

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Kristina Novak

N-GLIKOZILACIJA STANIČNE MEMBRANE TROMBOCITA

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013./2014.

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU

2-AB	2-aminobenzamid
4N, 28N	poliploidi s 4 tj. 28 setova kromosoma
Å	Ångstrom, 10^{-10} metara
ACN	acetonitril
ADP	adenozin difosfat
AF	amonij formijat
Asn	asparagin
BSS	Bernard-Soulier sindrom
DMS	demarkacijski membranski sustav
DNA	engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
EB	engl. <i>Equilibration buffer</i> , ravnotežni pufer
ER	endoplazmatski retikul
EU	engl. <i>Emission Units</i> , jedinice emisije
fL	femtolitar
GA	Golgijev aparat
GMP 140	engl. <i>Granule Membrane Protein 140</i> , integrin
GP	glikoprotein
ICAM 2	engl. <i>Intercellular adhesion molecule 2</i> , transmembranski glikoprotein
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
inHg	<i>inch</i> žive, mjerna jedinica za tlak
kDa	kilodalton
M	mol/l
mOsm	miliosmol
nm	nanometar
PAR	engl. <i>Protease-activated receptor</i> , proteazom aktivirani receptori
PB	2-pikolin boran
PBS	engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> , pufer
PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i> , faktor rasta podrijetlom iz trombocita

PECAM-1	engl. <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i> , receptor
PF	engl. <i>Platelet factor</i> , trombocitni faktor
PLL	engl. <i>Poly-L-Lysine</i>
PRP	engl. <i>Platelet rich plasma</i> , plazma bogata trombocitima
PT-VWD	engl. <i>platelet-type von Willebrand disease</i> , bolest karakterizirana hiperagregacijom trombocita
rpm	engl. <i>revolution per minute</i> , broj okretaja u minuti
SDS	engl. <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> , natrijev dodecil sulfat
Ser	serin
TGF- β	engl. <i>Transforming Growth Factor-β</i> , transformirajući faktor rasta β
Thr	treonin
TXA2	tromboksan A2
UPLC	engl. <i>Ultra performance liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija velike djelotvornosti
UV/VIS	ultraljubičasta/vidljiva svjetlost
VNTR	engl. <i>Variable number of tandem repeats</i> , promjenjivi broj uzastopnih ponavljanja
vWF	Von Willebrandov faktor
μ l	mikrolitar
μ m	mikrometar

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Trombociti i trombocitopoeza.....	1
1.2. Glikokaliks trombocita.....	3
1.3. Glikozilacija i membranski glikoproteini.....	3
1.4. Uloga glikoproteina u hemostazi.....	6
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	9
3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Kemikalije i enzimi.....	10
3.2. Priprema pufera.....	11
3.3. Sinteza poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom	12
3.4. Izolacija trombocita	13
3.5. Priprema zrnaca za analizu.....	14
3.6. Priprema trombocita za izolaciju proteina stanične membrane.....	14
3.7. Dodavanje PLL zrnaca trombocitima.....	15
3.8. Pročišćavanje glikoproteina stanične membrane trombocita	16
3.9. Sušenje uzoraka.....	16
3.10. Deglikozilacija glikoproteina stanične membrane trombocita.....	17
3.11. Obilježavanje dobivenih N-glikana 2- aminobenzamidom.....	18
3.12. Određivanje profila N-glikana na UPLC-u	19
4. REZULTATI.....	21
4.1. Sinteza poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom	21
4.2. Izolacija trombocita	21
4.3. Izolacija, pročišćavanje i određivanje koncentracije glikoproteina s membrana trombocita	23

4.4. Deglikozilacija glikoproteina enzimom PNGase F, obilježavanje dobivenih N-glikana 2-aminobenzamidom i određivanje N-glikana na UPLC-u.....	25
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČCI.....	30
7. ZAHVALE.....	31
8. POPIS LITERATURE.....	32
9. SAŽETAK.....	36
10. SUMMARY.....	37

1.UVOD

1.1 Trombociti i trombocitopoeza

Trombociti, jedni od ključnih sastavnica ljudske krvi, imaju mnogo važnih funkcija. Najvažnija uloga im je formiranje mehaničkog čepa tijekom normalnog hemostatskog odgovora na ozljedu krvne žile. Površina trombocita sadrži različite receptore bitne za njihovu aktivaciju pod utjecajem različitih stimulansa (npr. ADP, serotonin, von Willebrandov faktor). ⁽¹⁾

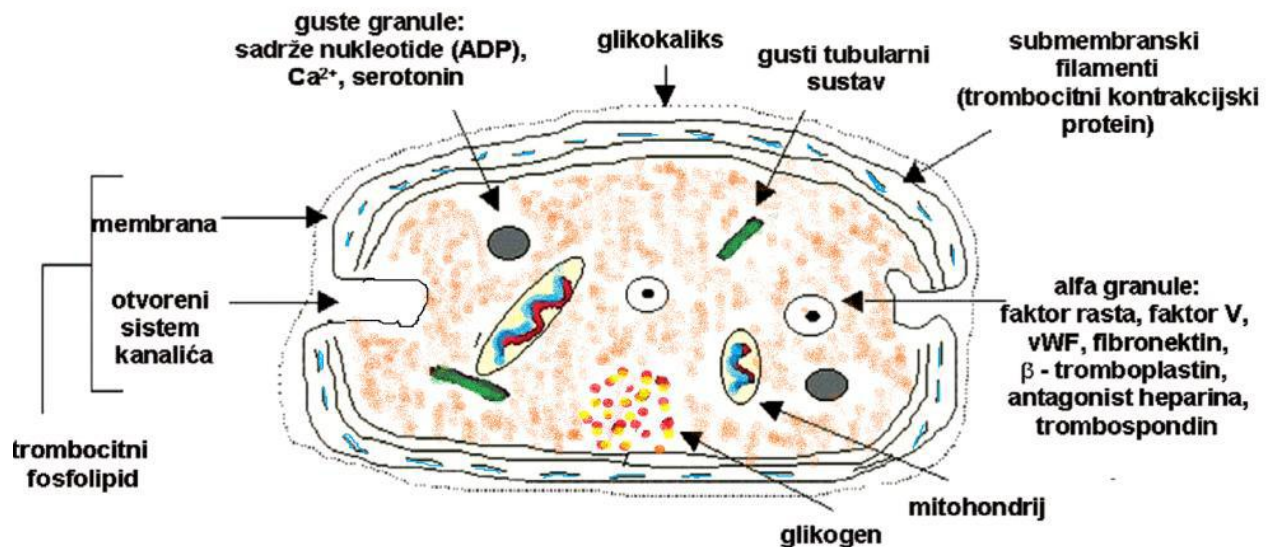
Trombociti nastaju u koštanoj srži fragmentiranjem citoplazme zrelih megakariocita, koji nastaju iz nezrelih hematopoetskih stanica. ⁽²⁾

Megakariociti su stanice najviše zastupljene u koštanoj srži, ali nalaze se i u plućima i perifernoj krvi. U koštanoj srži čine manje od 1% mijeloidnih stanica, dok se u fetalnom razdoblju razvijaju u jetri iz pluripotentne matične stanice. Regulator trombocitopoeze je citokin trombopoetin uz sudjelovanje interleukina: IL-3, IL-6 i IL-11. ⁽³⁾

Megakariocitopoezom od nezrelih stanica nastaju zreli megakariociti. U stadiju nezrelih stanica dolazi do povećanja broja megakariocita i njihove proliferacije kao odgovor na mitotičke faktore rasta. Prijelazni tip stanica od nezrelih do zrelijih postmitotičkih su promegakarioblasti. Zreli megakariociti nemaju sposobnost proliferacije, ali imaju sposobnost povećane sinteze DNA bez diobe. To rezultira poliploidijom sa sadržajem DNA od 4N do 128N u svakom megakariocitu i mnogo većim volumenom u odnosu na druge stanice koštane srži. Jedan megakariocit stvara 2000 do 3000 trombocita. Tijekom sazrijevanja, membrana megakariocita proliferira pa nastaje tubularna membranska mreža nazvana demarkacijski membranski sustav (DMS). Smatra se da dijeli citoplazmu na mala polja gdje se sastavljaju i zatim oslobađaju trombociti. Trombociti koji nastaju iz citoplazme megakariocita stvaranjem izduženih tankih pseudopodija, nazivaju se protrombocitima. ^(2,3)

Od diferencijacije matične hematopoetske stanice do stvaranja zrelih trombocita potrebno je u prosjeku 10 dana. Normalan broj trombocita varira od 150×10^9 do 350×10^9 po litri krvi.

Diskoidnog su oblika, promjera od 1 do 2 μm i volumena 5-6 fL. Ne sadrže jezgru, endoplazmatski retikulum ni Golgijev aparat. Za obavljanje svojih funkcija ovise o proteinima sintetiziranim u megakariocitima. Vanjska membrana trombocita obavijena je glikokaliksom koji sadrži plazmatske proteine i faktore koagulacije (faktor I, V, VII, XII, XIII), fibrinolize i komplementa. Neke od tih molekula adsorbirane su na površini, a neke su dio membrane. Taj glikoproteinski omotač ima važnu ulogu u adheziji i agregaciji trombocita. Ispod glikokaliksa nalazi se negativno nabijena membrana, a ispod nje su filamenti i tubuli koji čine skelet trombocita. Invaginacijom stanične membrane, u trombocitu se stvara otvoreni sustav kanalića, pri čemu nastaje velika površina preko koje se adsorbiraju specifični faktori zgrušavanja, a sadržaj trombocitnih granula ima bolju vezu s okolinom. Unutar trombocita nalaze se Alfa granule koje sadrže adhezivne proteine (fibrinogen, fibronektin, vWF, vironektin, trombospondin), faktore rasta (PDGF, TGF- β , PF 4) i faktore zgrušavanja (faktor V, XI, fibrinogen, protein S) te guste granule koje sadrže ADP i serotonin (Slika 1). ^(1,2)



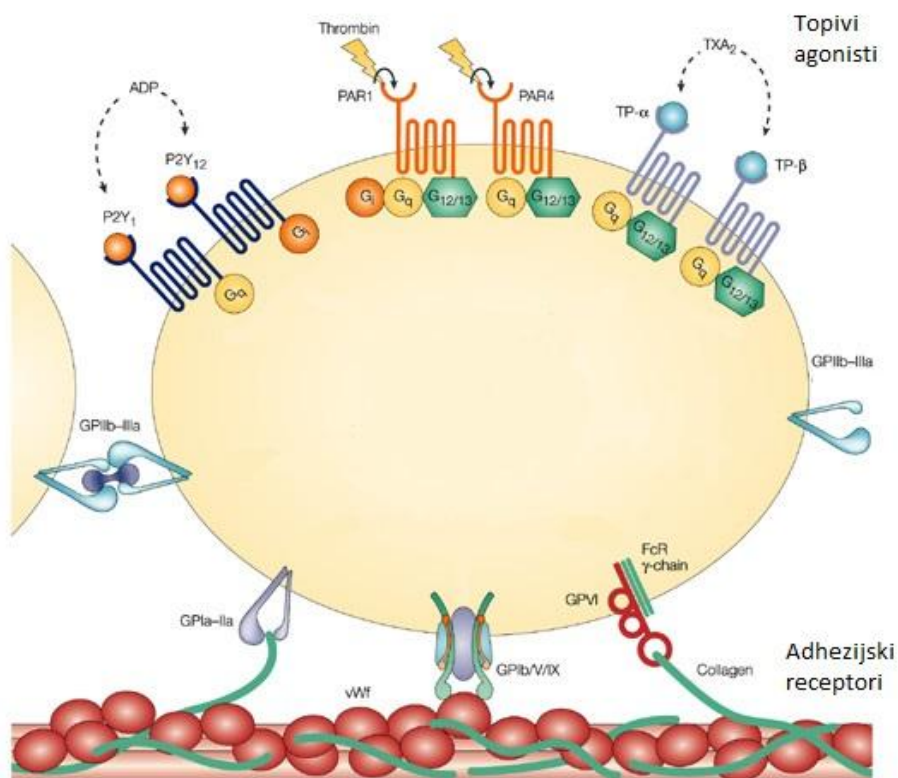
Slika 1. Shematski prikaz strukture trombocita (slika preuzeta iz Labar, Hauptmann, 2007.)

1.2. Glikokaliks trombocita

Zbog važnosti glikana, ugljikohidrata kovalentno vezanih na proteine i fosfolipide, u posljednje vrijeme došlo je do naglog razvoja glikomike. Poznavanje glikozilacije stanične membrane trombocita bilo bi značajno za istraživanja poremećaja krvarenja, ali i predviđanja potencijalnih novih funkcija u upali i imunološkom sustavu (kod virusnih i bakterijskih infekcija) te Alzheimerovoj bolesti.^(4, 5, 6, 7) Osim u hemostazi, sve se više govori o drugim ulogama trombocita kao što su upala, obrana od mikroorganizama, rast i metastaziranje tumora te angiogeneza. Tome u prilog govori i velik broj receptora koji ne sudjeluju u hemostazi te činjenica da je oko 10×10^9 trombocita po litri krvi, od njih 250×10^9 , dovoljno za sprečavanje krvarenja.⁽⁸⁾ Kao što je već spomenuto, površina stanice pokrivena je glikanskim slojem, glikokaliksom, kojeg čine oligosaharidi glikolipida i glikoproteina. Glikokaliks služi za zaštitu stanice i za međustanične interakcije.⁽⁹⁾ Kompleksne interakcije trombocita s drugim krvnim stanicama i vaskularnim endotelom preko selektina i integrina imaju ulogu i u bolestima kao što su ateroskleroza, sepsa, reumatoidni artritis, i karcinom.⁽⁷⁾ Proučavanjem trombocita pod elektronskim mikroskopom pokazalo se da je debljina glikokaliksa 150-200 Å.⁽¹⁰⁾

1.3. Glikozilacija i membranski glikoproteini

Membranski glikoproteini trombocita djeluju kao receptori i bitni su za adheziju na subendotelni matriks i međusobnu interakciju trombocita (Slika 2).⁽⁸⁾ Glikani se dijele na N-vezane i O-vezane (Slika 3).⁽¹¹⁾ O-glikani su potrebni za normalnu biogenezu trombocita, ali i za ekspresiju i funkciju njihovih glikoproteina pa promjene u O-glikozilaciji mogu dovesti do promjena u hemostazi.⁽¹²⁾



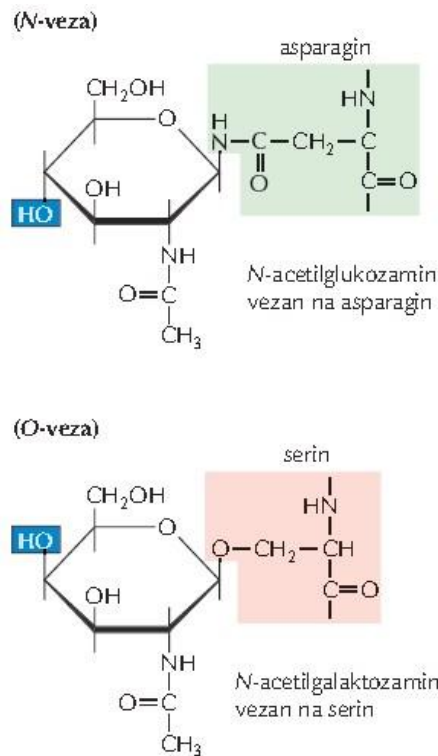
Nature Reviews | Drug Discovery

Slika 2. Prikaz receptora na površini trombocita i njihovih liganada. S unutarnje strane stanične membrane prikazani su G-proteini koji su dio signalnoga puta. (slika preuzeta iz www.nature.com)

Glikozilacija proteina započinje u endoplazmatskom retikulumu (ER) i nastavlja se u Golgijevom aparatu za N-vezane glikane. O-glikozilacija se odvija samo u Golgijevom aparatu dodavanjem jednog po jednog šećera. Kod O-vezanih glikoproteina, N-acetilgalaktozamin je vezan na kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina. Kod N-vezanih glikana, N-acetilglukozamin se veže na dušikov atom bočnog ogranka asparaginskog ostatka proteina. Prvi korak N-glikozilacije je prijenos osnovnog oligosaharida izgrađenog od 14 šećernih ostataka (2 N-acetilglukozamina, 3 glukoze i 9 manoz), koji je s ER povezan preko lipidnog nosača dolikol-fosfata, na asparaginski ostatak unutar slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr (X je bilo koja aminokiselina osim prolina). Nakon toga, glikozilirani

proteini se u ER-u modificiraju uklanjanjem tri glukoze i jedne manoze.⁽⁹⁾ Zatim se glikoproteini prenose iz ER do Golgijevog aparata gdje se ugljikohidrati dorađuju. Enzimi odgovorni za stvaranje glikozidnih veza su glikoziltransferaze.⁽¹¹⁾ Postoji više od 200 glikoziltransferaza u ER i Golgijevom aparatu. Trombociti ne sadrže te organele, ali imaju β 4-galaktoziltransferazu 1 koja veže galaktozu na β -1,4 položaj N-acetilglukozamina koji se nalazi na GPIIb α podjedinici receptora za vWF. Elementi Golgijevog aparata s glikoziltransferazama pakiraju se u vezikule i prenose od megakariocita do trombocita. Aktivacijom trombocita dolazi do aktivacije glikoziltransferaza i egzogene konjugacije sijalinske kiseline na plazmatske proteine. Trombociti sadrže i dovoljne količine šećernih nukleotida potrebne za reakcije glikozilacije.⁽¹⁴⁾ Biosinteza oligosaharidnih lanaca na glikokonjugatima završava dodatkom sijalinske kiseline što sprječava produljenje lanaca. Zbog pozicije i negativnog naboja, sijalinska kiselina sudjeluje u brojnim interakcijama sa drugim stanicama i izvanstaničnim matriksom.⁽¹⁵⁾ Trombociti imaju najkraći životni vijek u odnosu na ostale krvne stanice i najteže se čuvaju. Ne podnose niske temperature (4°C) pa se tako ohlađeni brzo eliminiraju iz cirkulacije nakon transfuzije. Zbog toga se skladište na temperaturi od 22°C tijekom 5 dana nakon čega više nisu pogodni za transfuziju. Trombociti skladišteni na niskim temperaturama, osim što gube karakteristični diskoidni oblik, gube sijalinsku kiselinu s glikoproteina zbog oslobađanja sijalidaza nakon aktivacije trombocita.⁽¹⁶⁾

¹⁷⁾ Na taj se način β -galaktoza s glikana izlaže asijaloglikoproteinskim receptorima na makrofagima i hepatocitima koji odstranjuju trombocite iz cirkulacije.⁽¹⁶⁾ Deficit sijaliltransferaze dovodi do trombocitopenije. Sijalinska kiselina je bitna i kod sazrijevanje trombocita.⁽¹⁸⁾



Slika 3. Prikaz N- i O- glikozidne veze (slika preuzeta iz Cooper, Hausman, 2004.)

Osim glikoproteina na trombocitnoj membrani nalaze se gangliozi. To su glikosfingolipidi koji sadrže sialinsku kiselinu.⁽¹⁹⁾ Građeni su od aminoalkohola sfingozina, masne kiseline i oligosaharida koji sadrži sialinsku kiselinu.⁽²⁰⁾ Predstavljaju 0.5% trombocitnih lipida. Gangliozid I sadrži glukozu, galaktozu i sialinsku kiselinu u molarnom odnosu 1:1:1. Gangliozid II sastavljen je od glukoze, galaktoze, sialinske kiseline i heksozamina (glukozamin i galaktozamin) u molarnom odnosu 1:2:1:1. Gangliozid III sadržava disijalosilaktozil ceramid. Orijentacija i specifična distribucija membranskih glikolipida je bitna za svojstva površine tih stanica.⁽¹⁹⁾

1.4. Uloga glikoproteina u hemostazi

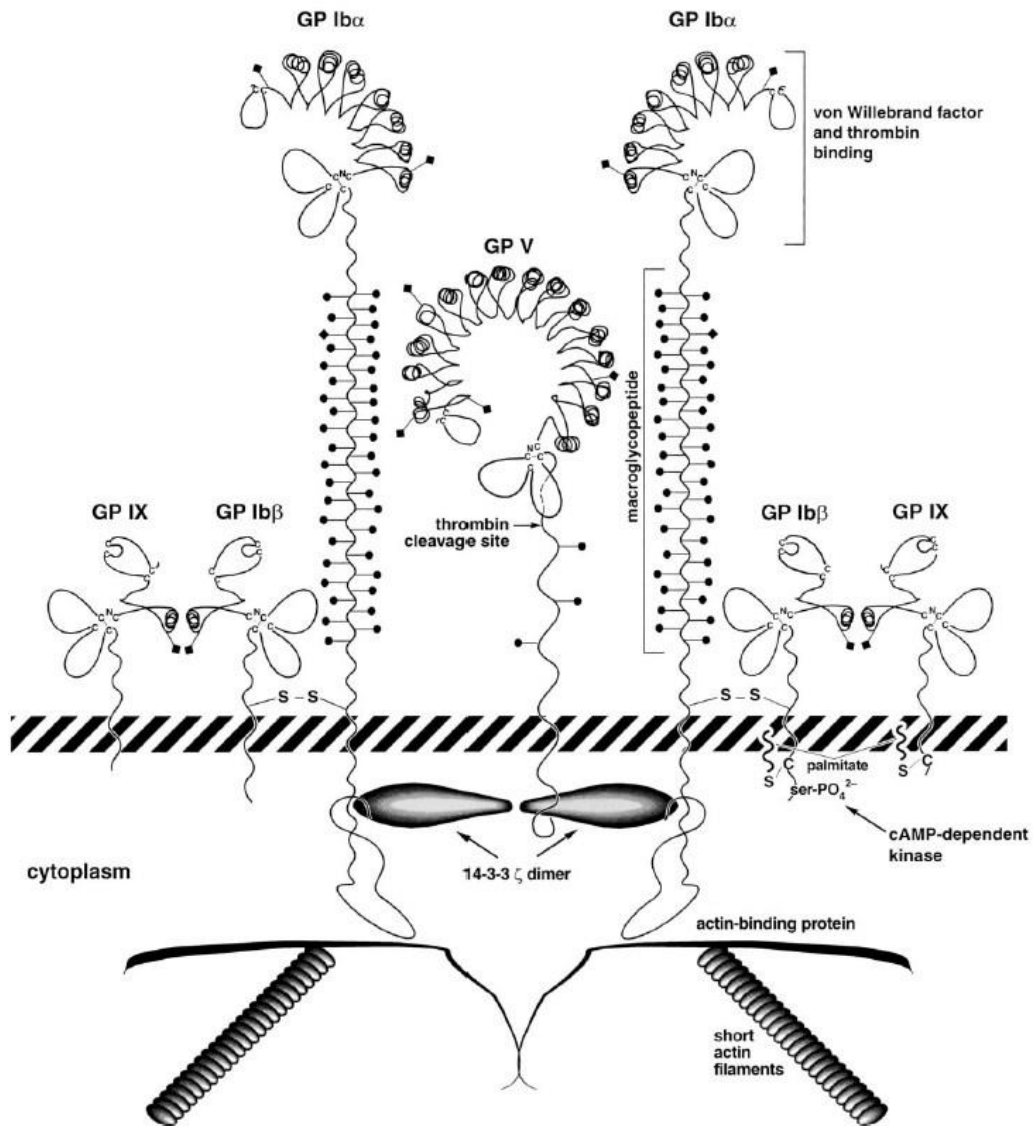
Trombociti se vežu na velik broj komponenata izvanstaničnoga matriksa vezivnoga tkiva preko membranskih glikoproteina. Postoji mnogo različitih glikoproteinskih receptora uključujući selektine (GMP 140, P-selektin), integrine (GP I, GP II, GP III, GP IV, GP V),

imunoglobuline, receptore za ADP (P2Y₁₂, P2Y₁, P2X₁), kolagen, adrenalin, serotonin, trombin (PAR 1, PAR4), tromboksan A₂.^(1, 8)

Integrini su najveća skupina adhezivnih molekula na većini stanica. Na trombocitima se nalazi šest različitih integrina: $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha IIb\beta 3$ i $\alpha v\beta 3$. Mnogi od njih postoje kao nekovalentno povezani heteromeri.⁽⁸⁾ GP Ia/IIa ($\alpha 2\beta 1$) je najveći receptor za kolagen. Bitan je za čvrstu adheziju trombocita iz krvi na oštećeni endotel.^(21, 22) Integrin $\alpha v\beta 3$ je receptor za vitronektin, $\alpha 5\beta 1$ (GP Ic-IIa) za fibronektin, a $\alpha 6\beta 1$ za laminin.⁽⁸⁾ GP IIb-IIIa (integrin $\alpha IIb\beta 3$) sudjeluje u međusobnoj interakciji trombocita preko fibrinogena.⁽²³⁾

Kod oštećenog endotela trombociti su izloženi von Willebrandovom faktoru čiji receptor je GP Ib-IX-V kompleks. Struktura kompleksa je dobro proučena i ukazuje na važnost glikana za njegovu funkciju. Kompleks je esencijalan za adheziju trombocita u uvjetima visokog naprezanja. Taj inicijalni kontakt omogućuje vezanje trombocita na kolagen.^(8, 21) Druga funkcija mu je pospješivanje sposobnosti trombina da u niskim koncentracijama aktivira trombocite. Sastoji se od sedam transmembranskih polipeptidnih podjedinica: po dva GP Ib α , GP Ib β , GP IX i jedan GP V (Slika 4.). Sve pripadaju superporodici eng. *leucine-rich repeat* (LRR). GP Ib α sadrži jako glikozilirano područje, makroglikopeptid s O- vezanim sijaliziranim heksasaharidima na svakoj trećoj ili četvrtoj aminokiselini. Makroglikopeptid je duljine 45nm i razdvaja N- terminalnu domenu od domene za vezanje vWF. Izostanak ili defekt kompleksa uzrokuje bolest krvarenja, Bernard-Soulier sindrom (BSS). Nastaje zbog mutacija na genima koji kodiraju bilo koju komponentu kompleksa kao i mutacije koje ometaju posttranslacijske modifikacije, N- i O- glikozilaciju te ostale. Bolest je rijetka i karakterizira ju produženo vrijeme krvarenja, povećani trombociti i trombocitopenija. Prvi opisani polimorfizam kompleksa je polimorfizam koji zahvaća regiju makroglikopeptida (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR) rezultirajući različitim brojem ponavljanja 13 aminokiselina.⁽²⁴⁾ Različiti VNTR aleli povezani su s rizikom od koronarne bolesti srca.⁽²⁵⁾ Opisana je i delecija u genu za GP Ib α koja rezultira smanjenom glikozilacijom makroglikopeptida. Ta regija ima glikozilirane serinske i treoninske ostatke, a posttranslacijska modifikacija je bitna za funkciju

GP Ib-IX-V kompleksa. Smanjena glikozilacija može utjecati na konformaciju receptora jer ima bitnu ulogu u smatanju, stabilnosti proteina i vezanju na ligand. Delecija uzrokuje engl. *platelet-type von Willebrand disease* (PT-VWD) koju karakterizira veliki afinitet GP Ib-IX-V kompleksa za vWF, tj. hiperagregacija trombocita.⁽²⁶⁾



Slika 4. Shematski prikaz GP Ib-IX-V kompleksa. Kružići predstavljaju O-glikane, a rombovi N-glikane (slika preuzeta iz Lopez i sur, 1998.)

U imunoglobulinsku superporodicu receptora ubrajaju se GP VI, FcγRIIa, FcεRI, ICAM 2, PECAM-1. GP VI je drugi važan receptor za kolagen. FcγRIIa je receptor za IgG, a glikoprotein FcεRI za IgE. Glikoprotein ICAM 2 je važan za adheziju na neutrofile.⁽⁸⁾

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Trombociti imaju najvažniju ulogu u hemostazi, ali sudjeluju i u patofiziologiji bolesti kao što su ateroskleroza, reumatoidni artritis, upala, obrana od mikroorganizama, rast i metastaziranje tumora te angiogeneza. Međutim, te funkcije su im slabije istražene i postoji mnogo nepoznanica. Prijašnja istraživanja pokazuju da su im za obavljanje ovih raznih funkcija potrebni glikoproteinski receptori. Sastav, građa i funkcija glikana na membranskim proteinima stanične membrane trombocita nisu u potpunosti poznati. Poznavanje profila tih glikana u zdravoj populaciji kao i njihova usporedba s glikanima pacijenata koji boluju od raznih bolesti, uvelike bi doprinijelo istraživanjima glikana stanične membrane trombocita te jednog dana i liječenju spomenutih bolesti. Zato je cilj ovoga rada izolirati proteine iz stanične membrane trombocita te odrediti njihov profil N-vezanih glikana.

Specifični ciljevi:

- Izolirati trombocite iz uzorka humane krvi.
- Na poliakrilamidna zrnca vezati poli-L-lizin.
- Izolirati glikoproteine sa staničnih membrana trombocita pomoću poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom.
- Deglikozilirati pročišćene glikoproteine enzimom N-glikozidazom F, obilježiti ih 2-aminobenzamidom te analizirati tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti koja se bazira na hidrofилnim interakcijama.
- Analizirati dobivene kromatograme N-vezanih glikana stanične membrane trombocita.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i enzimi

- Tris, Sigma- Aldrich, SAD
- Tris- HCl, Sigma- Aldrich, SAD
- KCl, Calbiochem, SAD
- EDTA , Sigma Chemical Co. USA
- Na- citrat, Sigma- Aldrich Chemie, Njemačka
- Sukroza, Sigma- Aldrich, SAD
- NaN_3 , Sigma –Aldrich Chemie, Švicarska
- Bio Gel®- P-2 gel, Bio Rad Laboratories, SAD
- Piridin, Sigma Aldrich, SAD
- Piridin hidroklorid, Fluka, Švicarska
- EDC-HCl, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid, Sigma- Aldrich, Mađarska
- Poly-L-Lizin Mr= 52 000, Almanda Polymers, SAD
- Na_2CO_3 , Sigma- Aldrich, SAD
- Mravlja kiselina, Millipore Corporation, Njemačka
- $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, Fluka, Njemačka
- NH_4Cl , Sigma- Aldrich Chemie, Njemačka
- SDS, Invitrogen Life Technologies, Japan

- Igepal, Sigma, SAD
- Enzim PNGaza F, conc. 10 U/μl, Promega, SAD
- Octena kiselina, Merck, Njemačka
- DMSO, Sigma-Aldrich, Francuska
- PB, 2-pikolin boran Sigma- Aldrich, SAD
- 2-AB, 2-aminobenzamid Sigma-Aldrich, Njemačka
- ACN LC-MS Sigma-Aldrich, Njemačka

3.2. Priprema pufera

- 0.15M Tris, pH= 7.4
- Sukroza acetat pufer: 7 volumena 310mM otopine sukroze, 3 volumena 310mOsm otopine Na-acetata, pH= 5.2
- Sukroza acetat pufer s EDTA: 7 volumena 310mM otopine sukroze, 3 volumena 310mOsm otopine Na-acetata, 1mM otopina EDTA, pH= 5.2
- 75mM Tris-HCl, 100mM KCl, 12mM Na citrat, pH=6.3
- 10mM Tris-HCl, pH=7.4
- 10mM Tris-HCl uz 0.02% NaN₃, pH=7.4
- EB (engl. *Equilibration buffer*): 10mM mravlja kiselina podešena na pH=7.4 s (NH₄)HCO₃
- 1x PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*), pH=7.4

Svi se puferi čuvaju na 4°C.

3.3. Sinteza poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom

Poliakrilamidna zrnca obložena poli-L-lizinom služe za izolaciju staničnih membrana trombocita čime se smanjuju problemi koji se javljaju u drugim metodama izolacije membrana (kao što su ultracentrifugiranje homogenata stanica u gradijentu gustoće ili centrifugiranje membrana vezikula dobivenih osmotskom lizom). Nedostatak tih metoda je visok stupanj kontaminacije proteina stanične membrane s proteinima intracelularnih membrana.⁽²⁷⁾

Načelo metode je interakcija između negativno nabijenih plazmatskih membrana i pozitivno nabijenih polilizinskih lanaca vezanih na zrnca. Na taj način mogu se izolirati i membrane iz drugih stanica (eritrociti, HeLa stanice), a veličina zrnca i molekularna masa poli-L-lizina su određeni vrstom stanica koje se izoliraju. Interakcije moraju biti takve da nakon lize vezanih stanica, membrane ostaju vezane na zrcima. Ostale stanice koje nisu u interakciji s poliakrilamidnim zrcima se isperu. Nakon intenzivnog vorteksiranja i soniciranja, vezane stanice se liziraju pa na zrcima zaostaju samo membrane. Pomoću SDS-a izdvoje se membranski glikoproteini sa zrnaca i zaostaju u supernatantu koji postaje uzorak u daljnjem postupku.^{(27, 28, 29).}

Protokol sinteze poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom:

- 5 g Bio Gel-P-2 staviti u 125 ml destilirane vode i inkubirati 3 sata na 90°C u vodenoj kupelji Water Bath WB4 (BioSan, Latvija) uz periodično mješanje
- sonicirati 15 sekundi 50W sonikatorom UP100H (Hielscher Ultrasonics, Njemačka), centrifugirati 1 min na 30 g na uređaju Centrifuge MR 23i (Thermo Electron Corporation, Francuska), zrnca se istalože, supernatant se aspirira i baci
- zrnca 2x isprati destiliranom vodom, svaki put nakon dodatka vode centrifugirati 1 min na 30 g, supernatant baciti

- zrnima dodati 100ml 0.5 M otopine natrijeva karbonata i inkubirati na 60 °C 1.5 h uz neprestano mješanje u uređaju Stuart orbital incubator SI 500 (Stuart Equipment, UK) kako bi se površina zrnaca karboksilirala
- zrnca isprati 6x destiliranom vodom, svaki put nakon dodatka vode centrifugirati 1 min na 30 g, supernatant baciti, a supernatant kod zadnjeg ispiranja mora imati pH unutar 0.5 pH jedinica u odnosu na destiliranu vodu
- u 20 ml mokrih karboksiliranih zrnaca dodati 6 ml 1 M piridina koji sadrži 700 mg poli-L-lizina, sve inkubirati 1.5 h na 20 °C na 250 rpm (Stuart orbital incubator SI 500)
- otopini dodati 6 ml 1 M piridin hidroklorida da pH bude 5.5
- nakon 5 min dodati 4 porcije od 0.5 ml svježe pripremljenog 1 M EDC- HCl u intervalu od 1 min i staviti inkubirati 40 h na 20 °C na 250 rpm, nakon 40 h zrnca se istalože, supernatant baci i doda 10 ml 1 M NH₄Cl i 1 ml EDC-HCl te inkubira 1.5 h na 20 °C na 250 rpm
- zrnca oprati u 4 M NH₄Cl, centrifugirati 1 min na 30 g, supernatant baciti
- zrnca oprati 4x s destiliranom vodom uz centrifugiranje 1 min na 30 g, supernatant baciti
- zrnca oprati u 15 mM Tris-HCl puferu pH=7.4, tako dobivena polilizinska zrnca se čuvaju u 15 mM Tris- HCl puferu pH=7.4 uz 0.02% NaN₃ ⁽²⁹⁾

3.4. Izolacija trombocita

Primarni uzorak je bila puna krv uzorkovana uz antikoagulans Na-citrat.

- uzorak najprije centrifugirati 20 minuta na 200 g da se dobije plazma bogata trombocitima (engl. *Platelet rich plasma*, PRP), a eritrociti i leukociti se istalože
- supernatant (plazma bogata trombocitima) aspirirati i prenijeti u novu epruvetu te centrifugirati 15 min na 200 g da se uklone ostatci eritrocita i leukocita koji se sedimentiraju

- supernatant (PRP) centrifugirati 15 min na 1700 g čime se trombociti istalože
- dobiveni supernatant dekantirati i uzeti za negativnu kontrolu, a sediment trombocita ide u daljnji postupak analize (Slika 6)

3.5. Priprema zrnaca za analizu

- sintetizirana PLL zrnca oprati u 10 volumena 0.15 M Trisa, pH=7.4, sedimentirati centrifugiranjem 1 min na 30 g, supernatant dekantirati i baciti, postupak ponoviti 5 puta
- zrnca oprati 2x u puferu za vezivanje stanica na zrnca, sukroza acetat puferom, pH=5.2, nakon svakog pranja centrifugirati 1 min na 30 g i supernatant baciti
- 4 mL PLL zrnaca suspendirati u sukroza acetat puferu s EDTA, 50% vol./vol, tako pripremljena zrnca pomiješati s pripremljenim trombocitima

3.6. Priprema trombocita za izolaciju proteina stanične membrane

- dobiveni sediment trombocita oprati 3x s puferom 75 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 12 mM Na- citrat, pH=6.3, nakon svakog ispiranja trombocite sedimentirati centrifugiranjem 15 min na 1700 g, supernatant baciti
- sediment trombocita oprati u sukroza acetat puferu s EDTA, centrifugirati 15 min na 1700 g i supernatant baciti
- dobiveni sediment suspendirati u istom puferu 50% vol./vol, tako pripremljenim trombocitima dodati pripremljena zrnca

3.7. Dodavanje PLL zrnaca trombocitima

Postupak je isti za uzorak i negativnu kontrolu.

- u 1.5 ml suspendiranih trombocita dodati 6ml pripremljenih zrnaca kap po kap uz nježno miješanje, u 1.5 ml negativne kontrole dodati na isti način 2 ml zrnaca, sve inkubirati 10 min na sobnoj temperaturi
- epruvete okrenuti nekoliko puta te centrifugirati 1 min na 30 g i supernatant baciti
- zrnca oprati 2x u otopini sukroza acetata da se isperu nevezane stanice uz centrifugiranje 1 min na 30 g te odbacivanje supernatanta
- zrnca intenzivno vorteksirati (uređaj Vibromix 114, Tehnica, Slovenija) i odmah dodati 20 ml ledeno- hladnog sukroza acetat pufera
- epruvete nježno okrenuti nekoliko puta i ostaviti se na ledu 10-15 min, supernatant baciti i postupak ponoviti 5 puta
- suspendirati zrnca s vezanim membranama u 2 volumena hladnog 10 mM Tris-HCl pH=7.4
- sonicirati 2x po 15 s na 50 W
- centrifugirati 1 min na 30 g i supernatant baciti
- zrnca oprati 3x puferom 10 mM Tris-HCl pH=7.4, nakon svakog dodatka pufera centrifugirati 1 min na 30 g i supernatant baciti
- zrnca suspendirati u istom puferu 50% vol./vol
- na 1 ml suspendiranih zrnaca dodati po 1 ml 1% otopine SDS-a te se intenzivno vorteksirati i centrifugirati 1 min na 30 g (SDS denaturira i ekstrahira glikoproteine s vezanih membrana), supernatant sačuvati, postupak ponoviti 2x, a supernatante, koji sadrže membranske glikoproteine, spojiti
- korištena zrnca odvojiti i čuvati u puferu 10 mM Tris-HCl uz 0.02% NaN₃, pH=7.4

3.8. Pročišćavanje glikoproteina stanične membrane trombocita

Postupak je isti za uzorak i negativnu kontrolu.

- dobiveni supernatant s glikoproteinima (uzorak) najprije filtrirati na AcroPrep 0.2 µm GHP pločicama (Pall Corporation, SAD) kako bi se maknula zaostala zrnca uz uređaj Vacuum Manifold (Pall Corporation, SAD) i vakumsku pumpu (Pall Corporation, SAD), filtrat skupljati u pločice za skupljanje od 2 ml (*96-well collection plate*, Waters, SAD)

- dobiveni filtrat pročistiti od zaostalih soli gel filtracijom na *PD-10 Desalting* kolonama (General Electrics- Healthcare, Njemačka). Kolone sadrže *Sephadex G-25 medium*, veličina čestica je 85-260 µm, a dimenzije kolone su 1.45x5 cm. Princip metode je separacija prema molekularnoj masi odnosno veličini čestica. Velike čestice poput proteina zaostaju na koloni, a mali ioni izlaze iz kolone. Prije upotrebe kolonu isprati EB puferom 5x po 5 ml.

- nanijeti uzorak na kolonu i skupljati 15 frakcija od 1 ml

- nakon toga kolonu isprati 1x s 5 ml EB pufera, 2x s 5 ml destilirane vode i 3x s 5 ml 20% etanola, kolone se skladište s 20%-tnim etanolom na sobnoj temperaturi

- u sakupljenim frakcijama odrediti koncentraciju proteina s UV/VIS spektrofotometrom NanoDrop 8000 (Thermo scientific, UK) na 280 nm. Proteini u svom sastavu sadrže aromatske aminokiseline, treonin, fenilalanin i triptofan, koje apsorbiraju UV svjetlost pri 280 nm. Koncentracija proteina proporcionalna je količini apsorbirane svjetlosti. Za svaku frakciju rade se po dva mjerenja.

3.9. Sušenje uzoraka

Frakcije s pozitivnom koncentracijom proteina spojiti i ukoncentrirati sušenjem. Pročišćeni glikoproteini suše se zbog ukoncentriravanja i smanjenja volumena uzorka. Za ukoncentriravanje se koristi rotacijski vakuum koncentrador AVC 2-25 sa „zamkom“ za

otapalo engl. *cooling trap* CT 02-50 (Christ, Njemačka). Otapalo iz uzorka isparava na sobnoj temperaturi uz niski tlak, pri srednjoj brzini centrifuge. Otapalo se hlađenjem skuplja u „zamci“ za otapalo.⁽³⁰⁾

3.10. Deglikozilacija glikoproteina stanične membrane trombocita

- staviti 1.33% SDS, 4% Igepal i 1x PBS na sobnu temperaturu
- u plastičnu inkubacijsku komoru staviti destiliranu vodu ispod razine rešetke i zatvorenu komoru staviti inkubirati na 37 °C u inkubator DNI 30 (M.R.C. LTD, Izrael) da se postignu optimalni uvjeti za enzimsku aktivnost
- 10 kDa filtersku pločicu (Pall, SAD) staviti na Vacuum Manifold uz vakuumsku pumpu i oprati 2x sa po 100 µl ultra- čiste vode uz vakuum (vakuum ne smije prelaziti 10 inHg)
- u epruvetu s uzorkom staviti 30 µL 1.33% SDS-a i 610 µL ultra čiste vode, a u negativnu kontrolu 30 µL 1.33% SDS-a i 100 µL ultra čiste vode uz miješanje pomoću pipete (SDS služi za denaturaciju proteina, a voda je potrebna za otapanje taloga nastalog sušenjem uzoraka)
- epruvete inkubirati 10 min na 65 °C u inkubatoru DNO 30 (M.R.C. LTD, Izrael), a nakon toga staviti hladiti do sobne temperature 30 min na GFL 3023 Vibration Shaker (GFL, Njemačka)
- dodati 20 µl 4% Igepal i pomiješati pipetiranjem te staviti na *shaker* 15 min (Igepal služi za inaktivaciju SDS-a kako kasnije ne bi došlo do denaturacije enzima)
- u jednu jažicu 10 kDa pločice prenijeti uzorak, a u drugu negativnu kontrolu, 10 kDa pločicu staviti na pločicu za sakupljanje uzorka (1ml *96- well collection plate*) i centrifugirati 20 min na 3500 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804, Eppendorf, Njemačka)
- dodati po 100 µl ultra- čiste vode u svaku jažicu, centrifugirati 20 min na 3500 rpm i taj postupak ponoviti

- pomiješati 102 μ l 1x PBS i 0.24 μ L enzima PNGase F
- u jažice s uzorkom i negativnom kontrolom staviti po 50 μ l pripremljene smjese i pomiješati pipetiranjem
- 10 kDa ploča i postolje za sakupljanje pričvrstiti parafilmom, a jažice čvrsto zatvoriti adhezivnom trakom (da ne ispari tekućina), sve staviti u inkubacijsku komoru i inkubirati 18 sati na 37 °C u inkubatoru

3.11. Obilježavanje dobivenih N-glikana 2- aminobenzamidom

- nakon 18 h 10 kDa pločicu s 1 ml 96-well pločicom za sakupljanje izvaditi iz inkubatora i centrifugirati (Eppendorf Centrifuge 5804) 20 min na 3500 rpm u jažice s uzorcima staviti 50 μ l ultra čiste vode te sve staviti na Vibration Shaker 5 min, a zatim ponovo centrifugirati 2x po 20 min na 3500 rpm
- otopinu od 25 μ l, za obilježavanje N-glikana u jednom uzorku pripremiti dodavanjem 30% octene kiseline u DMSO te u to dodati 0.48 mg 2-aminobenzamida (2-AB), miješati vorteksiranjem dok se sve ne otopi, u otopinu dodati 1.12 mg 2-pikolin-borana (PB), miješati vorteksiranjem dok se sve ne otopi
- u svaki uzorak staviti 25 μ l otopine za obilježavanje i miješati pipetiranjem, pločicu zatvoriti adhezivnom trakom (da ne ispari tekućina) i staviti na *shaker* 10 min
- sve staviti u inkubator DNO 30 na 65 °C 2 sata (Tijekom toga vremena N-glikani se označavaju bojom. To je potrebno da bi detektor na UPLC-u mogao detektirati glikane.)
- kad se pločica izvadi iz inkubatora, ostavi se 30 min da se ohladi do sobne temperature, a za to vrijeme pripremiti AcroPrep GHP 0.2 μ m filtersku pločicu od 1 ml. U dvije jažice pločice (jedna za uzorak, jedna za negativnu kontrolu) staviti 200 μ l 70% etanola i isprati uz vakuum

na uređaju Vakuum Manifold s vakuumskom pumpom. Vakuum ne smije biti veći od 2 inHg. Isti postupak ponoviti s 200 µl ultra-čiste vode, a zatim s 200 µl ACN-a.

- slijedi pročišćavanje označenih N-glikana, u ohlađene uzorke (N-glikani uzorka i negativne kontrole označeni 2-AB) staviti 700 µl ACN-a i miješati pipetiranjem

- sve prenijeti u pripremljene jažice GHP pločice i inkubirati 2 min na sobnoj temperaturi

- glikani zaostaju na pločici, a višak boje se ukloni uz vakuum ne veći od 2 inHg

- u jažice staviti 200 µl ACN-a te primijeniti vakuum odsisavanje, postupak ponoviti 4 puta

- GHP pločicu premjestiti na pločicu od 1ml koja služi kao stalak, u uzorke staviti 200 µl ACN-a i centrifugirati 5 min na 1000 rpm

- GHP pločicu premjestiti na pločicu od 1 ml za sakupljanje uzoraka, u uzorke dodati 100 µl ultra čiste vode i stavi na *shaker* 15 min

- uz primjenu vakuuma (ne smije prelaziti 2 inHg) skupiti prvu frakciju (kako su glikani hidrofilni, topljivi su u vodi pa zajedno s vodom uz primjenu vakuuma prelaze iz GHP pločice u pločicu od 1 ml za sakupljanje uzoraka)

- dodati 100 µl ultra čiste vode i stavi na *shaker* 15 min

- centrifugirati 5 min na 1000 rpm da se skupi druga frakcija obilježenih N-glikana

- 300 µl tako dobivenih pročišćenih frakcija obilježenih N-glikana prenijeti u PCR epruvete s čepom (Mettler Toledo, UK)

3.12. Određivanje profila N-glikana na UPLC-u

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, UPLC (engl. *Ultra performance liquid chromatography*), je metoda odjeljivanja u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze noseći sastavnice uzorka. Molekule

uzorka putuju niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između mobilne i stacionarne faze. Čestice stacionarne faze imaju dimenzije manje od 2.5 μm za razliku od HPLC-a (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *High performance liquid chromatography*) gdje je veličina čestica u rasponu od 3-10 μm . To povećava efikasnost kolone, kolone su kraće i omogućava korištenje većeg tlaka protoka mobilne faze te je proces analize ubrzan. Povećana je i razlučivost kolone, tj. kvantitativna mjera kojom se izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka na koloni.^(31, 32)

- pri određivanju profila N-glikana korišten je Infinity 1290 UHPLC (Agilent, SAD)

- stacionarna faza je kolona Acquity UPLC BEH Glycan promjera čestica 1.7 μm , dimenzija 2.1x100 mm

- mobilna faza je gradijent dvaju otapala- 100 mM amonij formijat (AF) kao polarno otapalo i acetonitril (ACN) kao nepolaro otapalo. Početni uvjeti su 15% AF, 85% ACN uz postepenu promjenu njihova omjera na način da se AF povećava, a ACN smanjuje dok ne završi sa 100% AF i 0% ACN (N- glikani su polarni pa ih treba ispirati polarnim otapalom.)

- brzina protoka je 0.4 ml/min, vrijeme trajanja analize je 44 min

- volumen injektiranog uzorka je 40 μl

- detektor je fluorescencijski- fluorescencija je jedan od mehanizama kojim se molekula vraća u osnovno stanje nakon pobuđivanja apsorpcijom zračenja; laser ekscitira boju uzorka svjetlošću valne duljine 250 nm, a detektor hvata emisiju na 428 nm, količina uzorka proporcionalna je intenzitetu emitirane svjetlosti

4. REZULTATI

4.1. Sinteza poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom

Poliakrilamidna zrnca (Slika 5.) sintetizirana su inkubiranjem *Bio Gel-P-2* u destiliranoj vodi 3 sata na 90 °C. Karboksilirani su natrijevim karbonatom. Dodatkom piridina, poli-L-lizina i EDC-HCl te inkubiranjem dobivena su zrnca obložena poli-L-lizinom.

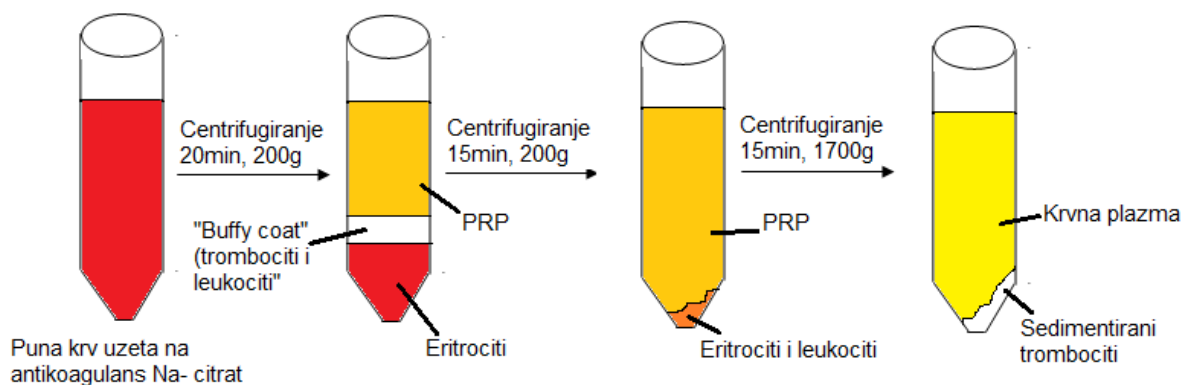


Slika 5. Završna faza sinteze zrnaca, inkubacija 40 sati na 20°C uz potresanje na 250rpm

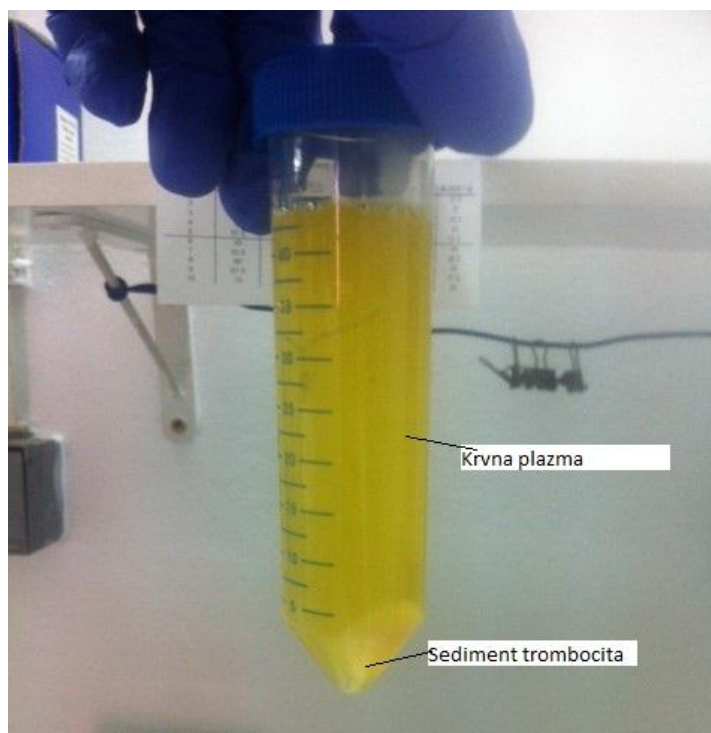
4.2. Izolacija trombocita

Nakon optimiranja metode, iz uzorka krvi uzorkovane na antikoagulans natrijev-citrat, izolirani su trombociti. Centrifugiranjem početnog uzorka 20min na 200g sedimentirani su eritrociti, iznad njih je bio bjelkasti sloj leukocita i trombocita a iznad toga sloja je plazma bogata trombocitima (Platelet Rich Plasma, PRP) koja se izdvojila i centrifugirala 15 min na 200 g da se uklone ostaci eritrocita i leukocita. Ponovo je izdvojena plazma bogata

trombocitima te centrifugirana 15 min na 1700 g čime su se trombociti sedimentirali (Slika 6.). Rezultat su izolirani trombociti (Slika 7.).



Slika 6. Postupak izolacije trombocita



Slika 7. Slika prikazuje sedimentirane trombocite i supernatant krvnu plazmu

4.3. Izolacija, pročišćavanje, određivanje koncentracije i ukoncentriravanje glikoproteina sa staničnih membrana trombocita

Glikoproteini su s membrana trombocita izolirani uz PLL zrnca i nalaze se u supernatantu nakon dodatka 1% SDS-a i centrifugiranja. Pročišćeni su filtriranjem supernatanta na 0.2 μm GHP pločicama i gel-filtracijom na PD-10 kolonama. Sakupljeno je po 15 frakcija uzorka i negativne kontrole te je u svakoj određena koncentracija proteina UV/VIS spektrofotometrom (NanoDrop, ThermoScientific, SAD) na 280 nm. Rezultati su prikazani u Tablici 1. (za uzorak) i Tablici 2. (za negativnu kontrolu). Frakcije uzorka pod brojevima od 4 do 11 imaju pozitivne koncentracije proteina, spajaju se te se glikoproteini ukoncentriravaju sušenjem. Prosječna koncentracija proteina je 0.2752 mg/ml. Frakcije negativne kontrole pod brojevima 4 i 5, spajaju se te se glikoproteini ukoncentriravaju sušenjem. Prosječna koncentracija proteina je 0.1015 mg/ml.

Pročišćeni glikoproteini ukoncentrirani su sušenjem rotacijskim vakuum koncentраторom. Nakon sušenja u epruветama je ostao bijeli talog.

Tablica 1. Rezultati mjerenja koncentracije glikoproteina u frakcijama uzorka

Br. frakcije	Br. mjerenja	Koncentracija proteina (mg/ml)
1	1	-0,05539
	2	-0,05394
2	1	-0,01441
	2	-0,01243
3	1	0,0303
	2	0,02607
4	1	0,2306
	2	0,2463
5	1	0,2606
	2	0,2534
6	1	0,2983
	2	0,298
7	1	0,3227
	2	0,3176
8	1	0,3052
	2	0,3323
9	1	0,3938
	2	0,3586
10	1	0,2384
	2	0,2499
11	1	0,1611
	2	0,1364
12	1	0,08978
	2	0,1095
13	1	0,07271
	2	0,06113
14	1	0,08122
	2	0,08078
15	1	0,06476
	2	0,05631

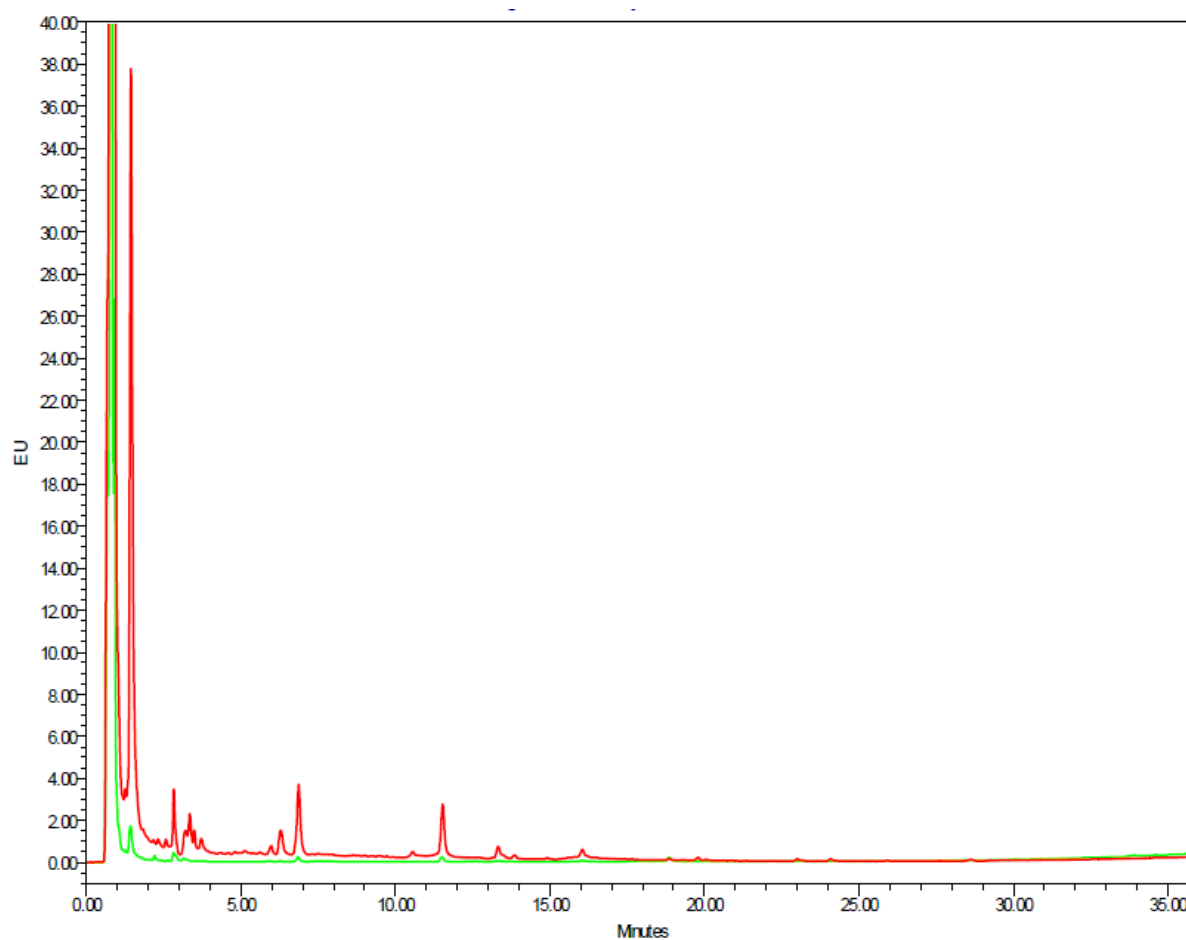
Tablica 2. Rezultati mjerenja koncentracije glikoproteina u frakcijama negativne kontrole

Br. frakcije	Br. mjerenja	Koncentracija proteina (mg/ml)
1	1	-0,008785
	2	0,01246
2	1	-0,01405
	2	-0,01928
3	1	-0,02072
	2	0,003569
4	1	0,1016
	2	0,09884
5	1	0,09007
	2	0,1156
6	1	0,007681
	2	0,01586
7	1	-0,01373
	2	-0,004774
8	1	0,0305
	2	0,01465
9	1	0,02011
	2	0,03456
10	1	-0,003237
	2	-0,007259
11	1	-0,03501
	2	-0,02548
12	1	-0,0101
	2	-0,0008714
13	1	0,005126
	2	0,01557
14	1	-0,01789
	2	-0,02676
15	1	-0,01696
	2	-0,01995

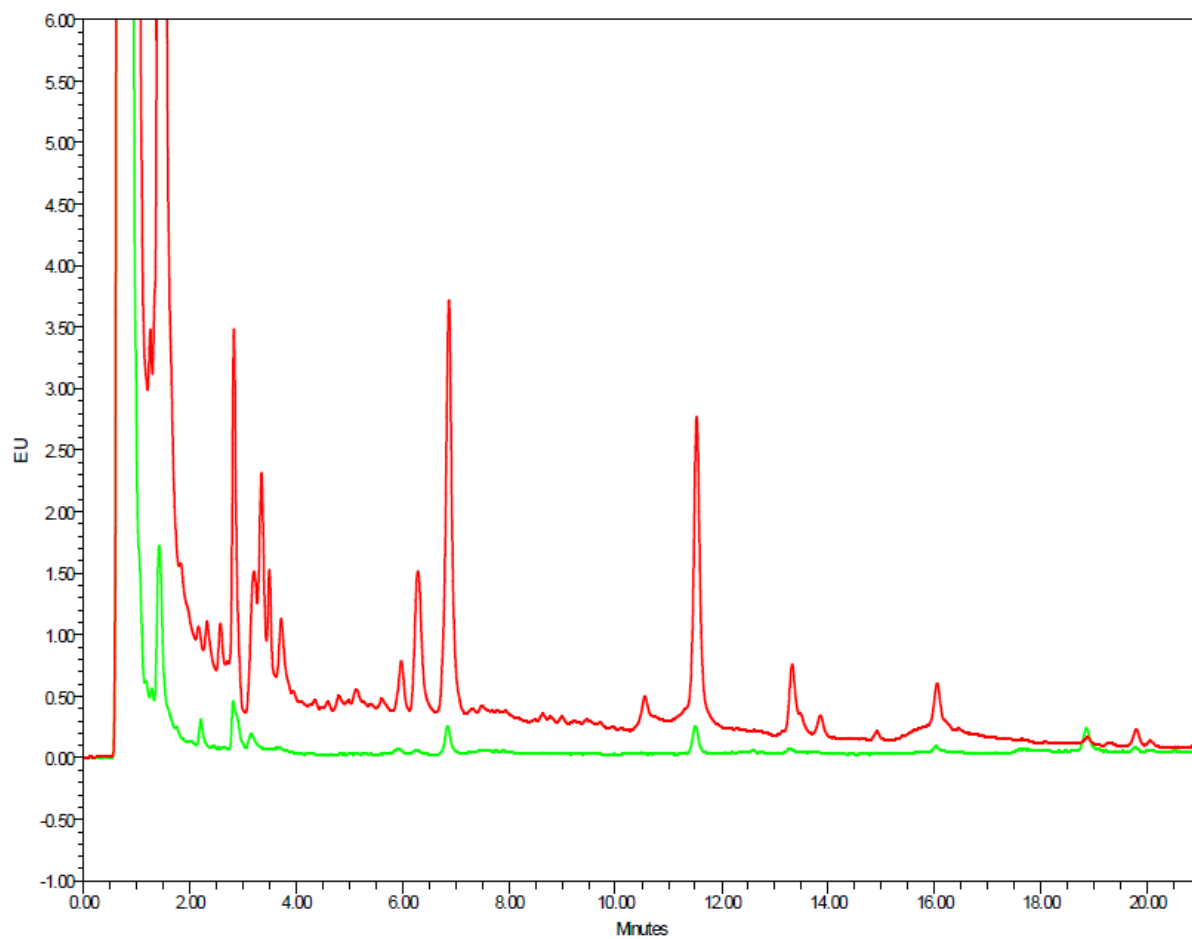
4.4. Deglikozilacija glikoproteina enzimom PNGaza F, označavanje dobivenih N-glikana 2-aminobenzamidom i određivanje N-glikana na UPLC-u

Enzim PNG-aza F kida N-glikozidnu vezu između N-acetilglukozamina glikana i asparagina proteinskog dijela. Rezultat kidanja su N-vezani glikani.

N-glikani su obilježeni 2-aminobenzamidom na prethodno opisan način. Profil N- glikana (Slika 8. i Slika 9.) određen je na UPLC-u.



Slika 8. HILIC-UPLC kromatogram N-vezanih glikana otpuštenih s membranskih proteina trombocita (crveno). Zeleni kromatogram prikazuje negativnu kontrolu (N-glikani u krvnoj plazmi zaostaloj nakon sedimentiranja trombocita).



Slika 9. Dio HILIC-UPLC kromatograma N-vezanih glikana otpuštenih s membranskih proteina trombocita (crveno). Zeleni kromatogram prikazuje negativnu kontrolu (N-glikani u krvnoj plazmi zaostaloj nakon sedimentiranja trombocita).

5. RASPRAVA

Najbolje proučena uloga trombocita je formiranje mehaničkoga čepa tijekom normalnog hemostatskog odgovora na ozljedu krvne žile. Neki znanstveni radovi otkrivaju njihove potencijalne nove funkcije u upali, kao što je upalna bolest crijeva⁽³³⁾, obrani organizma od virusa (HIV) i bakterija (*Staphylococcus aureus*)⁽⁵⁾, Alzheimerovoj bolesti⁽⁶⁾, aterosklerozi, reumatoidnom artritisu te rastu i metastaziranju tumora.^(4, 7, 8) Za sudjelovanje trombocita u raznim bolestima odgovorni su glikoproteinski receptori stanične membrane. Stanična membrana prekrivena je glikokaliksom koji služi i za zaštitu stanice, međustanične interakcije te je odgovoran za životni vijek trombocita. Glikokaliks čine oligosaharidi glikolipida i glikoproteina.^(7, 9, 16)

Sastav, građa i funkcija glikana na membranskim proteinima stanične membrane trombocita nisu u potpunosti poznati. Neki radovi navode da trombociti sadrže vezikule s glikoziltransferazama podrijetlom iz Golgijevog aparata iz megakariocita. Aktivacijom trombocita dolazi do aktivacije tih enzima i egzogene konjugacije sijalinske kiseline na plazmatske proteine. Sijalinska kiselina sudjeluje u brojnim interakcijama s drugim stanicama i izvanstaničnim matriksom, bitna je za životni vijek trombocita i njihovo sazrijevanje. Nedostatak sijaliltransferaze dovodi do trombocitopenije.^(14, 15, 16, 17, 18) Nedostatak ili defekt glikoproteinskih kompleksa na staničnoj membrani trombocita dovodi do bolesti kao što je Bernard-Soulier sindrom. Jedan od uzroka je smanjena glikozilacija makroglikopeptidne regije na GPIb-IX-V kompleksu jer dovodi do nepravilnosti u smatanju, stabilnosti proteina i vezanju na ligand.^(24, 26) Osim glikoproteina na trombocitnoj membrani nalaze se i gangliozidi. Građeni su od aminoalkohola sfingozina, masne kiseline i oligosahatida. Od ugljikohidrata sadrže glukozu, galaktozu, glukozamin, galaktozamin i sijalinsku kiselinu.⁽¹⁹⁾

Detaljno poznavanje profila glikana u zdravoj populaciji kao i njihova usporedba s glikanima pacijenata, mogla bi olakšati istraživanja njihove funkcije u raznim bolestima i stanjima. Zato je cilj ovoga rada bio odrediti profil N-vezanih glikana na staničnoj membrani trombocita.

Prvo su izolirani trombociti iz početnog uzorka, pune krvi uzete na antikoagulans natrijev-citrat. Trombociti su izolirani centrifugiranjem na prethodno opisan način. Zatim je bilo potrebno izolirati stanične membrane trombocita. Membrane su izolirane pomoću prethodno sintetiziranih poliakrilamidskih zrnaca obloženih poli-L-lizinom (PLL *beads*) koja se dodaju suspenziji izoliranih trombocita. Ova metoda se pokazala boljom od drugih jer dolazi do manje kontaminacije izolirane stanične membrane s intracelularnim membranama.⁽²⁷⁾ Prije metode s PLL zrcima, stanične membrane trombocita izolirane su hipotoničnom lizom stanice i ultracentrifugiranjem u gradijentu gustoće glicerola, a nakon toga u gradijentu gustoće sukroze, ali uz kontaminaciju plazmatskih membrana s intracelularnim sadržajem. U istom znanstvenom radu određene su ugljikohidratne komponente: sijalinska kiselina pomoću tiobarbituta, a glukoza, galktoza, manosa i fukoza su određene plinskom kromatografijom.⁽³⁴⁾ Načelo metode s PLL zrcima je interakcija između negativno nabijenih staničnih membrana i pozitivno nabijenih poli-L-lizinskih lanaca vezanih na zrnca. Prvo su na taj način izolirane membrane eritrocita i HeLa stanica. Veličina zrnaca i molekularna masa polilizina su određeni vrstom stanica. Pomoću 1% SDS-a izdvoje se membranski glikoproteini s membrana vezanih na zrcima.^(27, 28, 29)

Izdvojeni glikoproteini su pročišćeni od zaostalih zrnaca filtracijom na 0.2 μm GHP pločicama uz vakuum. Od SDS-a i zaostalih soli (iz korištenih pufera tijekom izolacije) proteini su pročišćeni gel filtracijom na PD-10 *Desalting* kolonama. Pročišćenim frakcijama određena je koncentracija glikoproteina UV/VIS spektrofotometrom na 280nm. Proteini u svom sastavu sadrže aromatske aminokiseline, treonin, fenilalanin i triptofan, koje apsorbiraju UV svjetlost pri 280 nm. Koncentracija proteina proporcionalna je količini apsorbirane svjetlosti. Frakcije u kojima su bili prisutni proteini su spojene i ukoncentrirane sušenjem u rotacijskom vakuum koncentratoru. To je potrebno da bi se dobio što manji volumen i veća koncentracija glikoproteina zbog nanošenja uzorka na UPLC. Sušenjem je u epruvetama ostao bijeli talog od zaostalih soli. Te soli bi mogle smetati u daljnjoj analizi pa je potrebno uvesti dodatne korake pročišćavanja proteina prije nego se krene u postupak izolacije glikana.

N-glikani su skinuti pomoću enzima PNGaze F koji cijepa N-glikozidnu vezu između N-acetilglukozamina i asparagina u glikoproteinu. Da bi fluorescentni detektor na UPLC-u detektirao N-glikane, potrebno ih je označiti 2-aminobenzamidom. Fluorescencija je jedan od mehanizama kojim se molekula vraća u osnovno stanje nakon pobuđivanja apsorpcijom zračenja. Laserska zraka pobuđuje kromofor (2-aminobenzamid) koji prelazi na višu energetska razinu. Kad se vraća na osnovnu energetska razinu, emitira svjetlost koju detektira detektor. Količina glikana u uzorku, proporcionalna je intenzitetu emitirane svjetlosti. Na dobivenom kromatogramu (Slika 8. i Slika 9.) prikazani su profili N-glikana sa stanične membrane trombocita i supernatanta, tj. plazme zaostale nakon sedimentiranja trombocita. Na kromatogramu N-glikana stanične membrane trombocita, vidi se više pikova i jačeg su intenziteta. Jači intenzitet pika znači veću količinu prisutnih N-glikana. Na kromatogramu plazme iz supernatanta nakon sedimentiranja trombocita, javljaju se pikovi puno slabijeg intenziteta i ima ih manje. Pikovi u plazmi javljaju su se u isto vrijeme kao i kod uzorka, iz čega zaključujem da se radi o istim N-glikanima, ali u manjim količinama. Najvjerojatnije objašnjenje je da je manji broj trombocita ostao u supernatantu nakon sedimentiranja te se njihovi N-glikani stanične membrane pojavljuju na kromatogramu. Također, ne smije se isključiti ni mogućnost da su ti glikani porijeklom iz unutrašnjosti trombocita ili s njihove stanične membrane, a završili su u plazmi jer je došlo do aktivacije trombocita tijekom postupka same izolacije i posljedičnog otpuštanja N-glikana. Svakako treba uzeti u obzir činjenicu da su trombociti (granule u citoplazmi i brojni enzimi na staničnoj membrani) mobilna skladišta glikana koja ih mogu otpuštati, ali i primati. Kako do sada profil N-glikana na staničnoj membrani trombocita nije određivan, dobiveni rezultati ne mogu se usporediti s literaturnim podacima, ali svakako iduća istraživanja trebaju biti usmjerena ka boljem i učinkovitijem pročišćavanju izoliranih glikoproteina, uz napomenu da je nužno ispitati efekt aktivacije trombocita na N-glikanski profil njihove stanične membrane jer bi to moglo objasniti činjenicu da u većem broju nisu prisutni složeni, razgranati glikani ako ni oni sijalizirani.

6. ZAKLJUČCI

Glikoproteine sa stanične membrane trombocita moguće je uspješno izolirati pomoću poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom. Ova metoda izolacije uspješno odvaja membranske proteine od unutarstaničnih.

Iz glikanskog profila dobivenog analizom N-glikana otpuštenih s membranskih proteina vidljivo je da se na staničnoj membrani trombocita nalazi velik broj N-vezanih glikanskih struktura. Točna strukturna karakterizacija izoliranih N-glikana nije bila cilj ovog rada.

Metoda predložena u ovom radu pogodna je za analizu N-glikozilacije staničnih membrana trombocita. Ona uključuje izolaciju trombocita iz pune krvi metodama centrifugiranja, izdvajanje isključivo membranskih proteina pomoću poliakrilamidnih zrnaca s vezanim poli-L-lizinom te analizu njihovih N-glikana HILIC-UPLC-om. Postojanje navedene metode omogućava buduća istraživanja važnosti N-glikozilacije stanične membrane trombocita.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu i doc. dr. sc. Olgi Gornik koji su mi omogućili izradu ovog rada.

Posebno zahvaljujem Mirni Šimurini, mag. med. biochem. na uloženom trudu, strpljenju te brojnim korisnim savjetima i pomoći u izradi praktičnog dijela rada.

8. POPIS LITERATURE

1. Kamath S, Blann AD, Lip GYH. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J*, 2001, 22, 1561-1571.
2. Labar B, Hauptmann E, i sur. Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2007
3. Patel SR, Hartwig JH, Italiano Jr JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, 2005, 115, 3348-3354.
4. Lewandrowski U, Zahedi RP, Moebius J, Walter U, Sickmann A. Enhanced N-Glycosylation Site Analysis of Sialoglycopeptides by Strong Cation Exchange Prefractionation Applied to Platelet Plasma Membranes. *MPC Papers in Press*, 2007, 6.11, 1933-1941.
5. Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*, 2002, 99, 4021-4029.
6. Catricala S, Torti M, Ricevuti G. Alzheimer disease and platelets: how' s that relevant. *Immunity & Aging*, 2012, 9:20, 1-11.
7. Lee MM, Nasirikenari M, Manhardt CT, Ashline DJ, Hanneman AJ, Reinhold VN, Lau JTY. Platelets support extracellular sialylation by supplying the sugar donor substrate. *J. Biol. Chem.* 2014, 1-12.
8. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet Receptors. U: Platelets. Michelson AD, urednik, London, Elsevier, 2007, str 117-144.
9. Cooper GM, Hausman RE. Sinteza, dorada i regulacija proteina. U: Stanica-molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str 281-319.
10. Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins: A look back into the past and view to the future. *Thromb Haemost*, 2007, 98, 49-54.
11. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Carbohydrates. U: Biochemistry, New York, W. H. Freeman and Company, 2012, str 319-344.

12. Wang Y, Jobe SM, Ding X, Choo H, Archer DR, Mi R, Ju T, Cummings RD. Platelet biogenesis and functions require protein O-glycosylation. *PNAS*, 2012, 109 (40), 16143-16148.
13. http://www.nature.com/nrd/journal/v2/n10/fig_tab/nrd1198_F3.html, pristupljeno 17. travnja 2014.
14. Wandall HH, Rumjantseva V, Tølbøll Sørensen AL, Patel-Hett S, Josefsson EC, Bennett EP, Italiano Jr JE, Clausen H, Hartwig JH, Hoffmeister KM. The origin and function of platelet glycosyltransferases. *Blood*, 2012, 120, 626-635.
15. Sørensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, Clausen H, Hartwig JH, Wandall HH, Hoffmeister KM. Role of sialic acid for platelet life span: exposure of β -galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor- expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood*, 2009, 114, 1645-1654.
16. Jansen AJG, Josefsson EC, Rumjantseva V, Lui QP, Falet H, Bergmeister W, Cifuni SM, Sackstein R, von Andrian U, Wagner D.D., Hartwig JH, Hoffmeister KM. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIb α metalloproteinase- mediated cleavage in mice. *Blood*, 2012, 119, 1263-1273.
17. Wandall HH, Hoffmeister KM, Sørensen AL, Rumjantseva V, Clausen H, Hartwig JH, Slichter SJ. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4°C-stored platelets. *Blood*, 2008, 111, 3249-3256.
18. Jones C, Denecke J, Sträter R, Stölting T, Schunicht Y, Zeuschner D, Klumperman J, Lefeber DJ, Spelten O, Zarbock A, Kelm S, Strenge K, Haslam SM, Lühn K, Stahl D, Gentile L, Schreiter T, Hilgard P, Beck-Sickinger AG, Marquardt T, Wild MK. A Novel Type of Macrothrombocytopenia Associated with a Defect in α 2,3-Sialylation. *Am J Pathol*, 2011, 179, 1969-1977.
19. Marcus AJ, Ullman HL, Safier LB. Studies on Human Platelet Gangliosides. *J. Clin. Invest.* 1972, 51, 2602-2612.

20. Santoro SA. Inhibition of platelet adhesion of fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by complex gangliosides. *Blood*, 1989, 73, 484-489.
21. Cruz MA, Chen J, Whitelock JL, Morales LD, Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction activates the collagen receptor $\alpha 2\beta 1$ to bind collagen: activation-dependent conformational change of the $\alpha 2$ -I domain. *Blood*, 2005, 105, 1986-1991.
22. Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HFG, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet Adhesion to Collagen Types I and III through VI11 Under Conditions of Stasis and Flows Mediated by GPIa/IIa ($\alpha 2\text{BI}$ -Integrin). *Blood*, 1994, 83, 1244-1250.
23. Nachman RL, Leung LLK. Complex Formation of Platelet Membrane Glycoproteins IIb and IIIa with Fibrinogen. *J. Clin. Invest.*, 1982, 69, 263-269.
24. Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt M. Bernard-Soulier Syndrome. *Blood*, 1998, 91, 4397-4418.
25. Afshar-Kharghan V, Matijevic-Aleksic N, Ahn C, Boerwinkle E, Wu KK, Lopez JA. The variable number of tandem repeat polymorphism of platelet glycoprotein Ib α and risk of coronary heart disease. *Blood*, 2004, 103, 963-965.
26. Othman M, Notley C, Lavender FL, White H, Byrne CD, Lillicrap D, O'Shaughnessy DF. Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. *Blood*, 2005, 105, 4330-4336.
27. Kinoshita T, Nachman RL, Minick R. Isolation of human platelet plasma membranes with polylysine beads. *J. Cell Biol.*, 1979, 82, 688-696.
28. Jacobson BS. Isolation of plasma membrane from eukaryotic cells on polylysine-coated polyacrylamide beads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1977, 471, 331-335.
29. Cohen CM, Kalish DI, Jacobson BS, Branton D. Membrane isolation on polylysine-coated beads. *J. Cell Biol.*, 1977, 75, 119-134.

30. SpeedDry Rotational Vacuum Concentrators, 2011, <http://www.sciquip.co.uk/wp-content/uploads/2011/08/RVC-AllModels-2010.pdf>, pristupljeno 9. travnja 2014.
31. Swartz ME. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. Separation science redefined. 2005, 8-14.
32. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova II. dio. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet sveučilišta u Zagrebu, 2007. str. 30.
33. Voudoukis E, Karmiris K, Koutroubakis IE. Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: A clinical approach. World J Gastroenterol, 2014, 20, 3180-3190.
34. Barber AJ, Jamieson GA. Isolation and Characterization of Plasma Membranes from Human Blood Platelets. J Biol Chem, 1970, 245, 6357-6365.

9. SAŽETAK

Trombociti, jedni od ključnih sastavnica ljudske krvi, imaju mnogo važnih funkcija. Osim formiranja mehaničkog čepa tijekom odgovora na ozljedu krvne žile, sudjeluju i u upali, obrani od mikroorganizama, rastu i metastaziranju tumora, angiogenezi, reumatoidnom artritisu te u Alzheimerovoj bolesti. Nastaju u koštanoj srži fragmentiranjem citoplazme zrelih megakariocita. Trombociti ne sadrže jezgru, endoplazmatski retikul ni Golgijev aparat, a za obavljanje svojih funkcija ovise o proteinima sintetiziranim u megakariocitima.

Stanična membrana trombocita prekrivena je glikoproteinskim omotačem, glikokaliksiom, kojeg čine oligosaharidi glikolipida i glikoproteina. Glikokaliks služi za zaštitu stanice i međustanične interakcije. Glikani mogu biti N- i O- vezani. Iako trombociti nemaju organele u kojima se odvija proces glikozilacije, sadrže njihove elemente s glikoziltransferazama podrijetlom iz megakariocita. Ugljikohidrati su također bitni i za životni vijek trombocita.

Sastav, građa i funkcija glikana na proteinima stanične membrane trombocita nisu u potpunosti poznati. Poznavanje tih glikana olakšalo bi istraživanja njihove funkcije u navedenim bolestima i stanjima. Stoga je cilj ovog rada bio izolirati proteine iz stanične membrane trombocita te analizirati njihovu N-glikozilaciju. Trombociti su iz pune krvi, uzete uz natrijev citrat, izolirani ponavljanim centrifugiranjima pri određenim uvjetima. Njihove stanične membrane su izolirane pomoću poliakrilamidnih zrnaca obloženih poli-L-lizinom koja su sintetizirana u sklopu ovog rada, a glikoproteini su izdvojeni 1% SDS-om. N-glikani su zatim oslobođeni enzimom PNGazom F i obilježeni 2-aminobenzamidom te analizirani tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti koja se bazira na hidrofилnim interakcijama. Na ovaj način određeno je prisustvo N-vezanih glikana na staničnoj membrani trombocita te dizajnirana metoda za njihovu izolaciju i analizu. Postojanje navedene metode omogućava buduća istraživanja važnosti N-glikozilacije stanične membrane trombocita.

Ključne riječi: membrana trombocita, N-glikozilacija membranskih proteina, glikokaliks trombocita, poli-L-lizinska zrnca

10. SUMMARY

Platelets, one of the key components in human blood, have many important functions. Besides forming the mechanic plug during normal haemostatic response, they take part in inflammations, defence of microorganisms, tumour growth and metastasis formation, angiogenesis, rheumatoid arthritis and Alzheimer disease. Platelets are formed in bone marrow by fragmentation of mature megakaryocytes cytoplasm. They do not possess a nucleus, endoplasmatic reticulum (ER) or Golgi apparatus (GA), and their function is dependent on proteins synthesized in megakaryocytes.

The cell membrane of platelets is covered with a glycoprotein envelope, called glycocalyx, made of oligosaccharides from glycoproteins and glycolipids. Glycocalyx is responsible for cell protection and cell-cell interactions. Although platelets do not contain organelles in which glycosylation takes place, they possess their elements with glycosyltransferases from megakaryocytes. Glycans are also important for platelet lifespan.

The composition and function of glycans on platelet plasma membrane proteins have not been sufficiently studied. Understanding their structure, nature and function could help in disease research. Thus, the aim of this study was to isolate platelet plasma membrane proteins and analyze their N-glycosylation. Platelets were isolated from human blood, taken on sodium-citrate as anticoagulant, by repeated centrifugation under certain conditions. Their cell membranes were isolated with polyacrilamide beads coated with poly-L-lysine (PLL beads), which were synthesized as part of this study, and glycoproteins were isolated with 1% SDS. N-glycans were released with enzyme PNGase F, labelled with 2-aminobensamide and then analysed by HILIC-UPLC. In this way, the presence of N-linked glycans on platelets cell membranes was determined and the method for their isolation and analysis was designed.

Key words: platelet cell membrane, N-glycosylation of membrane proteins, platelet glycocalyx, poly-L-lysine beads (PLL-beads)