovih O-vezanih glikana u zglobnom području normalnog serumskog IgA1 je promjenjiv. Prevladavajući oblici uključuju disaharid N-acetilgalaktozamin-galaktoze i njegove monosijalinizirane i disijalinizirane oblike.<sup>52</sup>

IgA1 čini 85% ukupnog IgA u serumu i 11-14% serumskih imunoglobulina. Sadrži zglobnu regiju od 13 aminokiselina koja omogućava imunosnu obranu od antigena inkapsuliranih bakterija. IgA2 s druge strane, nema zglobnu regiju i ima manji udio glikanskih struktura nego IgA1. Funkcionalno je aktivniji od IgA1, ali ne aktivira komplement.<sup>53</sup>

IgA ima brojne uloge u imunosnom sustavu – fiksira komplement preko alternativnog puta, preko specifičnih receptora na makrofagima može djelovati kao opsonin za fagocite, može uzrokovati eozinofilnu degranulaciju, a poznato je i da ima ulogu u humoralnom odgovoru na parazite.<sup>39</sup> Najveća uloga sIgA je u lokalnoj zaštiti mukoznih površina od virusa i bakterija, pri čemu se mikroorganizmi ne uništavaju, već se samo spriječava njihovo vezanje na sluznicu i prodor kroz istu. Nalazi se na površini gastrointestinalne, respiratorne i urogenitalne sluznice. Iz navedenog može se zaključiti da IgA ima i proinflamatorne i antiinflamatorne karakteristike.<sup>39</sup>

O selektivnom manjku IgA može se govoriti kada se koncentracija IgA u serumu spusti ispod 0,05 g/L, a klinički se očituju u obliku učestalih sinopulmonalnih infekcija, kroničnih infekcija gastrointestinalnog sustava, alergijskih bolesti te nastanka autoimunih bolesti kao što je T1DM.<sup>54</sup>

### 1.3.2. Imunoglobulin A u T1DM

Dokazana je povezanost promjene u koncentraciji ukupnih imunoglobulina, imunoglobulina A i G s razvojem bolesti šećerne bolesti tipa 1 u novodijagnosticirane djece i bolesnika kojima je T1DM dijagnosticiran ranije. Naime, koncentracija serumskog IgA smanjena je u novodijagnosticirane djece, a koncentracija IgG povišena. Pretpostavlja se da se radi o stimulaciji TNF- $\beta$  za kojeg se zna da je odgovoran za promjenu klasa IgA.<sup>55</sup> Progresijom bolesti, koncentracija oba imunoglobulina u serumu opada, što se može pripisati činjenici da hiperglikemija smanjuje produkciju imunoglobulina. Međutim, taj je mehanizam dokazan samo u *in vitro* uvjetima.<sup>56</sup> Razlike u koncentracijama imunoglobulina ne koreliraju s dobi, spolom i indeksom tjelesne mase.<sup>57</sup>

Nedavno je uočena uloga IgA u povećanju rizika za razvoj autoimunih bolesti kao što su upalne bolesti crijeva, antifosfolipidni sindrom i alergije,<sup>58</sup> a isto se pokazalo i za T1DM. Pokazano je da se sastav mikrobiote kod pacijenata s T1DM značajno mijenja i da se koncentracija bakterija vezanih na sIgA u stolici razlikuje kod zdravih osoba i osoba oboljelih od T1DM. Koncentracija bakterija vezanih na IgA u stolici u korelaciji je s titrom protutijela na GADA i s trajanjem bolesti, što ukazuje na potencijalnu povezanost IgA s uništavanjem  $\beta$ -stanica gušterače i upalnim autoimunim mehanizmom u pozadini.<sup>59</sup> Promjena glikozilacijskog profila IgA slabo je istražena u kontekstu bolesti i upalnih stanja.



## 2. HIPOTEZA

Promjena N-glikozilacijskog profila ukupnih proteina plazme, kao i imunoglobulina G, u mnogim se istraživanjima pokazala kao potencijalni prognostički, dijagnostički, ali i terapijski biljeg raznih bolesti. Također je primjećeno da mehanizmi koji dovode do nastanka šećerne bolesti tipa 1 mogu uzrokovati promjenu u glikozilaciji, kao što je primjerice povećani udio razgranatih glikana, oligomanozilacije, galaktozilacije i sijalinizacije proteina.

Poznato je da IgA igra važnu ulogu u imunitetu sluznice ograničavajući vezanje bakterijskih patogena na crijevni epitel, a nedavno je zabilježeno da su aberantna sekrecija IgA i vezanje IgA na bakterije povezani s povećanom osjetljivošću za razvoj autoimune bolesti, uključujući upalne bolesti crijeva, antifosfolipidni sindrom i alergije. Ova istraživanja sugeriraju da IgA igra važnu ulogu u održavanju homeostaze u crijevima i posredovanju nastanka autoimunih bolesti.

Uloga IgA u patogenezi šećerne bolesti tipa 1, koju karakterizira autoimuna komponenta, je slabo poznata, a promjene njegovog glikozilacijskog profila u ovoj bolesti su potpuno neistražene. Stoga je cilj ovog rada identificirati glikanske strukture prisutne na IgA kod djece i adolescenata s postavljenom dijagnozom šećerne bolesti tipa 1 u odnosu na glikozilaciju njihove zdrave braće i sestara radi otkrivanja potencijalnog biljega kojim bi se mogao predvidjeti razvoj šećerne bolesti tipa 1 već u ranoj dobi.

Postavljena je hipoteza da, iako potencijalno dijele gensku predispoziciju, postoji razlika u glikozilaciji IgA između djece s dijagnozom šećerne bolesti tipa 1 u ranom tijeku bolesti u odnosu na njihovu zdravu braću i sestre.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Uzorci plazme korišteni u ovom istraživanju dobiveni su iz Danskog registra šećerne bolesti dječje i adolescentne dobi (eng. *The Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes, DanDiabKids*). Analizirano je 63 uzoraka plazme djece i adolescenata oboljelih od T1DM, u rasponu godina 4-22 s medijanom 11, koji su bili prikupljeni u roku od tri mjeseca od postavljanja dijagnoze. Kroz isti registar prikupljeni su i uzorci plazme njihovih 86 zdravih braće i sestara. Kriteriji za uključivanje zdravih braće i sestara bili su da je u registru bio dostupan uzorak njihovog biološkog brata ili sestre s T1DM. U Registar su od 1966. uključena sva djeca s dijagnosticiranim T1DM prije 15. godine života u Danskoj, a od 2006. godine se u registar upisuju sva djeca kojoj se dijagnosticira bilo koji oblik šećerne bolesti do navršene 18. godine. Registar DanDiabKids kontinuirano izmjenjuje podatke s danskim nacionalnim registrom pacijenata, čime se osigurava da sva djeca s dijagnozom T1DM budu također unesena i u registar DanDiabKids.<sup>60</sup> Kohorte prikupljene putem registra DanDiabKids već su bile korištene u brojnim studijama.<sup>61</sup>

Studija je osmišljena u suglasnosti s Helsinškom deklaracijom te su svi sudionici studije potpisali informirani pristanak. Također, studija je odobrena od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.2. Priprema uzoraka

Nakon odmrzavanja, uzorci plazme djece sa šećernom bolesti tipa 1 i njihovih zdravih braća i sestara su centrifugirani 3 minute na 13400 RCF, a supernatant je korišten za daljnju analizu. Uzorci su zatim nasumično raspoređeni na pločicu za uzorke uz uzorke standarda i slijepih proba kako bi se minimizirao učinak vanjskih faktora na analizu i time smanjio broj sustavnih pogrešaka. Kao standardi koristili su se uzorci plazme zdravih osoba kojima nije dijagnosticirana šećerna bolest, dok se kao slijepa proba koristila ultra čista voda.

### 3.3. Priprema otopina

Budući da je za pripremu svih otopina vrlo važno prilagoditi njihov pH, prije postupka izrade pufera obavezno je kalibrirati pH metar s otopinama pH u rasponu pH vrijednosti pufera koji se izrađuju.

#### Priprema 10x PBS pufera

Za pripremu 1L 10x PBS pufera potrebno je u ultra čistoj vodi otopiti odgovarajuću odvagnutu (Mettler Toledo) masu natrij klorida (NaCl), natrij hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), kalij dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), i kalij klorida (KCl). Kada se sve soli otope, otopina se nadopuni do 1L u odmjernoj tikvici te se dobivena otopina profiltrira. Provjeri se pH otopine koji mora biti između 6,6 i 6,8.

#### Priprema 1x PBS i 5x PBS pufera

Za pripremu 1x PBS pufera pripremljeni 10x PBS pufer razrijedi se u omjeru 1:9 s ultra čistom vodom, pH se prilagodi na 7,4 te se on skladišti u hladnjaku. Za pripremu 5x PBS pufera pripremljeni 10x PBS pufer se razrijedi u omjeru 1:4 s ultra čistom vodom.

#### Priprema 0,1 M mravlje kiseline

Za pripremu 200 mL 0,1 M mravlje kiseline dodano je 574  $\mu\text{L}$  koncentrirane mravlje kiseline u ultra čistu vodu. Provjeren je pH koji mora biti oko 2,5 te je pohranjen u hladnjaku.

#### Priprema otopine za pohranu

Otopina za pohranu priprema se otapanjem TRIS u ultra čistoj vodi, nakon čega se doda etanol tako da njegov ukupni maseni udio bude 20%. Vrijednost pH se prilagodi na 8,5 dodavanjem otopine HCl.

### 3.4. Izolacija IgA iz plazme i N-deglikozilacija

Za deglikozilaciju i analizu profila N-glikana plazmatskog IgA, potrebno je najprije izolirati sam IgA od ostalih proteina plazme što se radi na CaptureSelect™ IgA afinitetnom matriksu (ThermoFisher). Matriks je oblikovan u kuglice koje na sebe specifično i selektivno vežu IgA te omogućavaju njegovu izolaciju od ostalih proteina plazme. CaptureSelect™ kuglice nanose se na Orochem filter ploču. Prije nanošenja pripremljenih uzoraka na afinitetni matriks, potrebno ga je pripremiti ispiranjem nizom otopina prema uputama proizvođača. Matriks se redom ispiru ultra čistom vodom, 0.1 M mravljom kiselinom, 10x PBS puferom i 1x PBS puferom te se između svakog ispiranja tekućina isušuje uz pomoć vakuumske pumpe (Pall Corporation). Nakon pripreme matriksa, Orochem ploča stavi se na pločicu za sakupljanje od 1 mL (Waters) te se na njega nanosi 40 µL pripremljenih uzoraka, standarada i slijepe probe. Uzorci se inkubiraju s matriksom 10 minuta uz neprekidno treskanje na tresilici (IKA - Schüttler MTS 4) te se ostatak plazme povuče vakuumskom pumpom u pločicu za sakupljanje. Postupak se ponovi još dva puta za što učinkovitije vezanje IgA na afinitetni matriks. Nespecifična vezanja sastojaka plazme na afinitetni matriks se uklanjaju višestrukim ispiranjem kuglica pomoću 1x PBS otopine. Nakon što je vezani IgA pročišćen ispiranjima, isti se za daljnju analizu treba skinuti s matriksa. To se izvodi ispiranjem s 0.1 M mravljom kiselinom, koja se u pločici za sakupljanje neutralizira s prethodno dodanim 1,0 M amonijevim bikarbonatom. Nakon toga, uzorci se suše do liofilizata za daljnju obradu (SpeedVac, Thermo Fisher). Matriks se nakon korištenja mora regenerirati ispiranjem redom s 0.1 M mravljom kiselinom, 10xPBS puferom, 1xPBS puferom i puferom za pohranu (0.1 M TRIS-HCl s 20% etanola). Pločica s matriksom potopi se u pufer za pohranu te se može koristiti ponovno.

Izolirani IgA se nakon toga deglikoziliraju, odnosno s njega se mogu enzimski skinuti N-glikani koji će se poslije analizirati. U liofilizirani uzorak doda se 1,33% SDS, otopina se inkubira 10 minuta na 65 °C, ohladi se i centrifugira (Centifuge 5804 Eppendorf). U ohlađeni uzorak doda se 4% IgePal te se otopina inkubira 15 minuta na tresilici. IgePal je deterdžent koji čuva enzim PNGazu od snažnog denaturirajućeg djelovanja SDS-a. Tim postupkom omogućena je denaturacija IgA. Deglikozilacija provodi se enzimskom otopinom koja sadrži 5x PBS i enzim PNGazu. Otopina se doda denaturiranom IgA te se sve zajedno inkubira 18 sati na 37 °C.

Nakon deglikozilacije, glikani se moraju obilježiti kako bi se mogli detektirati na fluorescencijskom kromatografskom detektoru. Obilježavanje glikana obavlja se pomoću otopine za obilježavanje koja sadrži octenu kiselinu otopljenu u dimetilsulfoksidu (DMSO), prokainamid i pikolinboran u odgovarajućim omjerima. Navedena otopina doda se svakom uzorku te se sve zajedno inkubira 10 minuta na tresilici, a zatim 2 sata na 65 °C. Nakon 2 sata, uzorci se izvade i ohlade. Nakon obilježavanja uzoraka, oni se moraju pročistiti od svih zaostalih nečistoća u postupku obilježavanja. Pročišćavanje se radi na GHP filter pločicama (Pall) koje se prije korištenja moraju isprati redom 70%-nom otopinom etanola, ultra čistom vodom i 96%-nim acetonitrilom (ACN). Uzorci se zatim nanese na GHP pločicu uz 100%-ni ACN, inkubiraju se 2 minute te se tekućina povuče vakuumskom pumpom. Vezani glikani na GHP pločici isperu se četiri puta s 96%-nim ACN. U GHP pločicu se ponovno ispipetira 96%-ni ACN te se ona centrifugira 5 minuta na 1000 rpm. GHP pločica stavi se na PCR pločicu (FrameStar), u nju se ispipetira ultra čista voda te se sve zajedno inkubira 15 minuta na tresilici. Zatim se centrifugira 5 minuta na 1000 rpm. Postupak s ultra čistom vodom se ponovi još jednom. Nakon toga se uzorci hermetički zatvore i pohrane u hladnjaku.

Pročišćeni i obilježeni uzorci analizirani su HILIC-UPLC metodom na *Waters Acquity* UPLC instrumentu (Waters, Milford, MA, USA). Uvjeti razdvajanja glikana navedeni su u tablici 1. Pri početnim uvjetima protoka otapalo A činio je 28% mobilne faze, dok je otapalo B činilo 72%. Protok se kroz 23 minute dizao tako da otapalo A čini 41%, a otapalo B 59%. Instrument se sastoji od četiri dijela - pumpe koja propušta mobilnu fazu, kolone, automatskog injektora za uzorak i fluorescentnog detektora. Podešavanje uvjeta regulira se pomoću Empower programa (Waters), iz kojeg se dobivaju rezultati analiza. Rezultati obrađuju u istom programu, pri čemu se ručno integriraju površine ispod kromatografa, nakon čega slijedi statistička obrada podataka u Excelu (verzija 1808, Microsoft Office) i programu R (verzija 3.3.3, <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.3.3/>).

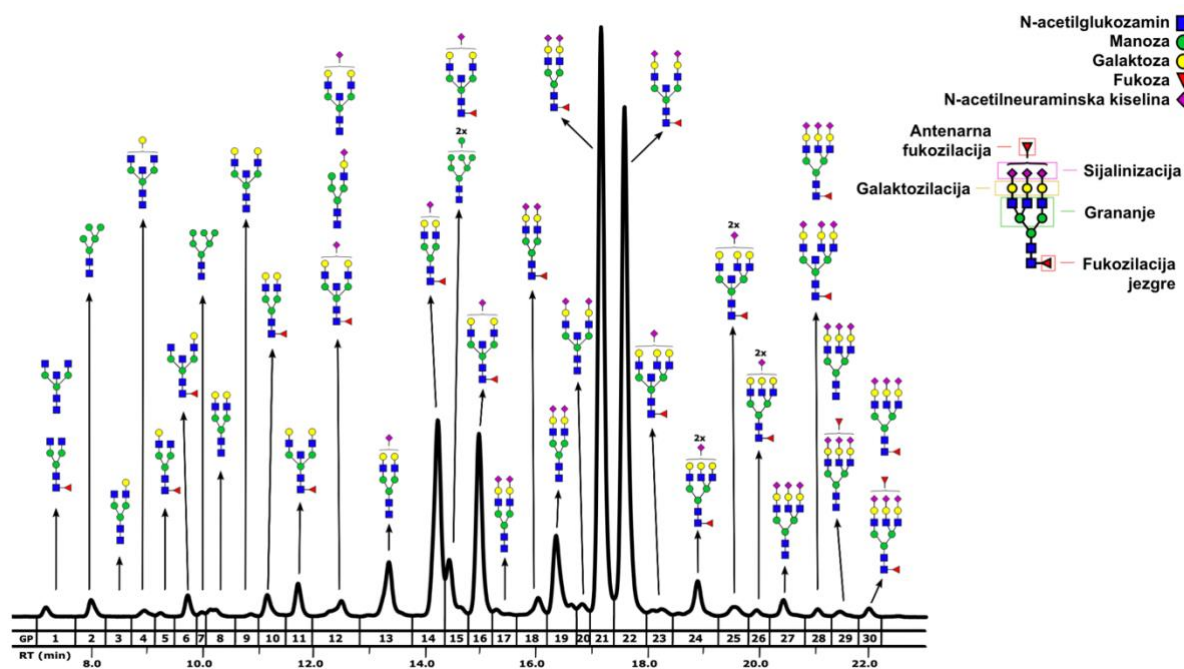
Tablica 1. Optimizirani uvjeti za razdvajanje N-glikana s IgA

<b>PARAMETAR</b>	<b>VRIJEDNOST</b>
kolona	ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide Column
veličina čestica kolone	1,7 μm (130Å veličina pora)
otopina A	0,1 M amonijev formijat, pH 4,4
otopina B	ACN
brzina protoka	0,561 mL/min
temperatura kolone	60 °C
temperatura uzoraka	10 °C
valna duljina ekscitacije	310 nm
valna duljina detekcije	370 nm

## 4. REZULTATI

### 4.1. Kromatogramski profil N-glikana imunoglobulina A

Analizom glikana HILIC-UPLC metodom određuje se retencijsko vrijeme svih glikanskih struktura prisutnih u uzorcima, što se grafički prikazuje na kromatogramu. Glikanske strukture koje imaju manji broj šećernih podjedinica hidrofobnije su i zbog toga će ranije izaći iz kolone. Glikanske strukture koje imaju veći broj podjedinica, odnosno one koje su polarnije i s više naboja, dulje će se zadržavati na stacionarnoj fazi kolone koja je hidrofilna i polarna. Na Slici 3. prikazan je kromatogram N-glikanskog profila IgA dobiven HILIC-UPLC analizom. Kromatogram sadrži 30 pikova (GP), pri čemu svaki odgovara jednoj glikanskoj strukturi. Površina ispod svakog GP-a predstavlja relativnu koncentraciju glikana iz dane skupine u ukupnom sadržaju glikana na IgA.



Slika 3. Kromatogramski profil N-glikana IgA razdvojenih u 30 kromatogramskih pikova (GP1-GP30) metodom HILIC-UPLC. Prikazane su glavne glikanske strukture koje odgovaraju pojedinom piku.



#### 4.2. Usporedba izoliranih plazmatskih N-glikana imunoglobulina A

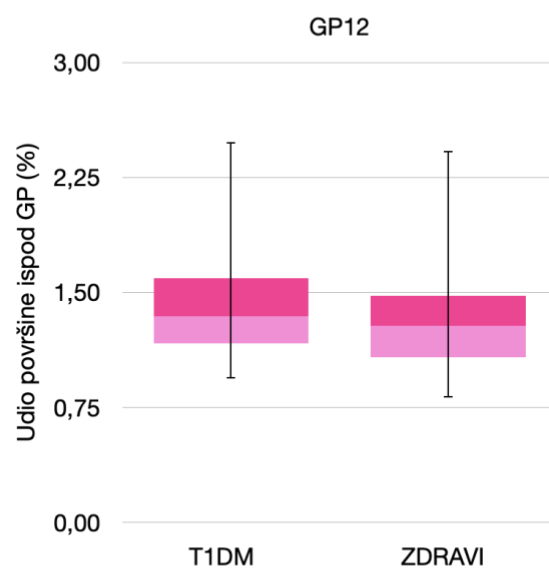
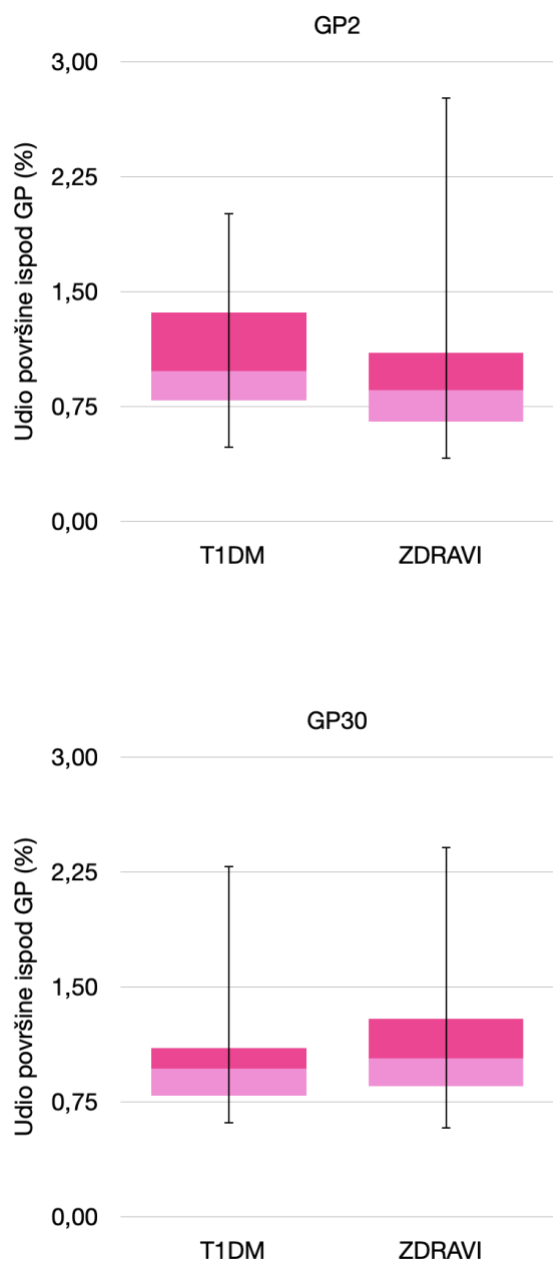
Rezultati analize 149 uzoraka prikazani su prema pojedinim glikanskim skupinama i obrađeni s obzirom na dijagnozu T1DM te su vidljivi u tablici 2.

*Tablica 2. Rezultati usporedbe pojedinih kromatografskih pikova, odnosno glikanskih struktura, između populacije djece i adolescenata oboljelih od T1DM i njihove zdrave braće i sestara*

SKUPINA	MEDIJAN (MINIMUM-MAKSIMUM) %		P-VRIJEDNOST	KORIGIRANA P-VRIJEDNOST
	T1DM	ZDRAVI		
GP1	1,028 (0,467-3,285)	0,925 (0,483-3,098)	0,618	0,951
GP2	0,986 (0,481-2,013)	0,857 (0,409-2,768)	<u>0,001</u>	<u>0,017</u>
GP3	0,081 (0,037-0,285)	0,079 (0,030-0,519)	0,957	0,961
GP4	0,927 (0,516-2,242)	0,949 (0,547-2,024)	0,352	0,861
GP5	0,278 (0,144-0,732)	0,269 (0,137-0,714)	0,681	0,951
GP6	0,810 (0,416-1,908)	0,739 (0,488-2,144)	0,102	0,603
GP7	1,705 (0,882-2,613)	1,623 (0,795-2,718)	0,141	0,603
GP8	0,266 (0,136-0,700)	0,282 (0,100-0,882)	0,891	0,961
GP9	2,405 (1,711-3,689)	2,368 (1,300-3,458)	0,830	0,961
GP10	0,253 (0,106-0,481)	0,224 (0,090-0,562)	0,275	0,824
GP11	2,017 (1,151-3,772)	1,856 (0,893-4,816)	0,466	0,861
GP12	1,361 (0,938-2,479)	1,287 (0,812-2,426)	<u>0,025</u>	0,248
GP13	7,034 (4,143-9,376)	6,441 (3,621-9,249)	0,396	0,861
GP14	14,723 (10,159-18,398)	14,626 (9,700-19,255)	0,823	0,961
GP15	4,336 (3,197-5,846)	4,215 (3,080-6,072)	0,262	0,824
GP16	7,730 (5,249-11,973)	7,561 (4,013-12,850)	0,669	0,951
GP17	0,587 (0,352-1,438)	0,642 (0,229-1,246)	0,488	0,861
GP18	1,067 (0,724-2,005)	1,098 (0,643-2,041)	0,961	0,961
GP19	5,071 (3,937-8,900)	5,068 (3,144-7,589)	0,932	0,961
GP20	0,551 (0,386-0,937)	0,544 (0,269-0,906)	0,673	0,951
GP21	23,589 (12,660-32,539)	23,777 (8,636-31,069)	0,484	0,861
GP22	17,194 (12,989-25,722)	17,732 (11,179-23,634)	0,956	0,961
GP23	0,469 (0,277-0,938)	0,494 (0,191-0,721)	0,487	0,861

SKUPINA	MEDIJAN (MINIMUM-MAKSIMUM) %		P-VRIJEDNOST	KORIGIRANA P-VRIJEDNOST
	T1DM	ZDRAVI		
GP24	1,473 (1,031-2,007)	1,451 (1,076-2,286)	0,698	0,951
GP25	0,682 (0,509-1,034)	0,683 (0,460-1,120)	0,131	0,603
GP26	0,403 (0,229-0,589)	0,406 (0,166-0,670)	0,472	0,861
GP27	0,613 (0,361-1,625)	0,645 (0,364-1,298)	0,206	0,772
GP28	0,280 (0,153-0,546)	0,280 (0,184-0,549)	0,780	0,961
GP29	0,417 (0,114-1,221)	0,452 (0,177-1,464)	0,105	0,603
GP30	0,970 (0,608-2,288)	1,035 (0,573-2,412)	<u>0,006</u>	0,088

Za svaku glikansku skupinu neparametrijskim statističkim Mann-Whitney testom napravljena je usporedba kako bi se ustanovilo postoje li značajne razlike između oboljele i zdrave djece za tu glikansku skupinu. One skupine glikana u kojima je testom izračunata  $p$ -vrijednost bila manja od 0,05 smatraju se statistički značajno različitim između oboljele i zdrave djece. Prema podacima u tablici 2. i odabranoj razini značajnosti vidljivo je da je ustanovljena značajna razlika između oboljele i zdrave djece za glikanske skupine GP2, GP12 i GP30. Nakon korekcije za višestruko testiranje, preostali značajan GP je GP2. Grafički prikaz uspoređivanih skupina koje se razlikuju vidljiv je na slici 4.



Slika 4. Prikaz rezultata usporedbe glikanskih pikova 2, 12 i 30 ispitanika s T1DM i njihove zdrave braće i sestara

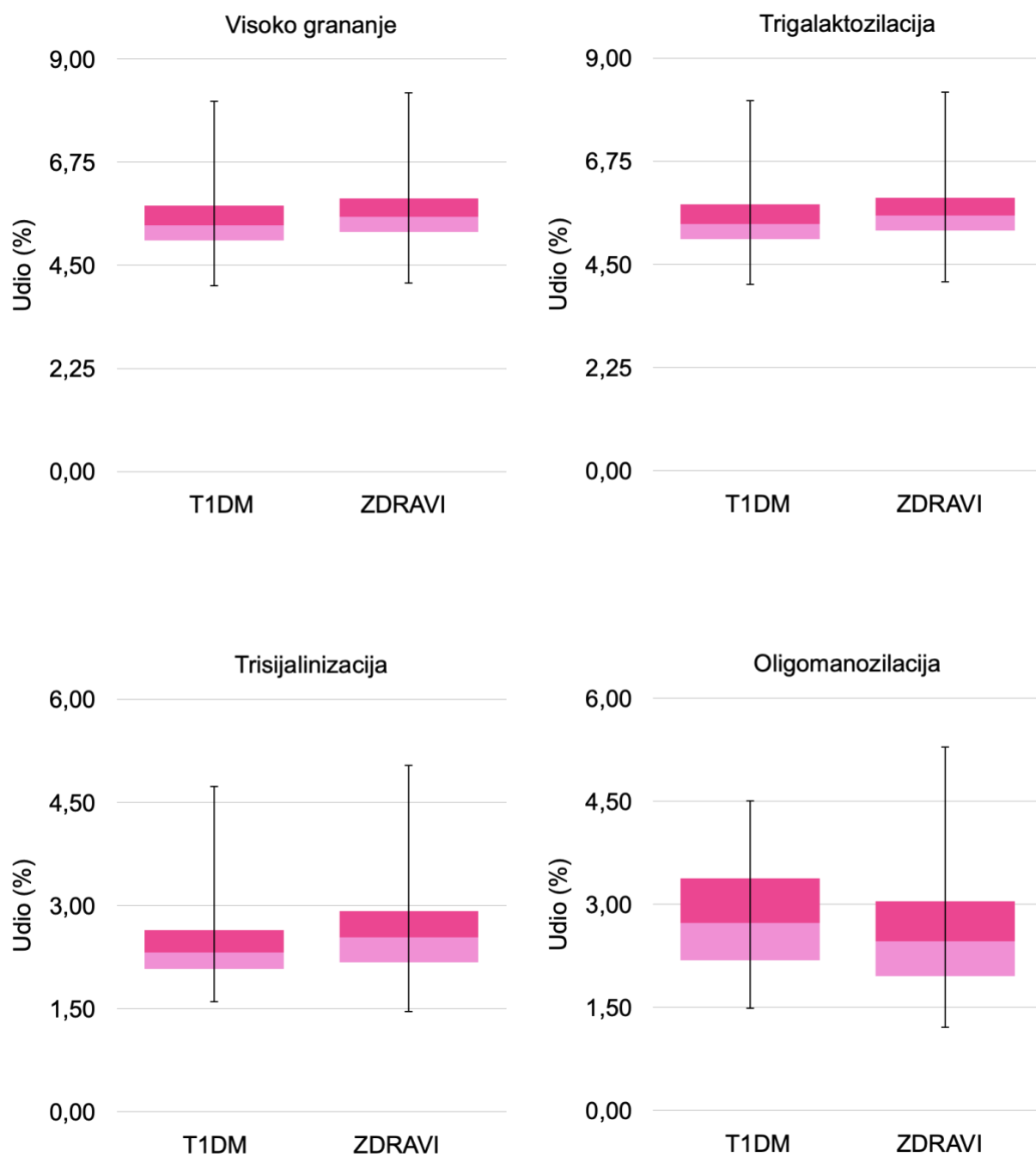
### 4.3. Usporedba zastupljenosti deriviranih svojstava u glikanskom profilu IgA

Osim izravno izmjerenih glikana, u softverskom programu R je izračunata i veličina efekta povezanosti 12 deriviranih glikozilacijskih svojstava s pojavom T1DM. U glikane s niskim stupnjem grananja spadaju GP1, GP3-6 i GP8-22. U glikane s visokim stupnjem grananja spadaju GP23-30. U agalaktozilirane glikane spada struktura označena s GP1. U monogalaktozilirane glikane spadaju GP3-6 i GP12, dok u digalaktozilirane spadaju GP8-11 i GP13-22. U trigalaktozilirane glikane spadaju strukture GP23-30. U monosijalinizirane glikane spadaju GP12-16 i GP23, u disijalinizirane GP17-22 i GP24-26, a u trisijalinizirane GP27-30. U glikane s račvućim N-acetilglukozaminom spadaju strukture GP1, 3, 6, 11, 12, 15, 16, 20, 22, 23 i 25. U glikane sa sržnom fukozilacijom spadaju GP5, 6, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 21-26, 28 i 30. U oligomanozne glikane spadaju strukture GP2 i GP7.

P-vrijednosti za svako biološki značajno derivirano obilježje glikanskih struktura iznad je statistički značajne granice od  $p < 0,05$ , kako je vidljivo prikazanim rezultatima (Tablica 3). Iz navedene je tablice vidljivo da su statistički značajne skupine s visokim grananjem, trigalaktozilacijom, trisijalinizacijom i oligomanozilacijom. Grafički prikaz uspoređivanih deriviranih skupina koje se razlikuju vidljiv je na slici 5.

Tablica 3. Rezultati usporedbe pojedinih deriviranih svojstava između populacije djece i adolescenata oboljelih od T1DM i njihove zdrave braće i sestara

SKUPINA	MEDIJAN (MINIMUM-MAKSIMUM) %		P-VRIJEDNOST	KORIGIRANA P-VRIJEDNOST
	T1DM	ZDRAVI		
nisko grananje	91,7 (87,6-93,7)	92,1 (88,1-94,1)	0,853	0,853
visoko grananje	5,4 (4,0-8,1)	5,6 (4,1-8,3)	<u>0,018</u>	<u>0,046</u>
agalaktozilacija	1,0 (0,5-3,3)	0,9 (0,5-3,1)	0,618	0,735
monogalaktozilacija	2,5 (1,6-5,0)	2,4 (1,7-4,9)	0,679	0,735
digalaktozilacija	87,5 (77,9-90,1)	87,6 (81,1-90,5)	0,678	0,735
trigalaktozilacija	5,4 (4,0-8,1)	5,6 (4,1-8,3)	<u>0,018</u>	<u>0,046</u>
monosijalinizacija	35,6 (31,9-39,2)	34,8 (31,4-39,6)	0,107	0,228
disijalinizacija	51,1 (42,3-57,4)	51,6 (39,2-57,2)	0,328	0,601
trisijalinizacija	2,3 (1,6-4,7)	2,5 (1,5-5,1)	<u>0,013</u>	<u>0,046</u>
račvajući N-acetilglukozamin	37,9 (29,8-54,3)	38,0 (27,4-52,2)	0,591	0,735
sržna fukozilacija	77,2 (62,3-83,7)	77,6 (68,9-83,9)	0,568	0,735
oligomanozilacija	2,7 (1,5-4,5)	2,5 (1,2-5,3)	<u>0,015</u>	<u>0,046</u>



Slika 5. Prikaz rezultata usporedbe deriviranih svojstava ispitanika s T1DM i njihove zdrave braće i sestara, koji se statistički značajno razlikuju

## 5. RASPRAVA

Dijagnostika šećerne bolesti tipa 1 u djece i adolescenata predstavlja veliki izazov zbog nespecifičnosti ranih simptoma koji se mogu povezati s prirodnim rastom i razvojem djeteta. Rani probir djece na predispoziciju za razvoj T1DM mogla bi uvelike olakšati dijagnostiku, ali i posljedično održavanje normoglikemije kod djece kako bi se spriječile neželjene posljedice bolesti. Glikozilacija plazmatskih proteina sve više se uvodi kao karakteristična promjena koja se može pratiti u svojstvu biomarkera određenih bolesti, pogotovo onih upalnog i autoimunog karaktera.<sup>62,63</sup> Provedene su brojne studije N-glikozilacije proteina plazme i IgG u populaciji oboljelih od T1DM, ali na uzorcima odrasle populacije.<sup>49</sup> U ovom radu napravljena je analiza N-glikanskog profila imunoglobulina A u uzorcima plazme djece kojoj je dijagnosticirana T1DM u usporedbi s njihovim zdravim braćom i sestrama HILIC-UPLC metodom. Glikozilacija IgA na dječjoj populaciji oboljelih od T1DM u ranoj fazi bolesti do sada nije bila proučavana.

Iz tablice 2. može se vidjeti da je došlo do statistički značajne promjene u udjelu glikanske strukture koja odgovara GP2 između djece oboljele od T1DM u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Nadalje, iz tablice 3. vidljivo je da je došlo do statistički značajnih promjena u udjelu određenih deriviranih svojstava glikanskih struktura. U djece oboljele od T1DM smanjene su razine visoko razgranatih, trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih glikana, a povećane razine oligomanoznih glikana u usporedbi s njihovim zdravim braćom i sestrama. Najznačajnija promjena primjećuje se u oligomanoznim glikanima, što je u skladu s činjenicom da je statistički značajno promijenjen GP upravo oligomanozni GP2.

Poznato je da je razina sijaliniziranih N-glikana proteina plazme povećana u različitim upalnim bolestima.<sup>23</sup> Primjerice, sijalinizacija Fc fragmenta IgG smanjuje afinitet vezanja protutijela na FcγRIIIa receptore na NK stanicama što se povezuje se sa smanjenom citotoksičnošću ovisnom o protutijelima.<sup>64</sup> Taj je proces važan tijekom eliminacije patogena te se pretpostavlja da je jedan od okidača nastanka T1DM upravo imunosna reakcija na neki patogen. U ovom radu, uočeno je smanjenje udjela trisijaliniziranih glikana što je suprotno prethodno opisanoj promjeni na ukupnim plazmatskim proteinima i IgG-u u istim ispitanicima što govori u prilog činjenici da je uloga glikozilacije specifična za pojedini protein. Moguće je da se promjene u

glikozilaciji IgA pojavljuju kasnije od promjena u glikanskom profilu plazmatskih proteina i IgG.

Nadalje, povećanje udjela oligomanoznih N-glikana na IgA u ovom radu slaže se s prethodnim studijama o promjeni glikozilacije u T1DM. Naime, poznato je da N-glikani na IgG koji završavaju s GlcNAc aktiviraju sustav komplementa u drugoj autoimunoj bolesti, reumatoidnom artritisu, vezanjem lektina koji veže manozu (MBL).<sup>65</sup> Zanimljivo je i da postoje studije koje govore o povećanju razine MBL i njegovih pridruženih serinskih proteaza kod oboljelih od T1DM.<sup>66,67</sup> MBL dijeli isti afinitet vezanja za strukturu manoze, glukoze, GlcNAc i L-fukoze na terminalnim položajima glikana.<sup>68</sup> Osim toga, gen koji kodira glavni protein na putu aktivacije komplementa, protein komplementa C3, povezuje se s povećanim rizikom od razvoja T1DM među nositeljima HLA-DR4/478, jednim od genotipova s najvećim rizikom povezanim s ovom bolešću.<sup>69</sup> Slijedom navedenog, može se pretpostaviti da povećani udio oligomanoznih glikana na IgA smanjuje mogućnost aktivacije komplementa. Promijenjena aktivnost sustava komplementa također je jedan od glavnih imunskih obrambenih puteva organizma koji potencijalno može poslužiti kao okidač i podloga za razvoj autoimunih bolesti poput T1DM.

Ovo istraživanje još je jedno u nizu onih koji pokazuju da se promjene glikozilacije na proteinima plazme mogu koristiti kao biomarkeri za dijagnostiku i stratifikaciju pacijenata s T1DM. Sličnost statistički značajnih promjena u deriviranim svojstvima glikanskih struktura ukazuje na istovjetnu promjenu regulacije procesa stanične glikozilacije u pacijenata s T1DM.

Kako su ove promjene u glikozilaciji zabilježene na uzorcima koji su bili uzeti do tri mjeseca nakon dijagnoze T1DM, teško je reći jesu li one posljedica bolesti ili uzrok iste. Za utvrđivanje toga, trebalo bi planirati prospektivna istraživanja koja bi djecu pratila od rođenja do razvoja i dijagnoze bolesti. Bez obzira na to, činjenica je da je N-glikozilacija IgA, kao i drugih proteina plazme, snažno povezana s nastankom, razvojem i progresijom T1DM što zahtijeva daljnja istraživanja ove tematike.



## 5. ZAKLJUČCI

Analiza N-glikanskog profila imunoglobulina A (IgA) izoliranog iz plazme djece i adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1 (T1DM) i njihove zdrave braće i sestara pokazala je statistički značajnu razliku u glikozilaciji u jednoj glikanskoj skupini (GP2). Promatranjem kompleksnih svojstava primijećena je razlika u visoko razgranatim, trisijaliniziranim, trigalaktoziliranim i oligomanoznim glikanima, što je u skladu s prethodnim istraživanjima na glikozilaciji proteina plazme i imunoglobulina G u T1DM.

Promjena u udjelu navedenih glikanskih skupina u ukupnom glikanskom profilu upućuje na njihovu ulogu u razvoju same bolesti, što je u ovom radu dodatno potvrđeno i na IgA koji do sada nije bio analiziran u kontekstu T1DM. Budući da su ispitanici u ovom istraživanju u bliskom genskom srodstvu, a šećernu su bolest razvila samo neka djeca, može se pretpostaviti da se zaista radi o promjeni u procesima koji nisu zapisani u genima i koje ovise o drugim čimbenicima, kao što je glikozilacija. Dobivene spoznaje o razlikama u glikozilaciji zdrave djece i djece kojoj je dijagnosticirana T1DM mogu se potencijalno iskoristiti za razvoj dijagnostičkog i/ili prognostičkog biomarkera koji bi se upotrebljavao i u kliničkoj praksi za probir djece na rizik za razvoj T1DM.

## 6. ZAHVALE

Zahvaljujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici.

Zahvaljujem Mateju Nemčiću, mag. biol. mol., na velikom strpljenju, pomoći i društvu u labosu.

Zahvaljujem Domagoju Kiferu, mag. pharm., na pomoći u snalaženju u šumi podataka. Hvala dr. sc. Tomi Keseru na vrijednim savjetima, kao i ostalim članovima Zavoda na ugodnoj radnoj atmosferi.

Konačno, zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i mom dečku što su mi uvijek bili i ostaju potpora i vjetar u leđa kada mi je najteže.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Alshiekh, S., Larsson, H. E., Ivarsson, S.-A. & Lernmark, Å. Autoimmune Type 1 Diabetes. in *Textbook of Diabetes* (eds. Holt, R. I. G., Cockram, C. S., Flyvbjerg, A. & Goldstein, B. J.) 143–153 (John Wiley & Sons, Ltd, 2016). doi:10.1002/9781118924853.ch10.
2. Metelko, Ž., Pavlič-Renar, I., Poljičanin, T., Szivovitz, L. & Turek, S. Prevalence of diabetes mellitus in Croatia. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **81**, 263–267 (2008).
3. Poljičanin, T. & Metelko, Ž. Epidemiologija šećerne bolesti u Hrvatskoj i svijetu
4. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047–1053 (2004).
5. The Lancet. Type 1 diabetes—progress and prospects. *The Lancet* **383**, 2 (2014).
6. Nerup, J. *et al.* HL-A ANTIGENS AND DIABETES MELLITUS. *The Lancet* **304**, 864–866 (1974).
7. Todd, J. A., Bell, J. I. & McDevitt, H. O. HLA-DQ $\beta$  gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **329**, 599–604 (1987).
8. Dotta, F. & Sebastiani, G. Enteroviral Infections and Development of Type 1 Diabetes: The Brothers Karamazov Within the CVBs. *Diabetes* **63**, 384–386 (2014).
9. Dahlquist, G. G., Pundziūtė-Lyckå, A., Nyström, L., & Swedish Childhood Diabetes Study and the Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS) Groups. Birthweight and risk of type 1 diabetes in children and young adults: a population-based register study. *Diabetologia* **48**, 1114–1117 (2005).
10. Knip, M. *et al.* Hydrolyzed Infant Formula and Early  $\beta$ -Cell Autoimmunity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **311**, 2279 (2014).
11. Snedeker, S. M. & Hay, A. G. Do Interactions Between Gut Ecology and Environmental Chemicals Contribute to Obesity and Diabetes? *Environ. Health Perspect.* **120**, 332–339 (2012).
12. the TEDDY Study Group *et al.* The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia* **58**, 980–987 (2015).
13. Ziegler, A. G. *et al.* Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children. *JAMA* **309**, 2473 (2013).

14. Redondo, M. J. *et al.* Types of pediatric diabetes mellitus defined by anti-islet autoimmunity and random C-peptide at diagnosis: Forms of pediatric diabetes. *Pediatr. Diabetes* **14**, 333–340 (2013).
15. Pinkse, G. G. M. *et al.* Autoreactive CD8 T cells associated with cell destruction in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 18425–18430 (2005).
16. for the Diabetes Prediction in Skåne (DiPiS) Study Group *et al.* Cord blood islet autoantibodies and seasonal association with the type 1 diabetes high-risk genotype. *J. Perinatol.* **28**, 211–217 (2008).
17. Bluestone, J. A., Herold, K. & Eisenbarth, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **464**, 1293–1300 (2010).
18. Streisand, R. & Monaghan, M. Young Children with Type 1 Diabetes: Challenges, Research, and Future Directions. *Curr. Diab. Rep.* **14**, 520 (2014).
19. Klein, R. Relation of Glycemic Control to Diabetic Microvascular Complications in Diabetes Mellitus. *Ann. Intern. Med.* **124**, 90 (1996).
20. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **329**, 977–986 (1993).
21. Lee, J. J., Thompson, M. J., Usher-Smith, J. A., Koshiaris, C. & Van den Bruel, A. Opportunities for earlier diagnosis of type 1 diabetes in children: A case-control study using routinely collected primary care records. *Prim. Care Diabetes* **12**, 254–264 (2018).
22. King, H., Aubert, R. E. & Herman, W. H. Global Burden of Diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* **21**, 1414–1431 (1998).
23. Keser, T. *et al.* Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* **60**, 2352–2360 (2017).
24. Rudman, N., Gornik, O. & Lauc, G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Lett.* **593**, 1598–1615 (2019).
25. Jaeken, J. Glycosylation and its Disorders: General Overview☆. in *Reference Module in Biomedical Sciences* B9780128012383046000 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.04632-8.
26. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97–130 (1993).

27. Opdenakker, G., Rudd, P. M., Ponting, C. P. & Dwek, R. A. Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.* **7**, 1330–1337 (1993).
28. Scott, K., Gadomski, T., Kozicz, T. & Morava, E. Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *J. Inherit. Metab. Dis.* **37**, 609–617 (2014).
29. Hennet, T. & Cabalzar, J. Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycocalyx dysfunction. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 377–384 (2015).
30. Gornik, O. & Lauc, G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis. Markers* **25**, 267–278 (2008).
31. *Essentials of Glycobiology*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
32. Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 448–462 (2012).
33. Hülsmeier, A. J., Paesold-Burda, P. & Hennet, T. N-Glycosylation Site Occupancy in Serum Glycoproteins Using Multiple Reaction Monitoring Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 2132–2138 (2007).
34. Huffman, J. E. *et al.* Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and MGAT5 are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 5000–5011 (2011).
35. Gornik, O. *et al.* Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* **19**, 1547–1553 (2009).
36. Dall’Olio, F. *et al.* N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Res. Rev.* **12**, 685–698 (2013).
37. Krištić, J. *et al.* Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J. Gerontol. Ser. A* **69**, 779–789 (2014).
38. Turner, G. A. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin. Chim. Acta* **208**, 149–171 (1992).
39. Steffen, U. *et al.* IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nat. Commun.* **11**, 120 (2020).
40. Hwang, H. *et al.* In-depth analysis of site-specific N-glycosylation in vitronectin from human plasma by tandem mass spectrometry with immunoprecipitation. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 7999–8011 (2014).
41. Zhu, J. *et al.* Analysis of Serum Haptoglobin Fucosylation in Hepatocellular Carcinoma and Liver Cirrhosis of Different Etiologies. *J. Proteome Res.* **13**, 2986–2997 (2014).

42. Garner, B. *et al.* Characterization of human apolipoprotein B100 oligosaccharides in LDL subfractions derived from normal and hyperlipidemic plasma: deficiency of -N-acetylneuraminyl-lactosyl-ceramide in light and small dense LDL particles. *Glycobiology* **11**, 791–802 (2001).
43. McMillan, D. E. Elevation of Glycoprotein Fucose in Diabetes Mellitus. *Diabetes* **21**, 863–871 (1972).
44. Ohtsubo, K. *et al.* Dietary and Genetic Control of Glucose Transporter 2 Glycosylation Promotes Insulin Secretion in Suppressing Diabetes. *Cell* **123**, 1307–1321 (2005).
45. Rahbar, S. The Discovery of Glycated Hemoglobin: A Major Event in the Study of Nonenzymatic Chemistry in Biological Systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 9–19 (2005).
46. McClain, D. A. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J. Diabetes Complications* **16**, 72–80 (2002).
47. Marshall, S., Bacote, V. & Traxinger, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **266**, 4706–4712 (1991).
48. Lau, K. S. *et al.* Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell* **129**, 123–134 (2007).
49. Bermingham, M. L. *et al.* N-Glycan Profile and Kidney Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **41**, 79–87 (2018).
50. Yoo, E. M. & Morrison, S. L. IgA: An immune glycoprotein. *Clin. Immunol.* **116**, 3–10 (2005).
51. Field, M. C., Dwek, R. A., Edge, C. J. & Rademacher, T. W. O-Linked oligosaccharides from human serum immunoglobulin A1. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 1034–1035 (1989).
52. Novak, J. *et al.* Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1. *Mol. Immunol.* **37**, 1047–1056 (2000).
53. Mattu, T. S. *et al.* The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of N-Glycosylation on Fc $\alpha$  Receptor Interactions. *J. Biol. Chem.* **273**, 2260–2272 (1998).

54. Yazdani, R., Azizi, G., Abolhassani, H. & Aghamohammadi, A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand. J. Immunol.* **85**, 3–12 (2017).
55. Svensson, J. *et al.* High levels of immunoglobulin E and a continuous increase in immunoglobulin G and immunoglobulin M by age in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Hum. Immunol.* **73**, 17–25 (2012).
56. Ali, B. A.-M., Sayed, M. A., Moness, H. M. & Mohammed, M. Assessment of serum levels of immunoglobulin A and immunoglobulin G in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus (T1D). *Diabetes Mellit.* **21**, 5 (2017).
57. Sayarifard, F. *et al.* Evaluation of serum IgA levels in Iranian patients with type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* **49**, 131–135 (2012).
58. Dzidic, M. *et al.* Aberrant IgA responses to the gut microbiota during infancy precede asthma and allergy development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 1017-1025.e14 (2017).
59. Huang, J. *et al.* Altered Systemic and Intestinal IgA Immune Responses in Individuals With Type 1 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **105**, e4616–e4625 (2020).
60. Svensson, J. *et al.* Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes. *Clin. Epidemiol.* **Volume 8**, 679–683 (2016).
61. Sorensen, J. S. *et al.* Residual  $\beta$ -Cell Function and the Insulin-Like Growth Factor System in Danish Children and Adolescents With Type 1 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 1053–1061 (2015).
62. Pučić, M. *et al.* High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG– Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.010090 (2011).
63. Knežević, A. *et al.* Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *J. Proteome Res.* **8**, 694–701 (2009).
64. Scallon, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N. & Raju, T. S. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol.* **44**, 1524–1534 (2007).
65. Malhotra, R. *et al.* Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat. Med.* **1**, 237–243 (1995).

66. Hansen, T. K. *et al.* Elevated Levels of Mannan-Binding Lectin in Patients with Type 1 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 4857–4861 (2003).
67. Jenny, L., Ajjan, R., King, R., Thiel, S. & Schroeder, V. Plasma levels of mannan-binding lectin-associated serine proteases MASP-1 and MASP-2 are elevated in type 1 diabetes and correlate with glycaemic control: MASPs in diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **180**, 227–232 (2015).
68. Lee, R. T. *et al.* Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannanose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins. *J. Biol. Chem.* **266**, 4810–4815 (1991).
69. The TEDDY Study Group *et al.* Complement gene variants in relation to autoantibodies to beta cell specific antigens and type 1 diabetes in the TEDDY Study. *Sci. Rep.* **6**, 27887 (2016).



## 8. SAŽETAK

Sofia Shkunnikova

### **N-glikozilacija imunoglobulina A u šećernoj bolesti tipa 1 kod djece**

Šećerna bolest tipa 1 (T1DM), kronična autoimuna bolest, predstavlja veliki javnozdravstveni problem koji pogađa sve veću populaciju. Određen je kako genetskom predispozicijom, tako i okolišnim čimbenicima. Rana dijagnostika, pogotovo kod djece i adolescenata, omogućuje pravovremeno liječenje, adekvatno praćenje i kontrolu bolesti, kao i uvođenje terapije i prilagodbe životnog stila bolesnika.

Glikozilacija je ko- i posttranslacijska modifikacija koja se intenzivno istražuje zbog velikog prognostičkog i dijagnostičkog potencijala. Brojne studije pokazale su da je glikozilacija plazmatskih proteina promijenjena kod različitih bolesti, a pogotovo upalnih stanja. Također, pokazano je da se ove promjene javljaju i u šećernoj bolesti tipa 1 te da su prisutne u njenom ranom tijeku.

U ovom je radu tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti koja se bazira na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC) analizirana N-glikozilacija imunoglobulina A u uzorcima plazme djece i adolescenata s T1DM. Ispitanici su uzorkovani unutar tri mjeseca od postavljanja dijagnoze. Statistički značajnom promjenom kod bolesne djece, u odnosu na zdravu braću i sestre, pokazalo se smanjenje udjela glikanske skupine 2 (GP2) koja sadrži visokomanozni glikan s pet manosa. Detaljnijim proučavanjem deriviranih svojstava uočeno je smanjenje udjela glikana s visokim grananjem, trigalaktozilacijom i trisijalinizacijom. Povećan je udio oligomanoznih glikana što odgovara promjenama na drugim proteinima plazme i na imunoglobulinu G.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da glikozilacija IgA igra ulogu u ranom tijeku nastanka šećerne bolesti te da bi bilo korisno ispitati njenu prediktivnu vrijednost za razvoj same bolesti. Postojanje biljega za pravovremeni probir djece s povećanim rizikom za T1DM omogućilo bi pravovremenu intervenciju, a također bi pružilo i mogućnost pokušaja sprečavanja razvoja bolesti.

**KLJUČNE RIJEČI:** N-glikozilacija, imunoglobulin A, HILIC-UPLC, šećerna bolest tipa

## 9. SUMMARY

Sofia Shkunnikova

### **N-glycosylation of immunoglobulin A in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus**

Type 1 diabetes (T1DM), a chronic autoimmune disease, is a major public health problem affecting ever widening population. It is determined by both genetic predisposition and environmental factors. Early diagnosis, especially in children and adolescents, enables timely start of treatment, adequate monitoring, and control of the disease, as well as the introduction of therapy and adjustment of the patient's lifestyle.

Glycosylation is a co- and posttranslational modification that is intensively investigated due to its great prognostic and diagnostic potential. Numerous studies have revealed changes in the plasma glycosylation of various diseases, especially inflammatory conditions. Also, an association between changes in the plasma glycosylation profile of plasma proteins in patients diagnosed with T1DM has been demonstrated.

In this work, N-glycosylation of immunoglobulin A in plasma samples of children and adolescents with T1DM was analyzed by ultra performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions (HILIC-UPLC). Subjects were sampled within three months of diagnosis. A statistically significant change in children with T1DM, compared to their healthy siblings, was shown to be a decrease in the proportion of glycan group 2 (GP2) containing high mannose glycan with five mannoses. A more detailed study of the derived traits showed an increased proportion of glycans with high branching, trigalactosylated glycans and trisialylated glycans. An increase in high-mannose glycans was also observed which corresponds to changes in other plasma proteins and immunoglobulin G.

The results of this study show that glycosylation of IgA plays a role in the early course of diabetes and that it would be useful to examine its predictive value for the development of the disease itself. The existence of markers for the timely screening of children at increased risk for T1DM would allow for adequate intervention and would also provide an opportunity to try to prevent the development of the disease.

**KEY WORDS:** N-glycosylation, immunoglobulin A, HILIC-UPLC, type 1 diabetes

## 10. ŽIVOTOPIS

Sofia Shkunnikova rođena je 29. lipnja 1998. godine u Voronežu, Ruska Federacija. Završila je Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju u Rijeci, a trenutno studira na 4. godini Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Tijekom studiranja aktivno se angažira u znanstvenom radu. U akademskoj godini 2018./19. volontira na Zavodu za analitičku kemiju gdje ujedno radi i kao demonstrator na kolegiju Analitička kemija 2. Od akademske godine 2020./21. volontira na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju gdje je ovaj rad izrađen. Uz to, potpredsjednica je Studentskog zbora FBF-a i aktivna članica Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA). Dobitnica je rektorove nagrade (nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici, Projekt *CinePharm*), dekanove nagrade za studentski rad „Uloga supstituenata u Hofmann-Löffler-Freytagovoj sintezi nikotina: kvantno-kemijska studija“, te dvije pohvalnice dekanice za najbolji prosjek na studiju.

### ZNANSTVENI RADOVI U ČASOPISIMA

**Shkunnikova, Sofia**; Zipse, Hendrik; Šakić, Davor:

Role of substituents in the Hofmann-Löffler-Freytag reaction. A quantum-chemical case study on nicotine synthesis.

*Organic & Biomolecular Chemistry*. **2021**, 19, 854-865; doi:10.1039/D0OB02187C