

# N GLIKOZILACIJA SERUMSKIH PROTEINA I IMUNOGLOBULINA A U ŠEĆERNOJ BOLESTI TIP A 1

---

Nemčić, Matej

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:329296>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Matej Nemčić

**N-GLIKOZILACIJA SERUMSKIH  
PROTEINA I IMUNOGLOBULINA A U  
ŠEĆERNOJ BOLESTI TIPA 1**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Matej Nemčić

**N-GLYCOSYLATION OF TOTAL SERUM  
PROTEINS AND IMMUNOGLOBULIN A  
IN TYPE 1 DIABETES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Olge Gornik Kljaić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O MENTORICI

Prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić redovita je profesorica u trajnom zvanju na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija diplomskog studija Biološka kemija, Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom i Analitička biokemija te kolegija Glikobiologija na doktorskom studiju. Područje njezina znanstveno-istraživačkog interesa je glikobiologija s naglaskom na analitiku glikanskih struktura u raznim fiziološkim i patološkim stanjima.

Godine 2001. stekla je akademski stupanj dipl. ing. medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2007. akademski stupanj doktora znanosti u području biomedicine i zdravstva, također na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2001. godine zaposlena je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a od 2020. na poziciji redovite profesorice u trajnom zvanju te predstojnice Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju. Tijekom karijere boravila je na Glikobiološkom institutu Sveučilišta u Oxfordu u Velikoj Britaniji 2006. godine.

Voditeljica je projekata: Glikozilacija plazmatskih proteina u razumijevanju dijabetesa tipa 1 (Hrvatska zaklada za znanost, 2015. – 2018.), Fukožilacija proteina u dijagnostici dijabetesa mladih koji se javlja u odrasloj dobi (Europska zaklada za istraživanje dijabetesa, 2013. – 2015), Utjecaj statina na glikozilaciju plazmatskih proteina i imunoglobulina G (Sveučilište u Zagrebu, 2015.) te Glikozilacija plazmatskih proteina u etiologiji dijabetesa tipa 2 (Sveučilište u Zagrebu, 2013.). Uz navedeno, suradnica je na brojnim europskim i gospodarstvenim projektima te projektima Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske.

Objavila je 70 znanstvenih radova, četiri pregledna rada i tri poglavlja u knjizi. Dobitnica je nagrade Hrvatskog društva medicinskih biokemičara za najboljeg znanstvenog novaka za 2007. godinu te nagrade za postignuća u znanstvenom i nastavnom radu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta 2018. godine. Od 1999. godine članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (FEBS) te od 2016. godine članica Europskog društva za istraživanje šećerne bolesti (EASD).

## ZAHVALE

*Prije svega želio bih se od srca zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić, na prilici da izradim svoju doktorsku disertaciju pod njenim vodstvom (i nagovoru da upišem doktorat). Olga, hvala Vam na neizmjerljivoj podršci, strpljenju i razumijevanju, te brojnim savjetima i pomoći tijekom ovog doktorata. Iznimno sam zahvalan sam što ste u ovih četiri godine uvijek brinuli o nama, živcirali se umjesto nas (i tad kad ne biste trebali), bili otvorena za sva pitanja, diskusije i ideje, i pokazali kako izgleda vesela i prijateljska radna atmosfera.*

*Iskreno se zahvaljujem doc. dr. sc. Tomi Keseru i dr. sc. Najdi Rudman na prenesenom znanju i vještinama, dostupnosti i otvorenosti za sva moja pitanja, na ugodnim ručkovima i zanimljivim temama. Hvala vam na pomoći i na svim savjetima koje ste nesebično dijelili sa mnom.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordanu Laucu na suradnji, te kao voditelju projekta CEKOM, bez kojeg ne bih imao priliku izrade doktorata na ovoj poziciji. Također se zahvaljujem svim kolegama iz Genosa na podršci, suradnji i društvu.*

*Najljepše se zahvaljujem kolegama sa zavoda: Gordani, Ivoni, Jerki, Rajku, Sandri i Sanji, na pomoći, prijateljskoj atmosferi, ugodnim ručkovima i životnim mudrostima. Hvala vam što ste uvijek bili na raspolaganju i što ste me podržavali na ovom putovanju.*

*Veliko hvala bivšim zavodskim kolegama Ani i Marku koji su podijelili svoje znanje i vještine sa mnom i na najbezbolniji način me uveli u područje glikobiologije. Hvala vam na brojnim druženjima, ručkovima, ponekim lošim forama i zabavnim eksperimentima. Također, veliko hvala kolegi Domagoju na suradnji, dobrom društvu i na životnim i statističkim mudrostima.*

*Od srca se zahvaljujem svojim kolegama i prijateljima Borni, Branimiru i Dinku na pomoći, podršci i iskrenom prijateljstvu. Bez vas, ovaj put ne bi bio ovako zanimljiv, inspirativan i zabavan. Zahvalan sam što ste baš vi bili sa mnom na ovom putu.*

*Zahvaljujem se svim asistentima na nebrojenim ispijenim pivima, druženjima, užarenim diskusijama, i na prijateljstvu. Hvala vam što ste mi doktorat pretvorili u pravi nastavak studentskog života.*

*Na kraju, želio bih se zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima što su uvijek bili uz mene, podržavali me i gurali naprijed, čak i kad sam nisam vjerovao u sebe. Bez vaše podrške ovaj uspjeh ne bi bio moguć.*

## ***N*-GLIKOZILACIJA SERUMSKIH PROTEINA I IMUNOGLOBULINA A U ŠEĆERNOJ BOLESTI TIP 1**

MATEJ NEMČIĆ

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*N*-glikozilacija u šećernoj bolesti tipa 1 (ŠBT1) povezana je s početkom bolesti, dijabetičkim komplikacijama i lošom glikemijskom kontrolom, a osim navedenog, novija istraživanja naglašavaju ulogu imunoglobulina A (IgA) i njegove glikozilacije u autoimunim bolestima. U ovom istraživanju je tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti analizirana povezanost *N*-glikoma ukupnih serumskih proteina te antitijela IgA sa ŠBT1 kako bi se pružio uvid u obrasce *N*-glikozilacije odraslih, identificirale promjene jedinstvene za početak bolesti u djece, te ispitala povezanost *N*-glikoma s komplikacijama i rizičnim faktorima. *N*-glikom ukupnih serumskih proteina značajno se mijenja u ŠBT1 u obrazac nalik upalnim procesima te pokazuje asocijacije s glikemijskom kontrolom i navikama pušenja, ali ne sa statusom komplikacija. Početak ŠBT1 u djece slabo se odražava na *N*-glikom antitijela IgA, dok je ŠBT1 u odraslih povezana s brojnim promjenama i povećanim grananjem *N*-glikana. Navedeno upućuje na uključenost *N*-glikoma u različitim fazama ŠBT1 te na potencijalnu ulogu u imunskim odgovorima i upalnim procesima u ŠBT1.

(113 stranica/ 12 slika/ 17 tablica/ 188 literaturnih navoda/ jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *N*-glikozilacija, šećerna bolest tipa 1, serumski proteini, imunoglobulin A, komplikacije šećerne bolesti, HbA1c, pušenje

Mentor: *prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić*

Ocjenjivači: *prof. dr. sc. Biljana Balen*

*doc. dr. sc. Toma Keser*

*izv. prof. dr. sc. prim. dr. med. Dario Rahelić*

***N*-GLYCOSYLATION OF TOTAL SERUM PROTEINS AND IMMUNOGLOBULIN A  
IN TYPE 1 DIABETES**

MATEJ NEMČIĆ

Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

*N*-glycosylation in type 1 diabetes (T1D) is linked to disease onset, complications, and poor glycaemic control. In addition, recent findings emphasize the role of immunoglobulin A (IgA) and its glycosylation in autoimmune diseases. In this study, the association of *N*-glycome of total serum proteins and IgA with T1D was analysed by ultra-high performance liquid chromatography to elucidate the *N*-glycosylation patterns of adults, identify changes unique to the onset in children, and examine the association of *N*-glycome with complications and risk factors. *N*-glycome of total serum proteins significantly changes in T1D in an inflammatory-like pattern, and associates with glycaemic control and smoking, but not complications. The onset of T1D barely reflects in the *N*-glycome of IgA, while T1D in adults associates with substantial changes and increased branching. These findings indicate the involvement of *N*-glycome in different stages of T1D and a potential role in immune responses and inflammatory processes in T1D.

(113 pages, 12 figures, 17 tables, 188 references, original in Croatian)

Keywords: *N*-glycosylation, type 1 diabetes, total serum proteins, immunoglobulin A, diabetic complications, HbA1c, smoking

Supervisor: *Prof. Olga Gornik Kljaić, PhD*

Reviewers: *Prof. Biljana Balen, PhD*

*Asst. Prof. Toma Keser, PhD*

*Assoc. Prof. Dario Rahelić, Primarius MD, PhD*



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	3
<b>2.1. Šećerna bolest tipa 1</b> .....	3
<b>2.2. N-glikozilacija proteina</b> .....	5
2.2.1. Biosinteza <i>N</i> -glikana .....	6
2.2.2. Biosintetski put heksozamina.....	10
2.2.3. <i>N</i> -glikozilacija u ŠBT1 .....	12
2.2.4. Stabilnost <i>N</i> -glikoma.....	15
2.2.5. Metode analize <i>N</i> -glikozilacije.....	15
<b>2.3. Imunoglobulin A</b> .....	16
2.3.1. Struktura antitijela IgA .....	17
2.3.2. Glikozilacija antitijela IgA .....	19
2.3.3. Funkcija antitijela IgA u imunosnom sustavu .....	21
2.3.4. Uloga glikozilacije antitijela IgA .....	23
2.3.5. Antitijelo IgA u ŠBT1.....	25
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	27
<b>3.1. Ispitanici</b> .....	27
<b>3.2. Materijali</b> .....	30
3.2.1. Anorganske kemikalije .....	30
3.2.2. Organske kemikalije.....	30
3.2.3. Priprema otopina i pufera .....	31
<b>3.3. Pribor i instrumenti</b> .....	34
3.3.1. Instrumenti.....	34
3.3.2. Potrošni materijal .....	34
<b>3.4. Metode</b> .....	35
3.4.1. Izolacija antitijela IgA.....	35
3.4.2. Deglikozilacija, fluorescentno obilježavanje i pročišćavanje <i>N</i> -glikana antitijela IgA.....	36

3.4.3. Deglikozilacija, fluorescentno obilježavanje i pročišćavanje <i>N</i> -glikana serumskih proteina .....	37
3.4.4. Analiza fluorescentno obilježenih <i>N</i> -glikana antitijela IgA tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti.....	38
3.4.5. Analiza fluorescentno obilježenih <i>N</i> -glikana serumskih proteina tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti.....	43
<b>3.5. Statistička obrada podataka.....</b>	<b>47</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. <i>N</i>-glikozilacija serumskih proteina u ŠBT1 .....</b>	<b>49</b>
4.1.1. <i>N</i> -glikozilacija ukupnih serumskih proteina kod odraslih ispitanika sa ŠBT1 .....	49
4.1.2. Korelacija <i>N</i> -glikoma ukupnih serumskih proteina s biokemijskim parametrima .....	52
4.1.3. Utjecaj statusa komplikacija, trajanja bolesti i pušenje na <i>N</i> -glikozilacijski profil ukupnih serumskih proteina u osoba sa ŠBT1.....	56
<b>4.2. <i>N</i>-glikozilacija antitijela IgA u ŠBT1 .....</b>	<b>66</b>
4.2.1. <i>N</i> -glikozilacija antitijela IgA kod djece na početku ŠBT1 .....	66
4.2.2. <i>N</i> -glikozilacija antitijela IgA kod odraslih sa ŠBT1 .....	68
4.2.3. Usporedba <i>N</i> -glikozilacijskih obrazaca antitijela IgA između dječje i odrasle populacije sa ŠBT1.....	70
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1. <i>N</i>-glikozilacija serumskih proteina u ŠBT1 .....</b>	<b>73</b>
5.1.1. Promjene <i>N</i> -glikozilacije ukupnih serumskih proteina kod odraslih sa ŠBT1 i djece na početku bolesti.....	75
5.1.2. <i>N</i> -glikom ukupnih serumskih proteina i glikemijska regulacija.....	79
5.1.3. Utjecaj dijabetičkih komplikacija, trajanja bolesti i pušenja na <i>N</i> -glikozilaciju u ŠBT1 ....	81
<b>5.2. <i>N</i>-glikozilacija antitijela IgA u ŠBT1 .....</b>	<b>83</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>86</b>
<b>7. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>88</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>111</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>113</b>

# **1. UVOD**

Šećerna bolest tipa 1 (ŠBT1) je autoimuna bolest koja uzrokuje uništavanje  $\beta$ -stanica gušterače, odgovornih za proizvodnju inzulina [1]. Incidencija ŠBT1 je u porastu diljem svijeta, ali točni uzroci bolesti još uvijek nisu razjašnjeni [2]. Rastući naponi za otkrivanje uzroka, poboljšanje dijagnoze, mogućnosti liječenja, ali i smanjenje rizika od mogućih komplikacija doveli su do prepoznavanja potencijala *N*-glikana u području dijabetologije. *N*-glikozilacija je važna ko- i post-translacijska modifikacija oligosaharidima, koja ima značajan utjecaj na strukturu i funkciju proteina te je važna u procesima poput smatanja proteina, prijenosa signala, razvoja, neurogeneze i imuniteta [3]. Zbog njene iznimne važnosti, *N*-glikozilacija je strogo regulirana brojnim enzimima i transkripcijskim faktorima [4]. Dosadašnja istraživanja su pokazala da promjene u glikozilaciji proteina igraju ulogu u raznim patološkim stanjima, uključujući autoimune bolesti [5], a između ostalog su povezane i sa ŠBT1 [6–9]. Rastući broj studija je otkrio da se *N*-glikozilacija različitih serumskih proteina može promijeniti kod djece i odraslih osoba s ŠBT1, te da je ta promjena povezana s razvojem same bolesti, glikemijskom regulacijom ili razvojem vaskularnih komplikacija [6–9].

Imunoglobulin A (IgA) je važna komponenta imunskog sustava te drugi najobilniji oblik antitijela u ljudskom tijelu [10], koji je ujedno izrazito glikoziliran. Kao efektorska molekula imunskog sustava, uključen je u inicijaciju proupalnih, ali i protuupalnih odgovora, zbog čega su poremećaji funkcije tog antitijela povezani s raznim autoimunim bolestima [11–16]. Prethodna istraživanja su pokazala da se koncentracija antitijela IgA može promijeniti kod ljudi sa ŠBT1 [17,18], no detaljni mehanizmi i uloga glikozilacije antitijela IgA u ovoj bolesti nisu dovoljno istraženi [13]. Pretpostavlja se da upravo glikani na molekuli IgA moduliraju njegovo imunsko djelovanje i vezanje na receptore. *N*-glikozilacija serumskog antitijela IgA zasada je slabo istražena u kontekstu bolesti i upalnih stanja te je ovo prvo istraživanje koje je istražilo *N*-glikozilacijske obrasce serumskog oblika antitijela IgA u ŠBT1 kod djece i odraslih te serumskih proteina u odrasloj populaciji sa ŠBT1. U ovom istraživanju sam identificirao glikanske strukture uključene u razvoj i tijek ŠBT1 te sugerirao dijagnostički potencijal glikana, njihovu ulogu u ovoj bolesti i time ukazao na potencijalne terapijske mete. Obzirom na nedovoljno poznate uzroke razvoja ove bolesti te potrebu za kvalitetnijim kliničkim praćenjem, rezultati mog istraživanja predstavljaju doprinos u razumijevanju, prevenciji i liječenju ŠBT1.

## Ciljevi rada

- Identificirati *N*-glikanske strukture ukupnih serumskih proteina koje se razlikuju u odrasloj populaciji pacijenata sa ŠBT1 i zdravih kontrola.
- Usporediti ove razlike s razlikama prijavljenima u literaturi za dječju populaciju kako bi se pružio uvid u specifične promjene *N*-glikozilacijskih obrazaca između dvije skupine.
- Ispitati utjecaj trajanja bolesti i statusa komplikacija na *N*-glikozilacijski profil serumskih proteina.
- Identificirati *N*-glikanske strukture antitijela IgA koje se razlikuju kod djece sa ŠBT1 i zdravih kontrola.
- Identificirati *N*-glikanske strukture antitijela IgA koje se razlikuju u odrasloj populaciji pacijenata sa ŠBT1 i zdravih kontrola.

## Metode

- Antitijelo IgA sam iz ljudske plazme i seruma izolirao afinitetnom kromatografijom, čime sam specifično iz smjese izdvojio željeni protein, bez potrebe dodatnog pročišćavanja.
- Serumske proteine i antitijela IgA deglikozilirao sam endoglikozidaznim enzimom.
- Oslobođene *N*-glikane sam nakon toga obilježio fluorescentnom bojom te ih pročistio iz smjese ekstrakcijom na čvrstoj fazi temeljenoj na hidrofilnim interakcijama.
- Razine fluorescentno obilježenih *N*-glikana ukupnih serumskih proteina, kao i *N*-glikana antitijela IgA, analizirao sam tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti pri čemu će se separacija glikanskih pikova temeljiti na hidrofilnim interakcijama, a detekciju istih vršio sam pomoću fluorescencijskog detektora.
- Statističku obradu rezultata odradio sam pomoću programskog jezika R. Asocijacije između razina *N*-glikana i ostalih varijabli analizirao sam mješovitim i općim linearnim modelom. Zbog višestrukog testiranja, *p*-vrijednosti sam korigirao Benjamini-Hochberg i Li Ji metodama. *P*-vrijednost manju od 0,05 smatrao sam značajnom.

## Polazne hipoteze

1. Postoji razlika u *N*-glikozilaciji ukupnih serumskih proteina i antitijela IgA kod ispitanika sa ŠBT1 u odnosu na zdrave ispitanike.
2. *N*-glikozilacija serumskih proteina mijenja se ovisno o: a) glikemijskom statusu bolesnika, b) trajanju šećerne bolesti te c) stupnju komplikacija šećerne bolest

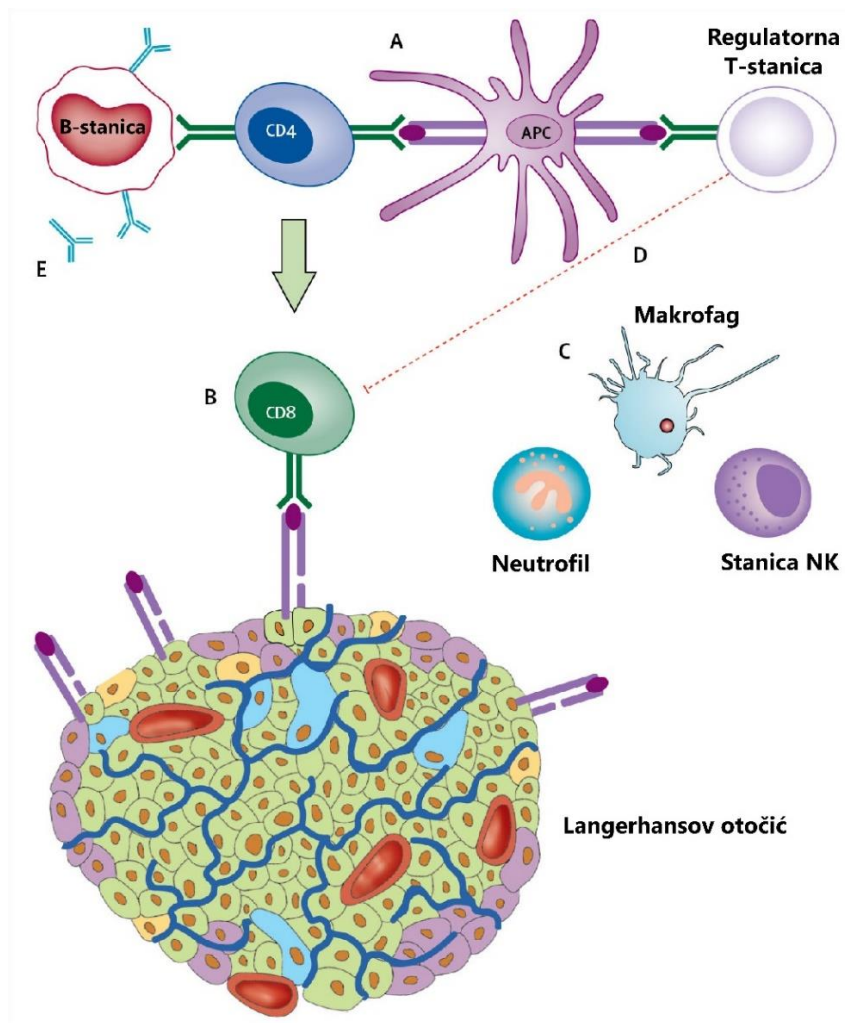
## **2. LITERATURNI PREGLED**

## 2.1. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (ŠBT1) kronična je autoimuna bolest karakterizirana nedostatkom inzulina i posljedičnom hiperglikemijom, a predstavlja udio od 5-10 % svih šećernih bolesti [1]. Bolest je uzrokovana autoimunom destrukcijom  $\beta$ -stanica gušterače, zaduženih za proizvodnju inzulina, pri čemu dolazi do gubitka tolerancije imunskog sustava prema vlastitim antigenima [19]. Incidencija i prevalencija ŠBT1 u porastu su u cijelom svijetu [2,20]. Učestalost ŠBT1 brzo raste u svim populacijama, a najveći primijećeni porast incidencije te bolesti je među djecom mlađom od 15 godina, osobito kod mlađih od 5 godina, s vremenom udvostručenja manjim od 20 godina u Europi [21,22]. Suprotno tome, zanimljiva je činjenica da je za 2022. godinu prijavljeno da su čak 62 % novodijagnosticiranih ŠBT1 činile osobe starije od 20 godina [23]. Unatoč porastu incidencije u svijetu, glavni uzrok bolesti i dalje ostaje nepoznat te se pokazuje sve veća potreba za preciznijim dijagnosticiranjem i razlikovanjem šećernih bolesti te njenim kontinuiranim praćenjem i regulacijom.

Za razvoj bolesti postoje genetičke predispozicije HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*) i HLA-nepovezanih faktora [19]. Prisustvo autoantitijela izrazito je povezano s kombinacijama HLA alela [24] te predstavlja značajan rizik za razvoj bolesti, dok su HLA-nepovezani faktori u pravilu asocirani s raznim funkcijama T- i B-limfocita [25,26]. Za ŠBT1 smatra se da proizlazi iz višestranog međudjelovanja okolišnih čimbenika, mikrobioma, genetike, metabolizma i imunskog sustava. Uz genetičke predispozicije, za razvoj bolesti bitni su i okolišni čimbenici za koje se pretpostavlja da služe kao okidači razvoja bolesti. Smatra se da viralne infekcije, primarno enterovirusima, značajno doprinose začetku autoimunog poremećaja kod osoba s predispozicijom ili doprinose ubrzanju razvoja kliničke šećerne bolesti iz faze pojave prvih autoantitijela [24,27,28]. Ostali okolišni čimbenici koji potencijalno igraju ulogu u razvoju ŠBT1 su prehrana u ranim fazama života, nedostatak vitamina D, higijena, hladnija klima, okolišno zagađenje, mikrobiom pojedinca, infekcije ostalim virusima, bakterijama, gljivicama, antibiotici i slično [29,30]. Nakon stupanja u interakciju s okolišnim okidačima, smatra se da je razvoj ŠBT1 (Slika 1) u osjetljivih pojedinaca iniciran prezentacijom peptida  $\beta$ -stanica od strane antigen-prezentirajućih stanica (engl. *Antigen presenting cells*, APC). APC koje prezentiraju autoantigene migriraju u limfne čvorove gušterače te stupaju u interakciju s autoreaktivnim CD4<sup>+</sup> T-limfocitima, koji zauzvrat posreduju u aktivaciji autoreaktivnih CD8<sup>+</sup> T-stanica (Slika 1, A). Aktivirane CD8<sup>+</sup> T-stanice na Langerhansovim otočićima liziraju  $\beta$ -stanice koje ekspimiraju imunogene vlastite antigene na površinskim

makromolekulama MHC (engl. *Major histocompatibility complex*) klase 1 (Slika 1, B). Uništavanje  $\beta$ -stanica dodatno je stimulirano otpuštanjem proupalnih citokina i reaktivnih kisikovih oblika iz urođenih imunskih stanica, odnosno makrofaga, prirodnih ubilačkih stanica (engl. *Natural killer cells*) i neutrofila (Slika 1, C). Cijeli ovaj proces je pojačan defektima u regulatornim T-limfocitima, koji ne potiskuju učinkovito autoimunski odgovor (Slika 1, D). Aktivirane T-stanice unutar limfnih čvorova gušterače također stimuliraju B-limfocite na proizvodnju autoantitijela protiv antigena  $\beta$ -stanica (Slika 1, E). Ta autoantitijela protiv glutamat dekarboksilaze (engl. *Glutamic acid decarboxylase 65-kilodalton isoform*, GAD65), inzulina, tirozin fosfataza (engl. *Insulinoma antigen 2*, IA-2; *Insulinoma antigen 2 beta*, IA-2b) te cinkovog transportera 8 (engl. *Zinc transporter 8*, ZnT8), mogu se mjeriti u cirkulaciji i smatraju se definirajućim biomarkerom ŠBT1 te se koriste kao autoimuni marker za predviđanje nastupanja kliničkog početka bolesti [31].



**Slika 1.** Imunopatogeneza ŠBT1. Preuzeto i prilagođeno iz DiMeglio i sur. 2018. [19].  
Stanica NK ili prirodno ubilačka stanica (engl. *Natural killer*).



Uništavanje  $\beta$ -stanica dovodi do nedostatka inzulina i povišene koncentracije glukoze u krvi te posljedično do oksidativnih oštećenja uzrokovanih glukozom [32] i popratnih patofizioloških promjena koje se također odražavaju u aberantnoj ekspresiji i/ili funkciji većinom serumskih i jetrenih proteina, na primjer razine molekula MBL (engl. *Mannan-binding lectin*) i štetna aktivacija komplementa rastu kao posljedica šećerne bolesti [33,34]. Zbog navedenih promjena, osobe koje boluju od ŠBT1 uvijek su pod rizikom od razvoja dijabetičkih komplikacija koje su često uzrokovane lošom glikemijskom regulacijom te prisustvom rizičnih faktora kao što su pušenje, genetičke predispozicije, povišen krvni tlak [35]. Komplikacije mogu biti makrovaskularne (koronarna bolest srca, periferna vaskularna bolest i moždani udar), mikrovaskularne (neuropatija, retinopatija, nefropatija) ili i mikro- i makrovaskularne (dijabetičko stopalo). Mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti znatno narušavaju kvalitetu života i daljnju prognozu, zbog čega postoji potreba za njihovim predviđanjem, prevencijom, ranom dijagnostikom i tretmanom.

Unatoč utvrđenim genetskim temeljima, kod osoba dijagnosticiranih ŠBT1 često nedostaje obiteljska povijest bolesti ili čak najrizičnija kombinacija HLA alela. Posljedično, napori da se spriječi bolest u njenom primarnom stadiju suočavaju se sa značajnim izazovima. Iako su učinjeni značajni pomaci u poboljšanju preživljenja i dobrobiti pacijenata, osobito u posljednjih 25 godina, lijek za ŠBT1 i dalje ostaje nedostižan [36]. Nadalje, unatoč tehnološkom napretku, mnogi pojedinci sa ŠBT1 bore se za postizanje optimalne glikemijske kontrole i prevenciju dijabetičkih komplikacija, a brojni pojedinci ne mogu pristupiti modernim terapijama zbog manjka dotičnih ili previsokih troškova terapija.

Rastući napori za otkrivanje uzroka, poboljšanje dijagnoze, mogućnosti liječenja, ali i smanjenje rizika od mogućih komplikacija također su doveli do prepoznavanja potencijala *N*-glikana u području diabetologije.

## **2.2. *N*-glikozilacija proteina**

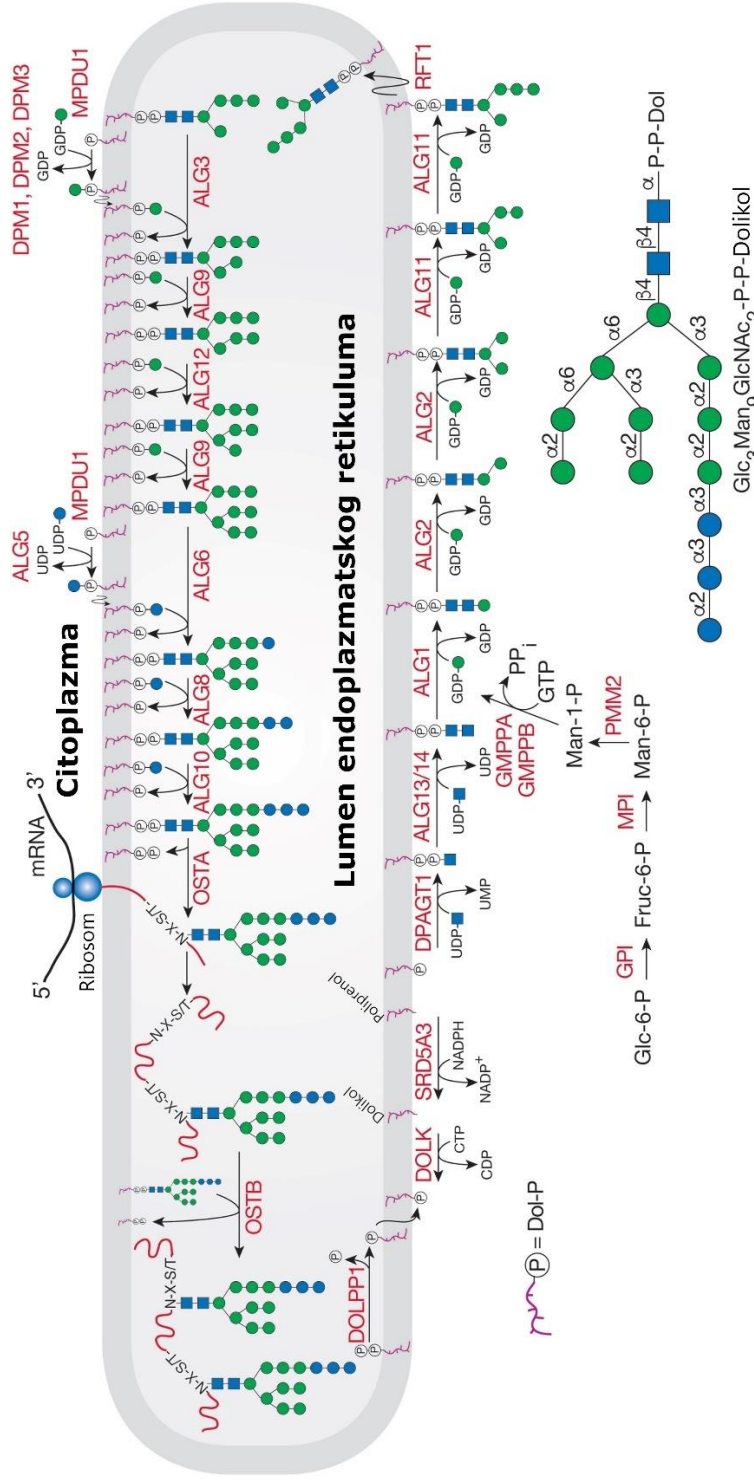
Glikozilacija je složena enzimska reakcija pomoću koje se kompleksne oligosaharidne strukture, odnosno glikani, sintetiziraju i dodaju na različite biološke makromolekule, primarno proteine i lipide. Većina glikana nalazi se na vanjskim površinama staničnih i sekretornih makromolekula te ih karakterizira iznimna raznolikost. Jednostavni i dinamični glikani vezani za proteine prisutni su u jezgri i citoplazmi stanica, gdje imaju regulatorne uloge, dok se

kompleksniji glikani često nalaze na sekretornim proteinima ili na površini stanice. Uz formiranje važnih strukturnih značajki, glikani makromolekula moduliraju ili posreduju u širokom spektru funkcija proteina [37]. Glikozilacija proteina uključuje dodavanje *N*-glikana, *O*-glikana, fosforiliranih glikana, glikozaminoglikana te glikozilfosfatidilinozitolnih sidra na peptidne okosnice kao i *C*-manozilaciju triptofana [5]. Budući da se ovo istraživanje bavi *N*-glikozilacijom, ovaj proces je nadalje opisan.

*N*-glikozilacija je evolucijski visoko očuvana ko- i post-translacijska modifikacija [3] prisutna u više od 7000 proteina ljudskog proteoma [38]. *N*-glikozilacija znatno utječe na strukturu i funkciju proteina te je uključena u procese poput smatanja i prijenosa signala, ali ima ulogu i u razvoju, neurogenezi i imunitetu gdje regulira funkciju proteina [37]. Stoga je strogo regulirana mrežom gena i odgovarajućih proteina poput glikoziltransferaza, glikozidaza, ali i transkripcijskih faktora [4], budući da je većina glikozidaza i glikoziltransferaza diferencijalno eksprimirana i vrlo osjetljiva na fiziološka stanja stanice [3].

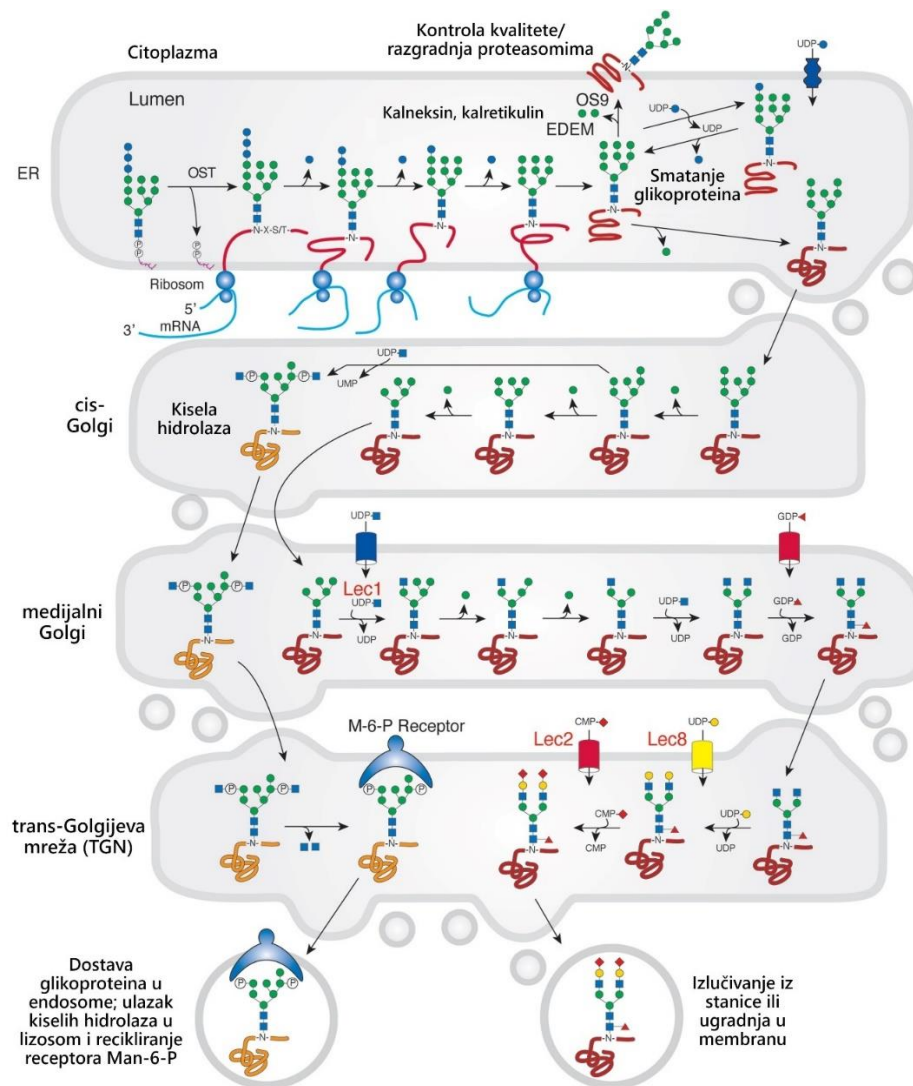
### 2.2.1. Biosinteza *N*-glikana

Biosinteza *N*-glikana te sama *N*-glikozilacija proteina je složen, dvofazni proces koji se odvija u dva odjeljka eukariotskih stanica: u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom tijelu. U prvoj fazi (Slika 2), *N*-glikani se sintetiziraju na citoplazmatskoj strani membrane ER-a na lipidnom nosaču, dolikol-fosfatu, do strukture  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  nakon čega se translociraju u lumen ER-a. Oligosahardi se u lumenu nadograđuju manozom i glukozom do strukture od 14 šećernih podjedinica ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , Glc – glukoza, Man – manoz, GlcNAc – *N*-acetilglukozamin) te zatim kovalentno vežu na atom dušika u bočnom ogranku asparagina u aminokiselinskom slijedu As*N*-X-Ser/Thr [3], odakle dolazi i naziv *N*-glikozilacija.



**Slika 2.** Prva faza biosinteze *N*-glikana u endoplazmatskom retikulumu. Preuzeto i prilagođeno iz Stanley i sur., 2022. [3]. ALG1 – engl. *Asparagine-Linked Glycosylation 1 Homolog*, hitobiosildifosfodolokol-beta-manoziltransferaza; ALG10 – alfa-1,2-glukoziltransferaza; ALG11 – alfa-1,2-manoziltransferaza; ALG12 – alfa-1,6-manoziltransferaza; ALG13/14 – podjedinice UDP-*N*-acetilglukoizaminitransferaze; ALG2 – alfa-1,3/1,6-manoziltransferaza; ALG3 – alfa-1,3-manoziltransferaza; ALG5 – dolokol-fosfat beta-glukoziltransferaza; ALG6 – alfa-1,3-glukoziltransferaza; ALG8 – alfa-1,3-glukoziltransferaza; ALG9 – alfa-1,2-manoziltransferaza; CDP – citidin difosfat; CTP – citidin trifosfat; DPM1 – podjedinica 1 dolokol-fosfat manoziltransferaze; DPM2 – podjedinica 2 dolokol-fosfat manoziltransferaze; DPM3 – podjedinica 3 dolokol-fosfat manoziltransferaze; DOLK – dolokol-fosfat kinaza; Dol-P – dolokol fosfat; DOLPP1 – dolokol fosfataza 1; DPAGT1 – dolokol-fosfat *N*-acetilglukoizaminitransferaza 1; Fru-6-P – fruktoza-6-fosfat; GDP – gavnozin difosfat; Glc-6-P – glukoza-6-fosfat; GMPPA – pirofosforilaza A GDP-manoze; GMPPB – pirofosforilaza B GDP-manoze; GTP – gavnozin trifosfat; Man-1-P – manozna-1-fosfat; Man-6-P – manozna-6-fosfat; MPI – manozna-6-fosfat; PMM2 – pirofosforilaza B GDP-manoze; NADPH – reducirani oblik NADP; OSTA – oligosahariltransferaza A; OSTB – oligosahariltransferaza B; PMM2 – fosfomanomutaza 2; PP<sub>i</sub> – inorganski pirofosfat; RFT1 – engl. *Requiring fifty three 1*, translokaza Man(5)GlcNAc (2)-PP-Dolikola; SRD5A3 – steroidna 5-alfa-reduktaza 3; UDP – uridin difosfat; UMP – uridin monofosfat

Druga faza (Slika 3) odvija se u ER-u i Golgijevom tijelu te uključuje opsežnu obradu *N*-glikana. U ER-u se podjedinice glukoze uzastopno uklanjaju, što rezultira stvaranjem oligosaharida  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Navedena struktura ima ulogu u smatanju proteina pri čemu se tijekom smatanja uklanjaju terminalna glukoza te jedna manoza. U slučaju nepravilnog smatanja dolazi do ponovnog glukoziliranja *N*-glikana krivo smotanih proteina i njihovog prepoznavanja što osigurava kontrolu kvalitete tog procesa.

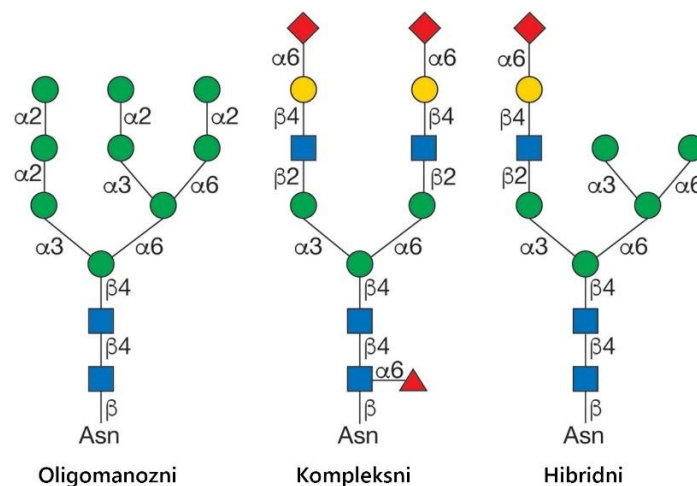


**Slika 3.** Druga faza biosinteze *N*-glikana u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom tijelu.

Preuzeto i prilagođeno iz Stanley i sur., 2022. [3]. CMP – citidin monofosfat; ER – endoplazmatski retikulum; EDEM – engl. *ERAD-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein* (ERAD – engl. *ER-associated degradation*); GDP – gvanozin difosfat; Lec1 – transferaza *N*-acetilglukozamina 1; Lec2 – transporter CMP-sijalinske kiseline; Lec8 – transporter UDP-galaktoze; M-6-P – manoza-6-fosfat; OS9 – protein OS9 (engl. Amplified in osteosarcoma 9); OST – oligosahariltransferaza; UDP – uridin difosfat.

Daljnja obrada nastavlja se u Golgijevom tijelu, gdje pod djelovanjem različitih glikoziltransferaza i glikozidaza dolazi do sazrijevanja *N*-glikana. Proces u Golgijevom tijelu uključuju skraćivanje oligosaharidne strukture, odnosno uklanjanje manoz, dodavanje antenarnog ili račvajućeg GlcNAc-a, galaktoze, sijalinske kiseline te antenarne ili sržne fukoze. Navedeni procesi su regulirani dostupnošću supstrata, aktivnošću enzima, razinama transkripcije gena i lokacijom enzima unutar organela, što sve zajedno dovodi do nastanka raznovrsnih složenih struktura s različitim brojem šećernih podjedinica, grananjem, sastavom, duljinom i tipovima vezanja šećera [3]. Zanimljivo je da glikom određene stanice zapravo odražava njezin jedinstveni obrazac ekspresije gena, koji određuje razine enzima odgovornih za glikozilaciju. Za razliku od genoma ili proteoma, kod glikoma ne postoji predložak po kojem nastaje, već je složeno kontroliran na više razina u ER-u i Golgijevom tijelu.

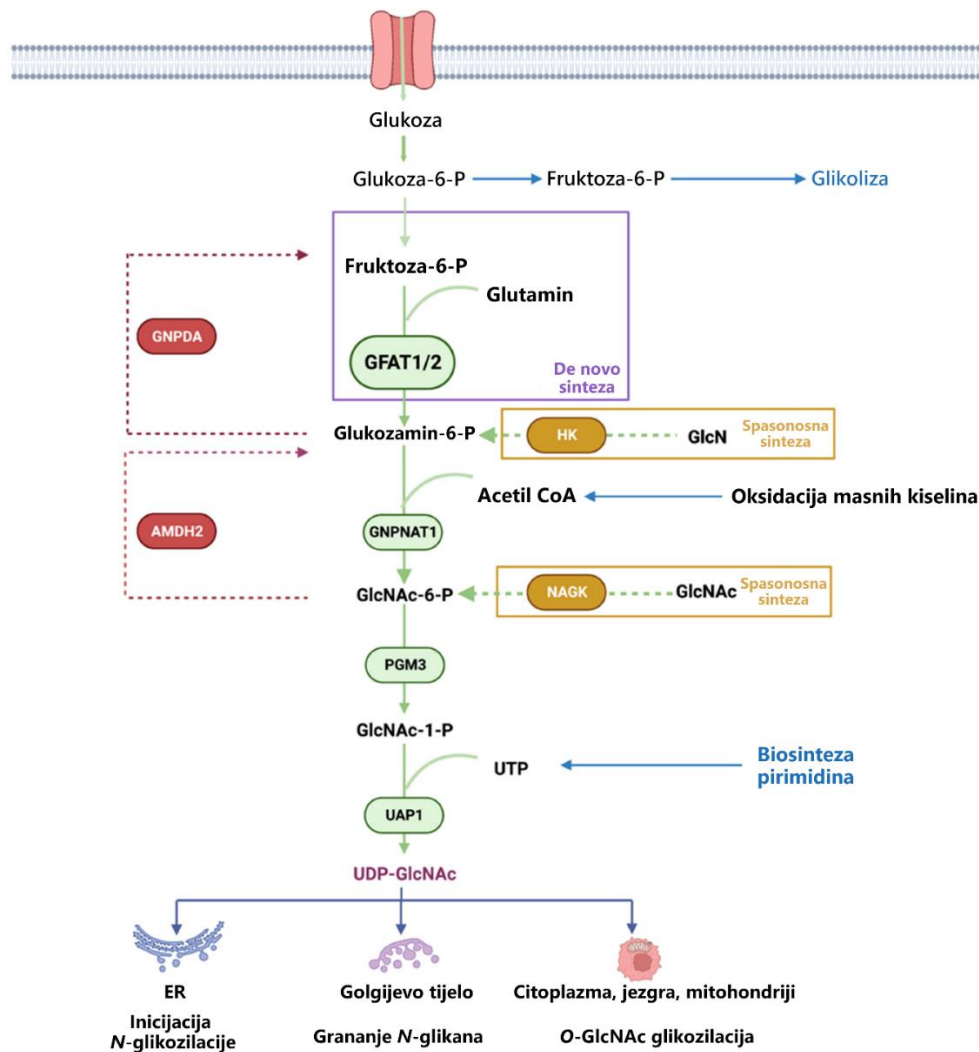
Zbog opisanog biosintetskog puta, *N*-glikani predstavljaju vrlo heterogenu skupinu modifikacija. Međutim, svi *N*-glikani eukariota sadrže zajedničku jezgru od pet šećernih podjedinica ( $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$ ) te se dijele u tri glavna tipa: 1) oligomanozni, kod kojeg su isključivo manoze vezane na šećernu jezgru; 2) kompleksni, kod kojeg su antene započete GlcNAc-om vezane na šećernu jezgru; 3) hibridni, kod kojeg su manoze vezane na granu jezgre  $\text{Man}\alpha 1-6$ , dok su na granu  $\text{Man}\alpha 1-3$  vezane antene započete GlcNAc-om (Slika 4).



**Slika 4.** Tri tipa *N*-glikanskih struktura. Šećerne podjedinice su prikazane simbolima: plavi kvadrat predstavlja GlcNAc, zeleni krug predstavlja manozu, žuti krug predstavlja galaktozu, crveni trokut fukoze te crveni romb sijalinsku kiselinu. Simboli  $\alpha$  i  $\beta$  predstavljaju tip veze između dvije podjedinice, dok brojčana vrijednost predstavlja atom u prstenu šećera na koji se susjedna podjedinica veže. Preuzeto i prilagođeno iz Stanley i sur., 2022. [3].

### 2.2.2. Biosintetski put heksozamina

Biosintetski put heksozamina (engl. *Hexosamine biosynthesis pathway*, HBP) ima važnu ulogu u sintezi glikana. To je metabolički put koji je odgovoran za proizvodnju molekule uridin-difosfat-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) iz fruktoza-6-fosfata (Slika 5) [39,40]. UDP-GlcNAc je nukleotidni šećer i koenzim u metabolizmu koji služi kao esencijalan supstrat za sintezu raznih glikokonjugata, uključujući glikoproteine, proteoglikane i glikolipide [41]. U HBP-u se kroz seriju biokemijskih reakcija glukoza pretvara u UDP-GlcNAc, koji se zatim koristi u drugoj fazi *N*-glikozilacije u Golgijevom tijelu. U normalnim fiziološkim uvjetima oko 3 % glukoze se koristi u putu HBP [42], međutim moguće je da je u uvjetima hiperglikemije priljev glukoze u HBP povećan. Aktivnost enzima unutar Golgijevog tijela i razine UDP-GlcNAc, supstrata potrebnog za grananje glikanskih struktura, određuju stupanj razgranatosti glikana tj. nastajanje biantenarnih, triantenarnih i tetraantenarnih struktura, koji sazrijevaju do svog konačnog oblika [43,44]. Povećan priljev glukoze u HBP dovodi do povećanih razina dostupnog UDP-GlcNAc, stoga i do kompleksnijih i razgranatijih *N*-glikana [44,45]. Za navedeno se pretpostavlja da je potencijalan uzrok povećanja udjela kompleksnih i visoko razgranatih glikoformi kod odraslih osoba sa ŠBT1, šećernom bolesti tipa 2 (ŠBT2), ali i kod zdravih osoba s povećanim rizikom od razvoja šećerne bolesti u budućnosti [7,46–49]. HBP je strogo reguliran dostupnošću nutrijenata koji se koriste u ovom metaboličkom putu (uključujući glutamin, glukozu, acetil-koenzim A i uridin-trifosfat), signalnim molekulama osjetljivima na okolišne uvjete te transkripcijskim faktorima regulirani stresom [50]. Povišena aktivnost u HBP-u povezana je s inzulinskom rezistencijom i šećernom bolesti [51]. Navedenom doprinosi poremećeni transport glukoze u tkiva i stanice, aberantna *N*-glikozilacija transportera glukoze te aberantna modifikacija *O*-vezanim GlcNAc-om utječući pritom na proteine inzulinske signalizacije i metaboličke regulatore [50].



**Slika 5.** Biosintetski put heksozamina. *De novo* sintezu molekule UDP-GlcNAc kataliziraju enzimi GFAT1/2 (glutamin-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza 1 i 2), koji koriste glutamin i fruktozu-6-fosfat (metabolit glikolize) kao supstrate za stvaranje glukozamin-6-fosfata. Naknadne reakcije kataliziraju metabolički enzimi da bi se na kraju stvorio UDP-GlcNAc, metabolit koji se koristi za *N*-glikozilaciju proteina, grananje *N*-glikana i dodavanje *O*-vezanog šećera GlcNAc. Molekula UDP-GlcNAc također se može generirati korištenjem postojećeg glukozamina (GlcN) i *N*-acetilglukozamina (GlcNAc). Preuzeto i prilagođeno iz Paneque i sur., 2023. [50]. AMDH2 – engl. *Amidohydrolase Domain Containing 2* (GlcNAc-6-fosfat deacetilaza; CoA – koenzim A; ER – endoplazmatski retikulum; GFAT1/2 – glutamin-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza i glutamin-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza 2; GlcN – glukozamin; GNPDA – glukozamin-6-fosfat deaminaza; GNPAT1 – glukozamin-6-fosfat *N*-acetiltransferaza 1; HK – heksokinaza; NAGK – *N*-acetilglukozamin kinase; P – fosfat; PGM3 – fosfoacetilglukozamin mutaza; UAP1 – UDP-*N*-acetilheksozamin pirofosforilaza 1; UDP-GlcNAc – uridin difosfat *N*-acetilglukozamin; UTP – uridin trifosfat.



### 2.2.3. *N*-glikozilacija u ŠBT1

S obzirom na značaj *N*-glikozilacije, utvrđeno je da su promjene glikozilacije proteina karakteristične za brojna ljudska patološka stanja te su u nekim slučajevima i same promjene glikozilacije identificirane kao glavni uzrok bolesti [3,52]. Aberantna glikozilacija određenih proteina povezuje se i s raznim autoimunim bolestima [5] između ostalog i sa ŠBT1 [6–9]. *N*-glikozilacija plazmatskih proteina je opisana u različitim šećernim bolestima, uključujući ŠBT1, ŠBT2, šećernu bolest zrele dobi kod mladih osoba uslijed mutacije HNF1A (engl. *Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A*) gena (engl. *Maturity-onset diabetes of the young*, HNF1A-MODY) i inzulinsku rezistenciju [7,46–48,53,54]. Od posebnog značaja su rezultati nekoliko istraživanja koji na temelju *N*-glikanskih profila sugeriraju mogućnost razlikovanja tipova šećerne bolesti ili identificiranja osoba s povišenim rizikom od razvoja ŠBT2 [46,47,53–55]. Jedno od važnijih otkrića uključuje promjene u *N*-glikozilaciji glukoznog transportera-2 (Glut-2) u  $\beta$ -stanicama gušterače u ŠBT2, što uzrokuje ometanje sekrecije inzulina i predstavlja potencijalnu terapijsku metu za prevenciju i liječenje šećerne bolesti [56,57].

Nadalje, sve veći broj istraživanja pokazuje da *N*-glikani igraju značajnu ulogu u etiologiji određenih poremećaja s autoimunom pozadinom. U ŠBT1, jedan od detaljno istraživanih gena koji je impliciran u patogenezi bolesti kodira glikoziltransferazu MGAT5 ( $\alpha$ -1,6-manozilglikoprotein- $\beta$ -1,6-*N*-acetilglukozaminiltransferaza A) [58] te se smatra da utječe na regulaciju reaktivnosti T-stanica [44,59]. Aktivacija i signalizacija T-limfocita zahtijevaju grupiranje određenog broja receptora T-stanica (engl. *T-cell receptor*, TCR) na mjestu prezentacije antigena, što ovisi o različitim čimbenicima, uključujući tip stanice koja prezentira antigen, stanje T-stanice i prirodu TCR liganda. *N*-glikozilacija receptora TCR, posebno prisutnost visoko razgranatih *N*-glikana proizvedenih od strane enzima MGAT5, ograničava mobilnost tih receptora i grupiranje ovisno o antigenu, vezanjem visoko razgranatih *N*-glikana na lektine stanične površine. Manjak enzima MGAT5 snižava pragove aktivacije T-stanica, povećavajući grupiranje receptora TCR ovisno o ligandu [59].

Kao što je već navedeno, enzim MGAT5 je odgovoran za proizvodnju visoko razgranatih *N*-glikana, koji su poželjni intermedijeri za produljenje s poli-*N*-acetil-laktozaminom, ligandom za galektinsku obitelj lektina. Osim moduliranja mobilnosti i grupiranja receptora TCR, galektini imaju i druge važne imunomodulatorne uloge, uključujući sposobnost induciranja apoptoze aktiviranih T-stanica, služeći kao ključni regulatori imunskog odgovora. Štoviše, enzim MGAT5 je također uključen u negativnu regulaciju proliferacije T-



stanica, autoimunosti i endocitoze proteina CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). Protein CTLA-4 ima ključnu ulogu u supresiji imunskih odgovora, a gen *CTLA-4* smatra se kandidatnim genom koji uzrokuje ŠBT1. Ovaj glikoprotein funkcionira kao imunosna kontrolna točka, budući da njegovo regrutiranje na površinu T-stanica prekida antigenski odgovor T-stanica. Prisutnost proteina CTLA-4 na površini stanice regulirana je njegovim *N*-glikanima koji se vežu za galektine, a koje proizvodi enzim MGAT5 [44]. Navedena činjenica dodatno potvrđuje ulogu *N*-glikozilacije u imunoregulaciji. Grananje *N*-glikana, uključujući ono posredovano enzimom MGAT5, stimulirano je metabolitima biosintetskog puta heksozamina, kao što je GlcNAc. *In vivo* istraživanja na miševima NOD (engl. *Non-obese diabetic*, životinjski model autoimune šećerne bolesti) otkrila su da oralna suplementacija GlcNAc-om dovodi do povećanog grananja glikana na površini T-stanica, sprječavajući razvoj autoimune šećerne bolesti [60]. Ovo otkriće ukazuje na potencijalne terapijske pristupe temeljene na metaboličkim intervencijama u prevenciji i liječenju ŠBT1. Genetička istraživanja također su identificirala gen za fukoziltransferazu 2 (*FUT2*), kao jedan od kandidatnih gena koji uzrokuje ŠBT1 [26], s mogućim mehanizmom koji uključuje otpornost domaćina na infekcije [61].

Neka od najnovijih istraživanja u području glikomike bila su usredotočena na istraživanje veze između genskih i glikanskih svojstava u djece na početku ŠBT1. U jednom od tih istraživanja su potvrđene asocijacije ŠBT1 s genima koji kodiraju enzime povezane s glikozilacijom te su pronađene nove asocijacije također povezane s biosintezom glikana, uključujući već navedene gene za enzime MGAT5 i FUT2, ali i gene za enzime MGAT3 ( $\beta$ -1,4-manozilglikoprotein 4- $\beta$ -*N*-acetilglukozaminiltransferaza) te ST6GAL1 (ST6  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ -2,6-sijaliltransferaza 1). Uz navedeno je pokazano da alelne varijante *N*-glikozilacijskih i komplementarnih gena doprinose promijenjenoj *N*-glikozilaciji proteina plazme i imunoglobulina G (IgG) u djece na početku bolesti u usporedbi s njihovom zdravom braćom i sestrama [62]. Dodatno, prethodno neprijavljene genske asocijacije pronađene su na kromosomu 22 za specifične vrste glikoziliranih molekula IgG. Otkriveno je i da su određene promjene u sastavu *N*-glikoma proteina plazme povezane s *missense* mutacijom gena *C3* na kromosomu 19, koji kodira komponentu komplementa C3 [62]. Identificirana mutacija dovodi do promjene cikličke u acikličku aminokiselinu unutar proteina C3 i pokazuje značajnu povezanost sa smanjenjem oligomanoznih *N*-glikana na proteinima plazme. Štoviše, komponenta komplementa C3 također nosi takve oligomanozne *N*-glikane u blizini domene vezanja patogena, što bi potencijalno moglo interferirati s aktivacijom komplementa.

Drugo istraživanje *N*-glikozilacije plazmatskih proteina i antitijela IgG u djece novodijagnosticirane ŠBT1 su pokazala da visoko manozilirane strukture i strukture s račvajućim GlcNAc-om pozitivno asociraju sa ŠBT1, dok monogalaktozilirani glikani pokazuju negativnu korelaciju [9]. Nadalje, povećanje broja različitih autoantitijela, prediktora napredovanja do kliničke šećerne bolesti, praćeno je smanjenjem nekih od visoko razgranatih *N*-glikana u plazmi [9]. U navedenom istraživanju definirane su promjene *N*-glikana koje prate pojavu ŠBT1, a mogu imati potencijalnu ulogu u samim procesima bolesti ili biti važni indikatori tog procesa. Također je pokazan visok diskriminativni potencijal *N*-glikana te razvijen prediktivni model temeljen na profilima *N*-glikana koji bi mogao biti vrijedan alat u procjeni rizika od razvoja bolesti kod djece [9]. Unatoč tome, ostaje pitanje ponašanja i uloge glikozilacije u daljnjem tijeku bolesti u odrasloj populaciji sa ŠBT1.

Istraživanja na odrasloj populaciji sa ŠBT1 pokazuju da su razne dijabetičke komplikacije povezane su s promjenama u *N*-glikozilaciji ukupnih serumskih proteina. Primijećeno je da pacijenti s povećanim izlučivanjem albumina u mokraći pokazuju značajno povećanje  $\alpha$ -1,3-fukozilacije proteina akutne faze,  $\alpha$ -1-kiselog glikoproteina (engl.  *$\alpha$ -1-acid glycoprotein*, AGP) [6]. Nadalje, ispitana je i veza između dijabetičke bolesti bubrega i *N*-glikoma proteina ljudske plazme. Markeri procjene funkcije bubrega, uključujući veći omjer albumina i kreatinina i strmiji pad procijenjene brzine glomerularne filtracije, povezani su s povećanom galaktozilacijom, sijalinizacijom i grananjem *N*-glikana serumskih proteina [7,8]. Ovi rezultati upućuju na to da povećana kompleksnost *N*-glikana u plazmi odražava lošiju funkciju bubrega kod osoba sa ŠBT1. Također je je pokazana povezanost *N*-glikozilacije serumskih proteina (posebice porast kompleksnih, visoko-razgranatih, tri- i tetraantenarnih *N*-glikana te pad jednostavnih biantenarnih struktura) s lošom glikemijskom regulacijom, odnosno s povišenim postotkom glikiranog hemoglobina (HbA1c) [7,8]. Količina HbA1c proporcionalna je koncentraciji glukoze u krvi i vrlo precizno odražava srednju koncentraciju glukoze u prethodnih 8 – 12 tjedana te utječe na razvoj dijabetičkih komplikacija. U drugom istraživanju na dijabetičkoj retinopatiji pokazane su promjene u profilu *N*-glikana i povećanje sijaliniziranih *N*-glikana u staklovini oka kod osoba s proliferativnom dijabetičkom retinopatijom [63].

Istraživanja *N*-glikozilacije u području dijabetologije predstavljaju značajan korak u potrazi za markerima vaskularnih i bubrežnih komplikacija šećerne bolesti, kao i markerima za predviđanje nastupanja šećerne bolesti. Također je pokazan doprinos razumijevanju autoimunih

procesa u ŠBT1 te su identificirani geni i proteini koji bi mogli utjecati na razvoj bolesti, a time i potencijalne terapijske mete za prevenciju bolesti. Zbog navedenih informacija, od velikog će značaja biti daljnja istraživanja glikozilacije proteina koji bi mogli imati ulogu na sustavnoj ili molekularnoj razini u mehanizmima razvoja ili u procesima koji se događaju tijekom bolesti.

#### 2.2.4. Stabilnost *N*-glikoma

Istaknuto svojstvo *N*-glikoma koje omogućava analizu i usporedbu *N*-glikozilacije kod različitih pojedinaca u različitim stanjima, jest njegova izuzetna stabilnost unutar pojedinca tijekom vremena pod normalnim fiziološkim uvjetima [64–66]. No, istovremeno, važno je napomenuti da je *N*-glikom iznimno osjetljiv na različite patofiziološke procese [67–69]. Ova karakteristika potencira dijagnostički i prognostički značaj *N*-glikana kao potencijalno važnih biomarkera. Glikozilacijske modifikacije imaju značajan utjecaj na funkciju proteina. Uloga glikozilacije navise je istražena na antitijelu IgG kod kojeg se, primjerice, dodavanjem sijalinske kiseline na postojeću glikansku strukturu mijenja funkcija molekule IgG iz proupalne u protuupalnu [70]. Osim toga, dodavanje sržne fukoze na postojeći glikan molekule IgG utječe na vezanje tog antitijela na receptore FcγRIIIa (CD16a) koji se nalaze na površini imunskih stanica i smanjuje njegovu sposobnost uništavanja ciljanih stanica putem procesa stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima (ADCC, engl. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) [71]. Ovo svojstvo koristi se u razvoju terapijskih monoklonskih antitijela, budući da nedostatak sržne fukoze povećava njihovu kliničku učinkovitost putem procesa ADCC [72]. Navedeni primjer naglašava važnost metoda za preciznu analizu glikozilacije proteina te glikoinženjeringa.

#### 2.2.5. Metode analize *N*-glikozilacije

Analiza glikozilacije serumskih proteina primarno je omogućena razvojem visoko protočnih metoda, međutim taj razvoj je bio posebno izazovan zbog složene i heterogene strukture glikana [3]. Suvremena metodologija omogućava analizu glikozilacije na dvije razine: na oslobođenim glikanima, i na glikopeptidima. Glikopeptidi su fragmenti proteina dobiveni enzimskim cijepanjem, a na kojima se nalazi vezno mjesto glikana te dotična glikanska struktura. Metoda analize glikopeptida temelji se na sustavu tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) te pruža uvid u strukturu i distribuciju pojedinih glikana na specifičnim glikozilacijskim

mjestima. Prednosti ove metodologije uključuju visoku osjetljivost i preciznost identifikacije glikanskih struktura na glikopeptidima.

Oslobodeni glikani su glikani dobiveni postupkom deglikozilacije. Deglikozilacija je enzimski proces u kojem se djelovanjem endoglikozidaze, najčešće PNGase F (engl. *Peptide-N-Glycosidase F*), cijepa veza između prvog GlcNAc-a te atoma dušika na asparaginu na koji je glikanska struktura vezana. Upravo zbog deglikozilacije, ova metoda omogućava proučavanje strukture i sastav glikana neovisno o vezanom proteinu, a time i analizu glikozilacije smjese proteina. Oslobodeni glikani se u pravilu analiziraju tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC) ili kapilarnom elektroforezom. Međutim, važno je napomenuti da je za početnu analizu uzorka ili proteina potrebno prvo odrediti strukturu prisutnih glikana sustavom LC-MS, ukoliko za glikom od interesa ne postoje strukture i njihova retencijska vremena u bazama podataka. U slučaju da glikom postoji u bazama podataka, kromatografski sustav se kalibrira vanjskim standardom hidroliziranih oligomera glukoze pomoću koji se retencijska vremena pojedinačnih glikana pretvaraju u glukozne jedinice. Na temelju vremena eluiranja izmjenjenog u glukoznim jedinicama, moguće je kromatografske pikove glikana usporediti s referentnim vrijednostima za određivanje pojedinih struktura u piku. Razdvajanje glikana se temelji na hidrofilnim interakcijama, pri čemu se kompleksniji glikani sa većim brojem šećernih podjedinica dulje zadržavaju na koloni, dok se oni jednostavniji slabije vežu te prije izlaze iz kolone. Ovaj princip omogućuje precizno razdvajanje i analizu kompleksne smjese glikana kojima se zatim može odrediti relativna zastupljenost pojedinih glikanskih vrsta u kromatogramu.

### **2.3. Imunoglobulin A**

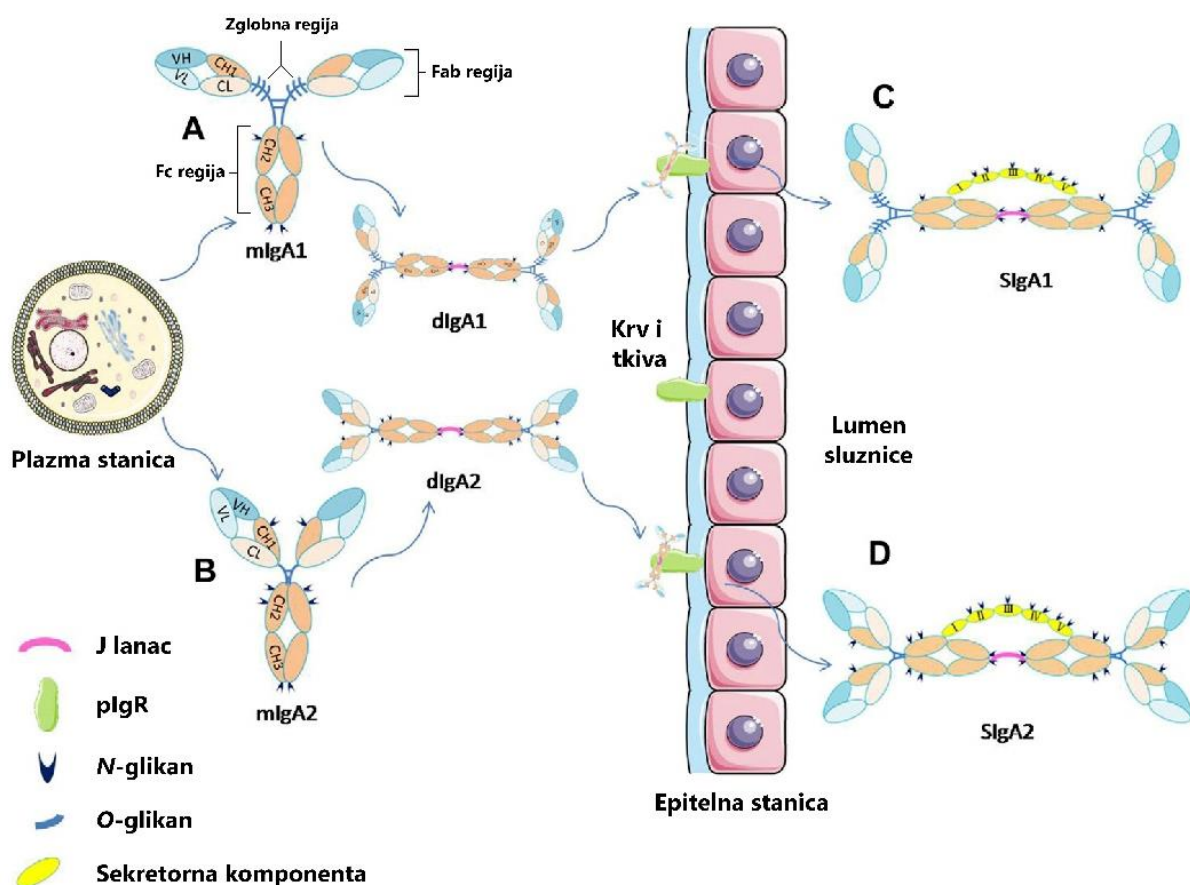
Imunoglobulini ili antitijela su glikoproteini koje proizvode plazma stanice te imaju važnu efektorsku ulogu u imunosnom sustavu [73]. Plazma stanice predstavljaju specifičnu vrstu bijelih krvnih stanica koje nastaju iz B limfocita u koštanoj srži. Njihova osnovna funkcija je proizvodnja antitijela za obranu organizma od bakterija i virusa te za suzbijanje infekcija i bolesti.

Molekula IgA je glavno antitijelo koje sudjeluje u obrani mukoznih površina kao što su sluznice gastrointestinalnog, genitourinarnog i respiratornog trakta [74]. Ima ključnu ulogu u

održavanju ravnoteže između tolerancije prema korisnim antigenima i zaštite od patogenih mikroorganizama. Mukozni oblik antitijela IgA čuva domaćina diversifikacijom mikrobioma, štiti od toksina i virusa, sprječava kolonizaciju štetnih bakterija, uklanja neželjene čestice i potiče uzorkovanje luminalnih antigena omogućujući imunološkom sustavu da prepozna potencijalno opasne antigene [75]. Antitijelo IgA je drugo najzastupljenije u serumu nakon antitijela IgG, međutim, za razliku od mukoznog antitijela IgA, uloge serumskog relativno su slabo istražene [11].

### 2.3.1. Struktura antitijela IgA

Antitijelo IgA se najbrže i najčešće proizvodi u ljudskom tijelu brzinom od 66 mg/kg po danu [76], što je više od svih ostalih imunoglobulina zajedno. To je heterodimerni protein koji je prema analizi genske sekvence i funkcionalnoj usporedbi sastavljen od dva teška lanca (lanac H, engl. *Heavy chain*) i dva laka lanca (lanac L, engl. *Light chain*) [77,78]. Molekula IgA smata se u različite globularne domene, uključujući četiri domene teškog lanca (engl. *Variable heavy chain domain*, VH; engl. *Constant heavy chain domain 1*, CH1; engl. *Constant heavy chain domain 2*, CH2; engl. *Constant heavy chain domain 3*, CH3) i dvije domene lakog lanca (engl. *Variable light chain domain*, VL; engl. *Constant light chain domain*, CL) (Slika 6, A) [74]. Funkcionalno, molekula IgA se može podijeliti na varijabilnu domenu odgovornu za vezanje na antigen (segment Fab, Slika 6, A) i konstantnu domenu koja je važna za vezanje na receptor Fc (segment Fc, Slika 6, A). Konstantne domene CH1 i CH2 povezane su sekvencom od 8 do 21 aminokiseline, koja se naziva zglobo područje (Slika 6, A). Osim toga, postoji konzervirana struktura repa koja se sastoji od 18 aminokiselina na C-terminusu regije CH3 na teškom lancu molekule IgA. Ova vrsta repa bitna je za formiranje dimernih i polimernih struktura molekula IgA [79].



**Slika 6.** Shematski prikaz strukture i procesa nastajanja serumske i sekretorne molekule IgA. Preuzeto i prilagođeno iz Ding i sur., 2022. [80]. CH1 - engl. *Constant heavy chain domain 1*; CH2 - engl. *Constant heavy chain domain 2*; CH3 - engl. *Constant heavy chain domain 3*; CL - engl. *Constant light chain domain*; dIgA1 - dimerna molekula podklase IgA1; dIgA2 - dimerna molekula podklase IgA2; mIgA1 - monomerna molekula podklase IgA1; mIgA2 - monomerna molekula podklase IgA2; pIgR - polimerni imunoglobulinski receptor; SIgA1 - sekretorni oblik molekule IgA1; SIgA2 - sekretorni oblik molekule IgA2; VH - engl. *Variable heavy chain domain*; VL - engl. *Variable light chain domain*.

U ljudskom tijelu antitijelo IgA može postojati u različitim oblicima. Monomerni oblik IgA (mIgA), koji je uglavnom prisutan u serumu, proizvode plazma stanice ili B-stanice marginalne zone u koštanoj srži, slezeni i limfnim čvorovima. Nasuprot tome, sekretorni oblik IgA (sIgA) na površinama sluznice ili u vanjskim izlučevinama obično se javlja u obliku dimera, iako mogu biti prisutne i male količine monomera, trimera i tetramera ili polimera s visokom molekularnom masom [74]. Antitijela sIgA izvorno proizvode lokalne plazma stanice u blizini epitela sluznice. Dimerni oblik IgA sastoji se od dva monomera povezanih J-lancem koji prijenosom u lumen dobiva sekretornu komponentu čime postaje sIgA (Slika 6, C i D). Sekretorna komponenta je hidrofilna i visoko (*N*- i *O*-) glikozilirana, negativno nabijena molekula koja štiti sekretorni oblik IgA od razgradnje u luminalnim sekretima [81].

Ljudsko antitijelo IgA se na temelju strukture može podijeliti u podklase IgA1 i IgA2 (Slika 6, A i B). Podklasa IgA1 čini 80-85 % ukupnog antitijela IgA (1-3 mg/ml) u ljudskom serumu te je u pravilu monomernog oblika [82], međutim, može se naći i mala količina dimernog ili polimernog oblika. Podklasa IgA1 također prevladava na mnogim mukoznim površinama uključujući nosnu, bronhijalnu, želučanu i sluznicu tankog crijeva, dok je podklasa IgA2 pretežno prisutna u debelom crijevu [83]. Aminokiselinske sekvence dviju podklasa imaju visoku sličnost, a strukturne razlike između njih uglavnom postoje u duljini i mjestima glikozilacije u zglobnoj regiji. Molekula podklase IgA1 ima dulju zglobnu regiju (13 aminokiselina više od molekule podklase IgA2) koja se sastoji od dvije ponovljene aminokiselinske sekvence bogate *O*-glikozilacijskim mjestima serina i treonina i visoko sijaliniziranim glikanima. U suštini, molekula podklase IgA1 sadrži veći broj *O*-glikozilacijskih mjesta te dva *N*-glikozilacijska mjesta po teškom lancu [80]. Skraćenom zglobu molekule podklase IgA2 nedostaju *O*-glikani i svaki teški lanac sadrži dva dodatna *N*-glikozilacijska mjesta [78], ali ima i nižu razinu sijalinizacije u odnosu na IgA1 [76,84]. Dok je molekula podklase IgA2 otporna na bakterijske proteaze koje su prisutne u lumenu mukoznih područja [82], zglobna regija molekule podklase IgA1 s *O*-glikozilacijom pomaže poboljšati prepoznavanje antigena, ali ju čini osjetljivijom na proteolitičko cijepanje [85].

### 2.3.2. Glikozilacija antitijela IgA

Glikozilacija antitijela IgA je ključna za njegovu biološku funkciju, uključujući vezanje bakterija, uklanjanje patogena i imunoregulaciju. Antitijelo IgA je poznato kao jedan od najobilnije glikoziliranih proteina među ljudskim imunoglobulinima. Dok je potvrđena značajna uloga glikozilacije antitijela IgG [86], istraživanje glikozilacije antitijela IgA i njene

uključenosti u povezane bolesti još je u ranoj fazi. Novija istraživanja pokazuju da su varijacije u glikozilaciji tog antitijela usko povezane s pojavom i razvojem mnogih bolesti. Na primjer, aberantno glikozilirana antitijela IgA pronađene su u serumu pacijenata s rakom jajnika, dojke, debelog crijeva te rakom jetre povezanim s virusom hepatitisa B [87–89]. Nadalje, abnormalna glikozilacija tog proteina često je glavna karakterizacija teških autoimunih bolesti [90], posebno IgA nefropatije i IgA vaskulitisa [91,92]. Stoga se očekuje da će aberantno glikozilirana molekula IgA biti važan pokazatelj za kliničku dijagnozu. Budući da je odnos između glikozilacije antitijela IgA i nefropatije dobro utvrđen, glikozilacija tog proteina već je dugo u fokusu imunoloških istraživanja i istraživanja terapije antitijelima.

Kao što je ranije spomenuto, antitijelo IgA je izrazito glikozilirano *N*- i *O*-glikanima. Pokazalo se da su sastav i struktura ovih glikana te broj glikozilacijskih mjesta izrazito heterogeni kod različitih pojedinca i različitih tkiva, a mogu varirati i u različitim patološkim i fiziološkim fazama [84,93]. Za razliku od antitijela IgG, koje sadrži samo jedno konzervirano *N*-glikozilacijsko mjesto, monomeri molekula IgA1 i IgA2 sadrže više *N*-glikozilacijskih mjesta po teškom lancu, a podklasa IgA1 ima još devet potencijalnih *O*-glikozilacijskih mjesta u zglobnoj regiji.

Uz varijabilnu *O*-glikozilaciju u zglobnoj regiji, na teškom lancu molekule IgA1 postoje još dva *N*-glikozilacijska mjesta, a to su N144 u regiji CH2 i N340 u regiji CH3. U usporedbi s podklasom IgA1, molekula podklase IgA2 ima kraću zglobnu regiju kojoj nedostaju odgovarajuća *O*-glikozilacijska mjesta, ali svaki alotip sadrži četiri *N*-glikozilacijska mjesta (N131, N327, N47, N205), međutim, neki rijetki alotipovi imaju i peto *N*-glikozilacijsko mjesto u regiji CH1 (N92) [94]. Mjesta N144 i N340 na podklasi IgA1 identična su mjestima N131 i N327 na podklasi IgA2 po aminokiselinskim sekvencama.

*N*-glikozilacija podklasa IgA1 i IgA2 detaljno je istražena [92,94–98]. Do sada je identificirano šesnaest *N*-glikanskih struktura na pet glikozilacijskih mjesta (N47, N92, N144/N131, N205 i N340/N327) na teškim lancima molekule IgA [97]. Većina *N*-glikana molekule IgA su biantenarne strukture, a neke od njih su tri- ili tetraantenarne, ili oligomanoznog tipa. Za razliku od orijentacije glikana prema unutrašnjosti C $\gamma$ 2 domene kod molekule IgG, molekularno modeliranje otkrilo je da su kod molekule IgA glikani orijentirani prema vanjštini proteina. Ova vanjska orijentacija mogla bi učiniti *N*-glikane antitijela IgA dostupnijima glikoziltransferazama u lokalnim stanicama i utjecati na iznimnu heterogenost glikana te nastanak glikoformi specifičnih za pojedine stanice [99]. Velike razlike zabilježene



su i u strukturama glikana između serumskih podklasa IgA1 i IgA2. Uspoređujući *N*-glikozilaciju na dva konzervirana mjesta N144 i N340 na molekuli podklase IgA1 s mjestima N131 i N327 na molekuli podklase IgA2, utvrđena je relativno niska razina sijalinizacije, galaktozilacije i fukozilacije na molekuli podklase IgA2. *N*-glikanske strukture na molekuli podklase IgA2 u pravilu su jednostavne te uglavnom oligomanoznog ili biantenarnog tipa, dok glikani na molekuli podklase IgA1 pokazuju visoku razinu sijalinizacije i galaktozilacije, ne samo u slučaju *N*-glikana, već i u slučaju *O*-glikana u zglobnoj regiji. Priopćeno je da je oko 80% glikana na molekuli podklase IgA1 galaktozilirano, a više od 75% njih je glikozilirano terminalnom sijalinskom kiselinom [100].

### 2.3.3. Funkcija antitijela IgA u imunom sustavu

Kao važna efektorska molekula imunskog sustava, uz neutralizaciju antigena i aktivaciju komplementa, antitijelo IgA se preko segmenta Fc može vezati na brojne receptore različitih (imunskih) stanica. Uklanjanje antitijela IgA iz cirkulacije posredovano je hepatocitima koji na površini stanice eksprimiraju asijaloglikoproteinske receptore (ASGPR) odgovorne za prepoznavanje *N*-glikanskih struktura tog antitijela [101]. Također se pretpostavlja da u tom procesu sudjeluju i mezangijalne stanice u glomerulima bubrega koje eksprimiraju transferinski receptor 1 (poznat kao receptor CD71, engl. *Cluster of Differentiation 71*) i nedavno identificiranu  $\beta$ -1,4-galaktoziltransferazu kao potencijalne receptore za prepoznavanje antitijela IgA [102]. Nadalje, antitijelo IgA stupa u interakciju s receptorima Fc $\alpha$ / $\mu$  koji se eksprimiraju u crijevima, slezeni i limfnim čvorovima, a imaju ulogu u endocitozi mikroba, iako njihova funkcija nije još potpuno razjašnjena [103].

Jedan od najvažnijih receptora imunskih stanica na koji se antitijelo IgA može vezati je receptor Fc $\alpha$ RI (CD89) [104], koji eksprimiraju mijeloidne stanice, odnosno monociti, neutrofili te neki makrofagi [105]. Istraživanja su pokazala da serumski oblik mIgA koji nije konjugiran antigenom, stupa u interakciju s receptorom Fc $\alpha$ RI, čime može modulirati imunski učinak inhibitornom signalizacijom ITAM (engl. *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, motiv aktivacije na bazi imunoreceptorskog tirozina) i poticati protuupalni odgovor važan za održavanje stabilnih uvjeta [11,106]. Na primjer, vezanje serumskog oblika mIgA na receptor Fc $\alpha$ RI može inhibirati oksidativni prasak (generaciju superoksida), te fagocitozu posredovanu antitijelom IgG i popratnu proizvodnju citokina [107,108]. Vezanje serumskog oblika mIgA na receptor Fc $\alpha$ RI također može inhibirati astmu posredovanu imunoglobulinom E kod transgenih miševa [109]. Ovom vrstom Fc $\alpha$ RI-ovisnog inhibitornog ITAM signalnog

puta, serumski oblik mIgA može održavati homeostazu i regulirati utjecaj staničnih aktivnosti posredovanih receptorima Fc $\gamma$ R ili Fc $\epsilon$ RI tijekom upale ili alergije [110].

Iako antitijelo IgA ima protuupalnu funkciju, on također igra ključnu ulogu u poticanju upale tijekom infekcije. Smatra se da je jedan od načina prijelaza s imunosne supresije na upalu posredovanu receptorom Fc $\alpha$ RI uzrokovan stvaranjem imunokompleksa. Dok je u homeostatskim uvjetima antitijelo IgA prisutno uglavnom u monomernom i topljivom obliku, formiranje imunokompleksa potaknuto je njegovom agregacijom, na primjer, tijekom opsonizacije invazivnog patogena, sekundarne infekcije ili unakrsnom reaktivnošću antitijela na epitope patogena [111–113]. Dok se monomerni i dimerni oblici molekule IgA vežu na receptor Fc $\alpha$ RI s umjerenim afinitetom, imunokompleksi antitijela IgA se znatno lakše i snažnije vežu za receptor Fc $\alpha$ RI [114], koji nakon vezanja inducira klasičnu signalizaciju ITAM, čime se aktiviraju efektorske funkcije kao što su fagocitoza, degranulacija i otpuštanje citokina [114]. Kao takvo, formiranje imunokompleksa antitijela IgA funkcionira kao signal koji potiče upalu u različitim tkivima. Dodatno, sugerirano je da prisutnost prekomjernih imunokompleksa može dovesti do nekontrolirane i neproporcionalne aktivacije imunosnih stanica, što dovodi do ozbiljnog oštećenja tkiva u autoimunim bolestima, kao što su autoimuna bulozna dermatozna i reumatoidni artritis [104]. Između ostalih, povećana prisutnost imunokompleksa antitijela IgA primijećena je i u različitim tipovima šećernih bolesti [115], iako njihova funkcija i uloga još nisu razjašnjene.

Također je važno naglasiti da podklase antitijela IgA imaju različite efektorske funkcije povezane s različitim profilima glikozilacije. Dvije podklase IgA (IgA1 i IgA2) razlikuju se u svom učinku na imunosne stanice zbog različitih svojstava vezanja i signalizacije, gdje molekula podklase IgA2 u pravilu djeluje proupalno na neutrofile i makrofage, dok molekula podklase IgA1 nema značajno izražene proupalne učinke [94]. Efektorske funkcije molekule IgA ovise o podklasi i glikozilaciji, a poremećaji ravnoteže podklasa povezani su s autoimunim bolestima [94]. Nadalje, povećane razine antitijela IgA u serumu ili autoantitijela IgA zabilježene su kod više (upalnih) bolesti uključujući IgA nefropatiju, IgA vaskulitis, celijakiju, upalnu bolest crijeva, ŠBT1, i reumatoidni artritis [14,17,116–118]. Poremećaj u autoimunim bolestima te uočene razlike između proupalnih i protuupalnih učinaka serumskog oblika IgA ukazuju da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razumjeli mehanizmi efektorskih funkcija antitijela IgA. Uz to je pokazano da receptor Fc $\alpha$ RI ima ulogu inhibirajućeg, ali i aktivirajućeg receptora imunosnog sustava čime modulira protuupalne i proupalne funkcije

antitijela IgA. Međutim, još uvijek nije sasvim razjašnjeno kako se modulira i regulira vezanje antitijela IgA na Fc $\alpha$ RI. Fc $\alpha$ RI pripada istoj obitelji kao i Fc $\gamma$ -receptori (Fc $\gamma$ R), koji su važni za efektorske funkcije antitijela IgG, za koji je utvrđeno da strukturne razlike specifične za podklasu IgG i glikozilacija Fc regije utječu na afinitet prema receptoru Fc $\gamma$ R kao i na imunski odgovor [119,120]. Slični regulatorni mehanizmi mogli bi postojati za antitijelo IgA.

#### 2.3.4. Uloga glikozilacije antitijela IgA

I antitijelo IgA i receptor Fc $\alpha$ RI obilno su glikozilirani proteini. Trenutna istraživanja sugeriraju da *N*-glikanske strukture na antitijelu IgA mogu utjecati na njegovu termičku stabilnost, ali ne i na sposobnost vezanja za receptor [121], dok suprotno tome *N*-glikani receptora Fc $\alpha$ RI mogu značajno utjecati na afinitet vezanja [122]. Međutim, vezanje molekule podklase IgA1 na Fc $\alpha$ RI može izazvati konformacijske promjene u visoko *O*-glikoziliranoj zglobnoj regiji antitijela elektrostatičkim učinkom na velike udaljenosti [123]. Zbog te konformacijske promjene, *O*-glikani kojima nedostaju galaktoze, odnosno koji završavaju molekulom GalNAc (glikani karakteristični za antitijelo IgA u patološkim stanjima) postat će izloženiji i time lakše stupiti u interakciju sa specifičnim lektinima HAA (engl. *Helix aspersa agglutinin*), transferinskim receptorima i drugim autoantitijelima na površini stanica limfocita. Navedeno zatim može uzrokovati npr. stvaranje imunoprecipitacijskih kompleksa u glomerularnoj mezangijalnoj regiji bolesnika s IgA nefropatijom [92]. U serumu pacijenata koji boluju od IgA nefropatije, aberantne glikoforme na molekulama podklase IgA1 mogu uzrokovati veliki porast u razinama imunokompleksa antitijela IgA, što zauzvrat može poremetiti imunsku regulaciju posredovanu receptorom Fc $\alpha$ RI. U tom slučaju perzistirajući proupalni odgovori rezultiraju teškim oštećenjem tkiva koje se može uočiti tijekom procesa kronične upale i autoimunih bolesti.

Također je pokazano da efektorske funkcije antitijela IgA u interakciji s mijeloidnim stanicama ovise o njegovim podklasama i glikozilaciji. Utvrđeno je da podsijalinizirane molekule podklase IgA2 mogu učinkovito izazvati proupalne odgovore ovisne o Fc $\alpha$ RI, poput stvaranja neutrofilnih izvanstaničnih zamki i proizvodnje citokina. Suprotno tome, molekule podklase IgA1 s višim stupnjem sijalinizacije nemaju izražen proupalni učinak. Enzimsko uklanjanje sijalinskih kiselina ili cijelih *N*-glikana može značajno povećati proupalni kapacitet molekula podklase IgA1, gotovo na istu razinu kao podklase IgA2 [94]. U ljudi s autoimunim bolestima kao što je reumatoidni artritis, utvrđena je promjena razina autoantitijela specifičnih za bolest prema proupalnoj podklasi IgA2, dok je omjer autoantitijela IgA1 i IgA2 značajno

povezan s progresijom bolesti [94]. Antitijelo IgA bi moglo uravnotežiti odgovarajuće funkcionalne učinke u ljudskom tijelu na ovaj način, tako da će jasnije razumijevanje funkcije podklasa IgA i njihovih različitih glikozilacijskih obrazaca pomoći u otkrivanju dvojne uloge tog antitijela, imunosupresije i aktivacije.

Osim na imunoregulaciju, diferencijalna glikozilacija utječe i na doprinos različitim farmakokinetičkim svojstvima podklasa [101]. Antitijela podklase IgA2 se u ljudi uglavnom uklanja u jetri putem receptora ASGPR, koji prepoznaje terminalne galaktoze ili molekule GlcNAc na glikanima serumskih proteina. Nasuprot tome, relativno manji dio antitijela podklase IgA1 katabolizira se ovim putem zbog svoje visoko *O*-glikozilirane zglobne regije bogate sijalinskim kiselinama. Istraživanja su pokazala da se antitijelo podklase IgA1 bez zglobne regije može brže ukloniti iz cirkulacije u usporedbi s divljim tipom [101]. Učinkovito kataboliziranje antitijela podklase IgA2 u jetri, ali ne i IgA1, potencijalno bi moglo objasniti zašto je razina antitijela podklase IgA1 u serumu mnogo viša od antitijela podklase IgA2.

Uz navedeno, antitijelo IgA ima ulogu i u aktivaciji komplementa, međutim ta uloga još uvijek nije potpuno razjašnjena. Općenito se smatra da antitijelo IgA ne može aktivirati sustav komplementa klasičnim putem, već u nekim slučajevima može djelovati na aktivaciju alternativnim putem ili lektinskim putem [124]. Pokazano je da se prekomjerno eksprimirano antitijelo podklase IgA1 s nedostatkom galaktoze može vezati za lektin MBL u ljudi s IgA nefropatijom [125]. Nakon tretmana galaktozidazom, sposobnosti vezanja monovalentnih i polivalentnih antitijela podklasa IgA1 i IgA2 na MBL mogu se poboljšati za više od 10 puta. Pretpostavlja se da je to posljedica izloženosti oligomanoznih struktura na mjestu kao što je N40/327 nakon uklanjanja kompleksnih *N*-glikana [126]. U IgA nefropatiji, imunokompleksi antitijela podklase IgA1 s nedostatkom galaktoze mogu prepoznati MBL i aktivirati sustav komplementa, a osim toga, zabilježeno je i da sijalinska kiselina ima važnu ulogu u prepoznavanju i vezanju antitijela podklasa IgA1 i IgA2 na komponentu komplementa C3b [127].

Istraživanja sve više pokazuju da je glikozilacija proteina uključena u mnoge imunosne procese, uključujući diferencijaciju imunosnih stanica, prepoznavanje stanica, transdukciju signala, aktivaciju i prijanjanje stanica, izlučivanje efektorskih molekula te imunosnu aktivaciju ili supresiju. Antitijela su temeljne komponente imunosnog sustava, a sve klase ljudskih antitijela post-translacijski su modificirane različitim tipovima glikana. Za glikozilaciju IgG-a utvrđeno je i potkrijepljeno brojnim istraživanjima da ima važan utjecaj na njegove efektorske

funkcije, te da promjene u glikozilaciji i posljedično u efektorskim funkcijama mogu dovesti do razvoja ozbiljnih bolesti [128]. U slučaju antitijela IgA pokazalo se da je poremećena glikozilacija također povezana s nekolicinom bolesti te predstavlja obećavajuće ciljeve, ali i biomarkere za dijagnozu, liječenje autoimunih bolesti i antitumorsku terapiju. Do sada je pokazano da su, na primjer, promjene glikozilacije antitijela podklase IgA1 često popraćene razvojem Crohnove bolesti i drugih autoimunih bolesti, kao što su sistemski eritematozni lupus, reumatoidni artritis, Sjogrenov sindrom ili celijakija [129]. Iako je njihova patogeneza i dalje nepoznata, sugerirano je da prisutnost autoantitijela IgA, aberantnih glikoformi tog antitijela ili prekomjernih imunokompleksa antitijela IgA može pridonijeti kroničnoj upali i oštećenju tkiva djelovanjem imunskih odgovora posredovanih receptorom Fc $\alpha$ RI [106]. Iako su u zadnje vrijeme sve opsežnija istraživanja glikozilacije antitijela IgA u autoimunim bolestima, istraživanja u kontekstu ŠBT1 tek su u začetku.

### 2.3.5. Antitijelo IgA u ŠBT1

Dosadašnja istraživanja na antitijelu IgA kod osoba sa ŠBT1 pružila su uvid u imunosnu dinamiku bolesti. Najistraživanija tematika u kontekstu ŠBT1 je učestalost selektivnog manjka antitijela IgA, gdje je uočeno da je incidencija manjka značajno učestalija pojava kod bolesnika (i dječjih i odraslih) u usporedbi s općom populacijom [130–132]. Ova opažanja upućuju na to da bi kod osoba sa ŠBT1 mogle postojati promjene u razinama mukoznog i serumskog oblika IgA, potencijalno utječući na njihov imunosni odgovor. Štoviše, nedavno istraživanje otkrilo je da su i sistemski i intestinalni imunosni odgovori antitijela IgA poremećeni kod osoba sa ŠBT1, što ukazuje na sustavnu promjenu imuniteta sluznice [18]. Navedeno sugerira da antitijelo IgA ima značajnu ulogu u kontekstu ŠBT1 i naglašava potencijalnu važnost antitijela IgA u razumijevanju i upravljanju bolešću.

Uz manjak antitijela IgA, fokus brojnih istraživanja u ŠBT1 usmjeren je na koncentracije imunoglobulina, uključujući i antitijelo IgA, u raznim fazama bolesti [17,118,131,133–136]. U odraslih osoba sa ŠBT1, nekoliko je studija izvijestilo o promijenjenim razinama antitijela IgA u slini i serumu. Prema istraživanjima znanstvenika Ahmadijshara i suradnika [135] i Ardawi i suradnika [118], odrasli ispitanici sa ŠBT1 općenito pokazuju promjene u koncentracijama serumskog oblika IgA, pri čemu udio ispitanika pokazuju povećane koncentracije u usporedbi s osobama bez ŠBT1. U djece novodijagnosticirane ŠBT1, autori Svensson i suradnici [17] zabilježili su povišene koncentracije antitijela IgA u serumu, dok su Ali i suradnici [133] također izvijestili o sličnim

promjenama, ali i kod odraslih sudionika, ukazujući na poremećaj katabolizma ovog glikoproteina. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnili precizni mehanizmi i kliničke implikacije ovih varijacija razine imunoglobulina u odraslih i djece sa ŠBT1. Štoviše, primijećene su abnormalne koncentracije ostalih imunoglobulina, uključujući IgM, IgE te IgG, u bolesnika sa ŠBT1 [17,134,136], sugerirajući širu disregulaciju profila imunoglobulina na kliničkom početku bolesti. Navedeno naglašava složenost humoralne imunosti te bi daljnja istraživanja na imunoglobulinima mogla pridonijeti razumijevanju procesa i imunskog odgovora u autoimunoj ŠBT1.

### **3. ISPITANICI I METODE**

### 3.1. Ispitanici

Svi ispitanici, njihovi zakonski skrbnici ili roditelji su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je odobrilo Dansko etičko povjerenstvo (broj odobrenja KA-95139m) te etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ur. broj 380-59-10106-15-168/345). Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

#### *Djeca i adolescenti iz registra DanDiabKids*

Registar DanDiabKids (engl. *Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes*) je posvećen prikupljanju uzoraka te informacija o djeci i adolescentima sa šećernom bolesti s ciljem praćenja i poboljšanja kvalitete skrbi te praćenja incidencije i prevalencije te skupine bolesti. Od 1996. godine registar u Danskoj uključuje i prati djecu dijagnosticiranu ŠBT1 do 15. godine života, a od 2006. godine nadalje, registar uključuje djecu dijagnosticiranu ŠBT1 do 18. godine života te se kontinuirano sinkronizira s Danskim nacionalnim registrom pacijenata u svrhu provjere uključenja svih novodijagnosticiranih pacijenata [137]. Glavni cilj registra je prikupiti sveobuhvatne podatke o djeci zahvaćenoj ŠBT1 kako bi se bolje razumjela priroda bolesti, njeni uzroci i liječenje.

Podaci u registru DanDiabKids uključuju demografske podatke, kliničke informacije, laboratorijske rezultate i druge relevantne podatke o djeci i adolescentima s dijagnozom ŠBT1. Također, praćeni su podaci o zdravim braći i sestrama pacijenata s ciljem omogućavanja usporednih analiza i identifikacije potencijalnih genetskih čimbenika ili predispozicija vezanih za razvoj ŠBT1.

U ovom istraživanju sam koristio uzorke krvne plazme djece i adolescenata sa ŠBT1 prikupljenih kroz registar DanDiabKids unutar tri mjeseca od postavljanja dijagnoze [137] te uzorke krvne plazme njihovih zdravih braće i sestara. Svakom ispitaniku su također zabilježeni podatci o dobi i spolu. Uključivanje zdravih braće i sestara u istraživanje pruža bolji uvid u nasljednu komponentu bolesti i potencijalne genske faktore koji bi mogli doprinijeti pojavi ŠBT1. Za neku oboljelu djecu, više zdravih braće i sestara je uključeno u studiju (od 1 do 4 po oboljeloj osobi), ali za većinu slučajeva bio je dostupan uzorak samo jednog zdravog srodnika. Godina uzorkovanja kretala se od 1997. do 2000., a posljednje usklađivanje podataka iz registra i provjera statusa bolesti provedeni su u siječnju 2019. godine.



### *Odrasli ispitanici sa ŠBT1 i odgovarajući zdravi ispitanici*

U istraživanju sam također koristio uzorke krvnog seruma odraslih ispitanika sa ŠBT1 prikupljenih u Sveučilišnoj klinici za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma Vuk Vrhovac i Kliničkoj bolnici Merkur te uzorke krvnog seruma odgovarajućih zdravih kontrola. Kriteriji za uključivanje bolesnika u studiju bili su: ŠBT1 dijagnosticirana do 35. godine života, pozitivan relevantan status autoantitijela, aktivna terapija inzulinom najmanje godinu dana prije uzorkovanja, s ili bez mikrovaskularnih komplikacija (status komplikacija je stacionaran najmanje 3 mjeseca prije uzorkovanja).

Informacije o ispitanicima uključivale su podatke o dobi i spolu, laboratorijskim parametrima kao što su koncentracije glukoze natašte i postprandijalno, vrijednost glikiranog hemoglobina (HbA1c), navikama pušenja kao faktoru rizika za razvoj komplikacija te statusu mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti. Status komplikacija temeljio se na kategorizaciji težine uobičajenih dijabetičkih komplikacija (albuminurija, hipertenzija i retinopatija) u dvije ili tri kategorije, ovisno o komplikaciji. Albuminurija je kategorizirana na temelju stope ekskrecije albumina definirane kvantitativnom albuminurijom tijekom 24 h: kategorija 1) < 30 mg/24 h (A1; bez albuminurije ili blaga albuminurija); kategorija 2) 30 - 300 mg/24 h (A2; umjerena albuminurija); kategorija 3) >300 mg/24 h (A3; teška albuminurija). Status retinopatije klasificiran je na temelju pregleda oftalmologa u tri kategorije: kategorija 1) bez retinopatije (BR); kategorija 2) neproliferativna retinopatija (NR); kategorija 3) proliferativna retinopatija (PR). Hipertenzija također predstavlja rizik za razvoj dijabetičkih komplikacija te je definirana kao trenutna antihipertenzivna terapija ili krvni tlak viši od 140/90 mmHg i kategorizirana kao odsutna (kategorija 1) ili prisutna (kategorija 2).

### *Istraživanje N-glikozilacije serumskih proteina kod odraslih*

Za analizu N-glikozilacije serumskih proteina upotrijebio sam uzorke 201 odraslog ispitanika sa ŠBT1 (medijan dobi 46 godina, dobni raspon 18-70 godina) i uzorke 298 odgovarajućih kontrola (medijan dobi 45 godina, dobni raspon 18-79 godina). Ispitanike sam dodatno podijelio ovisno o statusu dijabetičkih komplikacija, navikama puštanja te sam u istraživanju koristio podatke o koncentracijama glukoze u krvi: glukoza na tašte, postprandijalna glukoza te indeksu glikacije hemoglobina (HbA1c). Populacija odraslih ispitanika analizirana u ovom istraživanju detaljno je prikazana u Tablici 1.

**Tablica 1.** Karakteristike odrasle populacije zdravih ispitanika i ispitanika sa ŠBT1.

<b>Zdravi ispitanici</b>	Broj ispitanika (muški/ženski)	<b>298 (125 m / 173 ž)</b>
	Dob	45 (18 - 79) godina
<b>Ispitanici sa ŠBT1</b>	Broj ispitanika (muški/ženski)	201 (86 m / 115 ž)
	Dob	46 (18 - 70) godina
	Navike pušenja	61 pušač / 140 nepušača
	Trajanje ŠBT1	14 (1 - 47) godina
	Koncentracija glukoze na tašte	7,7 (5,7 - 9,6) mmol/L
	Koncentracija glukoze postprandijalno	11,4 (8,0 - 14,6) mmol/L
	HbA1c	7,4 (6,6 - 8,3) %
	Retinopatija (K1 / K2 / K3)	157 / 31 / 12
	Albuminurija (K1 / K2 / K3)	28 / 162 / 9
	Hipertenzija (K1 / K2)	145 / 56

Vrijednosti za dob i trajanje bolesti izraženi su kao medijan (raspon), a vrijednosti za biokemijske parametre dani su kao medijani (interkvartilni raspon). Za dijabetičke komplikacije prikazan je broj sudionika koji pripada svakoj od kategorija (K) definiranih u tekstu iznad. Preuzeto i prilagođeno iz Nemčić i sur., 2023. [138].

#### *Istraživanje N-glikozilacije imunoglobulina A kod djece i odraslih*

Analizu N-glikozilacije antitijela IgA napravio sam na dvije populacije: na populaciji dječjih ispitanika iz registra DanDiabKids te na populaciji odraslih ispitanika iz Zagreba. Populacija dječjih ispitanika korištena za analizu N-glikozilacije antitijela IgA uključivala je ukupno 62 uzorka krvne plazme djece i adolescenata (srednja dob 10 godina, dobni raspon 1-16 godina) sa ŠBT1 prikupljenih unutar tri mjeseca od dijagnoze [27] i 86 uzoraka njihove zdrave braće i sestara (srednja dob 11 godina, dobni raspon 3-22 godine). Populacija odraslih ispitanika sastojala se od 84 osobe s ŠBT1 regrutirane u Klinici za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma Vuk Vrhovac, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska i 84 zdrava dobrovoljca. Svi ispitanici bili su u dobi između 30 i 60 godina. Obje populacije detaljnije su prikazane u Tablici 2.

**Tablica 2.** Opis dviju populacija korištenih u istraživanju glikozilacije antitijela IgA.

<b>Analiza</b>	<b>Parametar</b>	<b>Djeca sa ŠBT1</b>	<b>Zdrava braća i sestre</b>
<b>N-glikozilacije antitijela IgA kod djece na početku ŠBT1</b>	Broj ispitanika (muški/ženski)	62 (34 m / 28 ž)	86 (45 m / 41 ž)
	Dob	10 (1 - 16)	11 (3 - 22)
	Trajanje ŠBT1	≤ 3 mjeseca	<i>Nije primjenjivo</i>
<b>Analiza</b>	<b>Parametar</b>	<b>Odrasli ispitanici sa ŠBT1</b>	<b>Zdravi odrasli ispitanici</b>
<b>N-glikozilacije antitijela IgA kod odraslih sa ŠBT1</b>	Broj ispitanika (muški/ženski)	84 (42 m / 42 ž)	84 (42 m / 42 ž)
	Dob	45 (30 - 60)	45 (30 - 60)
	Trajanje ŠBT1	16 (1 - 41)	<i>Nije primjenjivo</i>

Vrijednosti za dob i trajanje ŠBT1 prikazane su kao medijan (raspon).

## 3.2. Materijali

### 3.2.1. Anorganske kemikalije

Amonijak u otopini (NH<sub>4</sub>OH) (Merck), amonijev bikarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) (Acros Organics), dinatrijev hidrogenfosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Acros Organics), kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), klorovodičnu kiselinu (HCl) (Merck), natrijev hidroksid (NaOH) (Merck), natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba), ultra-čistu vodu (Merck KGaA).

### 3.2.2. Organske kemikalije

2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), prokainamid hidroklorid (ProA) (Sigma-Aldrich) acetonitril (HPLC razina čistoće) (PanReac AppliChem), acetonitril (LC-MS razina čistoće) (VWR Chemicals), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), mravlju kiselinu (HCOOH) (Merck), Igepal CA-360 (Sigma-Aldrich), ledenu octenu kiselinu (CH<sub>3</sub>COOH) (Merck), natrijev dodecil sulfat (Sigma-

Aldrich), tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) (Sigma-Aldrich), CaptureSelect™ afinitetni matriks za izolaciju ljudskog antitijela IgA (Thermo Fischer Scientific).

### 3.2.3. Priprema otopina i pufera

#### *0,1 M HCOOH (pH 2,5)*

Za pripremu 100 mL otopine potrebno je u 80 mL destilirane vode dodati 0,38 mL mravlje kiseline te u menzuri nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom. Nakon provjere pH, otopina se filtrira kroz filtar veličine pora 0,2 µm te pohranjuje na +4 °C.

#### *0,1 M NaOH*

Za pripremu 100 mL otopine potrebno je izvagati 0,4 g NaOH te otopiti u 80 mL destilirane vode miješanjem na magnetskoj miješalici uz zagrijavanje na 60 °C. Nakon potpunog otapanja NaOH, u menzuri se otopina nadopunjava do 100 mL destiliranom vodom.

#### *1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>*

Za pripremu 100 mL otopine potrebno je otopiti 7,91 g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> u 80 mL destilirane vode uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon otapanja i prebacivanja u menzuru, otopinu je potrebno nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

#### *1 M HCl*

Za pripremu 100 mL potrebno je pomiješati 8,47 mL HCl s 80 mL destilirane vode, zatim prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

#### *1 M NaOH*

Za pripremu 100 mL potrebno je otopiti 4 g NaOH u 80 mL destilirane vode pri čemu se otapanje pospješuje miješanjem na magnetskom miješalici i zagrijavanjem na 60 °C. Nakon otapanja i prebacivanja u menzuru potrebno je nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

#### *1,33 % SDS (natrijev dodecil sulfat, engl. Sodium dodecyl sulfate)*

Za pripremu 100 mL potrebno je otopiti 1,33 g kemikalije SDS u 80 mL ultra-čiste vode miješanjem na magnetskoj miješalici. Nakon otapanja potrebno je preliterati u menzuru, nadopuniti do 100 mL ultra-čistom vodom te pohraniti na 37 °C.

## 2 % SDS

Za pripremu 100 mL potrebno je otopiti 1,33 g kemikalije SDS u 80 mL ultra-čiste vode miješanjem na magnetskoj miješalici. Nakon otapanja potrebno je prelići u menzuru, nadopuniti do 100 mL ultra-čistom vodom te pohraniti na 37 °C.

## 4 % Igepal

Za pripremu 100 mL potrebno je dodati 4 mL Igepal CA-360 u 80 mL ultra-čiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici i zagrijavanje na 65 °C. Nakon otapanja potrebno je nadopuniti do 100 mL ultra-čistom vodom te pohraniti na 4 °C.

## 10 × PBS, puferirana otopina fosfatnih soli (engl. phosphate buffer saline, PBS)

Za pripremu 100 mL potrebno je izvagati te otopiti 8,0028 g NaCl, 1,3832 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2964 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 0,1976 g KCl u 80 mL destilirane vode, provjeriti pH otopine (prema potrebi titrirati 1 M NaOH ili 1 M HCl ukoliko pH nije između 6,6 i 6,8), nadopuniti destiliranom vodom do 100 mL u menzuri i filtrirati kroz filter veličine pora 0,2 μm.

## 5 × PBS

Za pripremu 100 mL potrebno je uliti 50 mL 10 × PBS-a u menzuru, nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom te pohraniti na 4 °C.

## 1 × PBS

Za pripremu 100 mL potrebno je uliti 10 mL 10 × PBS-a u menzuru te nadopuniti destiliranom vodom do 90 mL. Nakon provjere pH (podesiti pH na 7,4 koristeći 1 M NaOH) potrebno je nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom, filtrirati otopinu kroz filter veličine pora 0,2 μm te pohraniti na + 4 °C.

## 20 % etanol u 20 mM TRIS-u + 0,1 M NaCl (pufer za skladištenje afinitetnog matriksa za izolaciju imunoglobulina A)

Za pripremu 100 mL potrebno je pomiješati 20 mL etanola sa 60 mL destilirane vode u menzuri. Nakon protresanja menzure, otopinu je potrebno prelići u staklenu čašu. Potrebno je otopiti 0,242 g TRIS i 0,5844 g NaCl u otopini korištenjem magnetske miješalice. Nakon provjere pH (podešavanje na 7,4 korištenjem 1 M HCl) potrebno je otopinu prelići u menzuru i

nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom, filtrirati kroz filter veličine pora 0,2 µm i zatim pohraniti na +4 °C.

#### *30 % octena kiselina u DMSO (dimetil sulfoksid)*

Za pripremu 1 mL potrebno je pomiješati 0,3 mL octene kiseline i 0,7 mL DMSO.

#### *70 % etanol*

Za pripremu 100 mL potrebno je dodati 70 mL etanola u menzuru, nadopuniti otopinu do 100 mL ultra-čistom vodom te pohraniti na +4 °C.

#### *96 % acetonitril*

Za pripremu 100 mL potrebno je dodati 96 mL acetonitrila (HPLC razina čistoće, engl. *High-performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) u menzuru, nadopuniti do 100 mL ultra-čistom vodom te pohraniti na +4 °C.

#### *20 % acetonitril*

Za pripremu 1 L potrebno je dodati 200 mL acetonitrila (HPLC razina čistoće) u menzuru te nadopuniti do 1 L ultra-čistom vodom.

#### *Amonijev formijat, 2 M, pH 4,4*

Za pripremu 500 mL potrebno je uliti 300 mL ultra-čiste vode u laboratorijsku čašu volumena 500 mL te ohladiti. Zatim je potrebno dodati 37,75 mL mravlje kiseline te ostaviti otopinu da se ohladi uz miješanje na magnetskom mješaču i provjeru pH (pH treba biti ispod 2). Nakon hlađenja potrebno je polako dodavati oko 75 mL amonijaka do dostizanja pH 4,2 pri čemu je potrebno pratiti temperatura otopine (otopina se ne smije zagrijati iznad 20 °C). U svrhu stabilizacije pH potrebno je otopinu ostaviti preko noći na sobnoj temperaturi nakon čega je pH otopine potrebno namjestiti na 4,4 dodavanjem amonijaka.

#### *Otopina za obilježavanje N-glikana serumskih proteina*

Za obilježavanja jednog uzorka potrebno je otopiti 0,48 mg kemikalije 2-AB i 1,12 mg kemikalije 2-PB u 25 µL 30 %-tne octene kiseline u DMSO.

### *Otopina za obilježavanje N-glikana antitijela IgA*

Za obilježavanja jednog uzorka potrebno je otopiti 0,96 mg kemikalije ProA i 1,12 mg kemikalije 2-PB u 25  $\mu$ L 30 %-tne octene kiseline u DMSO.

### *Otopine za kalibraciju pH metra*

pH Buffer Solution, alkalni standard, pH  $9,21 \pm 0,02$ ; pH Buffer Solution, kiseli standard, pH  $4,01 \pm 0,02$  (Mettler Toledo GmbH).

## **3.3. Pribor i instrumenti**

### 3.3.1. Instrumenti

Uređaj za proizvodnju ultra-čiste vode Millipore Direct-Q3 UV (Merck KGaA), AB54-S analitičku vagu (Mettler Toledo), Highland tehničku vagu (Adam Equipment), Magnetic Stirrer MSH 300 magnetsku mješalicu (Biosan), pipete i mikropipete (Rainin), vakumski koncentrator SPD210 (Thermo Scientific), Seven Compact pH metar (Mettler Toledo), inkubator DNI-30 (MRC industries), tresilica GFL 3023 (GFL), mikrovolumni spektrofotometar Nanodrop (Thermo Scientific), vakumsku pumpu (Pall), stolnu centrifugu 5804 (Eppendorf), tekućinski kromatograf ultra-visoke djelotvornosti Waters Acquity UPLC H-class s fluorescencijskim detektorom (Waters).

### 3.3.2. Potrošni materijal

ABgene PCR pločice s 96 jažica (Thermo Scientific), wwPTFE (engl. *Water-wettable Polytetrafluoroethylene*) Acroprep filter pločice od 96 jažica s polipropilenskom membranom i veličinom pora 0,2  $\mu$ m (Pall), nastavci za pipete (Rainin), filter pločice s 96 jažica veličine pora 0,7  $\mu$ m (Orochem Technologies Inc.), mikrotitarske pločice s 96 jažica volumena 1 ili 2 mL za sakupljanje uzoraka (Waters), ACQUITY UPLC Glycan BEH (engl. *bridged ethylene hybrid*) amidna kolona 130Å, 1,7  $\mu$ m, 2,1 mm  $\times$  150 mm (Waters), ACQUITY Premier Glycan BEH amidna kolona 130Å, 1,7  $\mu$ m, 2,1  $\times$  150 mm (Waters), Supor® PES Membrane filter diskovi veličine pora 0,2  $\mu$ m (Pall).

### 3.4. Metode

Prije analize *N*-glikozilacije serumskih proteina i antitijela IgA, uzorke sam centrifugirao na 13400 RCF (engl. *Relative centrifugal force*) tri minute kako bi se odvojile masnoće od ostatka uzorka te sam ih nasumično rasporedio na pločice s 96 jažica za sakupljanje uzoraka. U svrhu otklanjanja eksperimentalne pogreške, dodao sam standardne uzorke u svaku pločicu, dok sam za kontrolu postupka u svaku pločicu dodao i dvije slijepe probe (ultra-čista voda).

Analizu *N*-glikozilacije antitijela IgA radio sam u dva odvojena eksperimenta: prvi eksperiment u kojem sam analizirao *N*-glikozilacija antitijela IgA kod djece sa ŠBT1 i njihovih zdravih srodnika; te drugi eksperiment u kojem sam analizirao *N*-glikozilaciju antitijela IgA kod odraslih sa ŠBT1 i odgovarajućih zdravih kontrola. U oba eksperimenta primijenio sam isti postupak koji je detaljno opisan u nastavku.

#### 3.4.1. Izolacija antitijela IgA

Izolaciju humanog poliklonskog antitijela IgA sam iz uzoraka krvne plazme i seruma proveo postupkom temeljenom na afinitetnoj kromatografiji, pri čemu je afinitetni matriks specifično vezao regiju Fc ljudskog antitijela IgA iz uzorka. U prvom koraku sam suspenziju CaptureSelect™ IgA afinitetnog matriksa (25µL) nanio u svaku jažicu filter pločice Orochem sa 96 jažica. Filter pločicu sam zatim postavio na stalak vakumske pumpe. Matriks sam na pločici ispirao jednom ultra-čistom vodom te četiri puta otopinom 1 × PBS kako bi se postigli optimalni uvjeti za izolaciju antitijela. Volumeni za svako ispiranje je iznosio 200 µL, a tekućinu sam između svakog od koraka uklonio vakumskom pumpom. Centrifugirani i nasumično raspoređene uzorke (40 µL po jažici) razrijedio su sedam puta otopinom 1 × PBS u pločici za sakupljanje uzoraka od 2 mL te prebacio ih u filter pločicu Orochem, u koju sam prethodno nanio afinitetni matriks. Matriks sam s uzorcima inkubirao 15 minuta pri sobnoj temperaturi na tresilici (~200 rpm), nakon čega sam supernatant sakupio vakumskom pumpom te ga ponovo nanio na matriks kako bi se povećala učinkovitost izolacije. Nakon druge inkubacije jednakih uvjeta, supernatant sam sakupio vakumskom pumpom te pohranio na -20 °C. Matriks s vezanim antitijelom sam ispirao tri puta otopinom 1 × PBS kako bi se uklonile nespecifično vezane komponente. Na kraju sam antitijelo eluirao u pločicu s 96 jažica volumena 1 mL za sakupljanje uzoraka dodatkom 200 µL 0,1 M mravlje kiseline te neposredno neutralizirao s 34 µL 1 M amonijevog bikarbonata. Eluciju antitijela sam postigao centrifugiranjem pločice s uzorcima



3 minute pri 150 g. Za korištenje u daljnjim analitičkim postupcima, alikvot eluata volumena 100  $\mu\text{L}$  osušio sam pomoću vakumskog koncentratora. Pločicu s matriksom sam konačno regenerirao ispiranjem s dva puta po 500  $\mu\text{L}$  0,1 M mravlje kiseline, dva puta po 500  $\mu\text{L}$  otopine 10  $\times$  PBS, 3 puta po 500  $\mu\text{L}$  otopine 1  $\times$  PBS-om, dva puta po 500  $\mu\text{L}$  pufera za skladištenje matriksa te se konačno ostavio u 300  $\mu\text{L}$  pufera za skladištenje i pohranio na + 4 °C.

#### 3.4.2. Deglikozilacija, fluorescentno obilježavanje i pročišćavanje *N*-glikana antitijela IgA

Osušene uzorke antitijela resuspendirao sam u 30  $\mu\text{L}$  otopini 1,33 % SDS (w/v) te inkubirao 10 minuta na 65 °C, čime sam denaturirao proteine. Tim procesom sam u daljnjim koracima omogućio pristupanje glikozidaze PNGase F *N*-vezanim glikanima. Svakom uzorku sam zatim dodao 10  $\mu\text{L}$  otopine 4% Igepal-CA630, nakon čega sam uzorke inkubirao na tresilici za pločice (~300 rpm) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Kemikalija Igepal-CA630 je slabi deterdžent koji će neutralizirati snažni deterdžent SDS u uzorku i omogućiti nesmetano djelovanje glikozidaze. Oslobođanje *N*-glikana s proteina postigao sam dodatkom 1,2 U PNGase F u 10  $\mu\text{L}$  otopine 5  $\times$  PBS po uzorku te inkubacijom preko noći (18 sati) na 37 °C. PNGase F je endoglikozidaza, odnosno amidaza koja cijepa vezu između asparagina na peptidnoj okosnici i prvog šećera GlcNAc *N*-glikana.

Oslobođene *N*-glikane fluorescentno sam obilježio pomoću otopine ProA reakcijom reduktivne aminacije. Otopinu za obilježavanje pripremio sam otapanjem kemikalija ProA-hidroklorida (38,3 mg/mL) i PB (44,8 mg/mL) u smjesi DMSO i ledene octene kiseline (70:30 v/v). Nakon dodatka otopine za obilježavanje (25  $\mu\text{L}$  po uzorku), uzorke sam inkubirao na 65 °C dva sata te ohladio na sobnu temperaturu. Preostale protein, enzim, nevezanu boju i reducens eliminirao sam iz smjese primjenom ekstrakcije na čvrstoj fazi temeljenoj na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic interaction liquid chromatography-solid phase extraction*, HILIC-SPE).

Obilježene *N*-glikane sam pročistio od ostalih sastavnica smjese pomoću wwPTFE filter pločice s veličinom pora 0,2  $\mu\text{m}$ . Pločicu sam postavio na stalak vakumske pumpe te prvo isprao s 200  $\mu\text{L}$  70 % etanola te s 200  $\mu\text{L}$  ultra-čiste vode. Hidrofilnu membranu na pločici sam ekvilibrirao s 200  $\mu\text{L}$  96 % acetonitrila kako bi se stvorili optimalni uvjeti za vezanje *N*-glikana. U obilježene uzorke sam dodao 700  $\mu\text{L}$  hladnog acetonitrila kako bi se uzorci doveli do konačnog udjela od 96 % acetonitrila te sam ih zatim nanio na ekvilibriranu filter pločicu. U navedenom koraku dolazi do vezanja *N*-glikana na hidrofilnu membranu filter pločice, dok sam

vakumskom pumpom otklanjao otapalo iz jažice. Jažice sam potom isprao pet puta s 200  $\mu\text{L}$  96% acetonitrila kako bi se uklonila nevezana frakcija. *N*-glikani sam konačno eluirao u dva navrata dodatkom 50  $\mu\text{L}$  ultra-čiste vode, inkubacijom 15 minuta na tresilici ( $\sim 200$  rpm) pri sobnoj temperaturi te centrifugiranjem 5 min pri 183 RCF. Centrifugiranjem sam pročišćene glikane sakupio u PCR pločice s 96 jažica, a ukupni volumen sakupljenih glikana iznosio je 100  $\mu\text{L}$  po uzorku. Glikane sam zatim koristio u daljnjim analizama ili ih pohranio na  $-20$   $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.3. Deglikozilacija, fluorescentno obilježavanje i pročišćavanje *N*-glikana serumskih proteina

Uzorke seruma (10  $\mu\text{L}$ ) sam prvo centrifugirao na najvećem broju okretaja (13400 RCF) te ih nasumično rasporedio u pločice s 96 jažica volumena 1 mL. Proteine u uzorcima denaturirao sam dodatkom 20  $\mu\text{L}$  otopine 2 % SDS (w/v) i inkubacijom na 65  $^{\circ}\text{C}$  10 minuta. Nakon denaturacije, svakom uzorku sam dodao 10  $\mu\text{L}$  otopine 4 % Igepal-CA630 te ih inkubirao 15 minuta pri sobnoj temperaturi na tresilici za pločice ( $\sim 300$  rpm). Denaturirane serumске proteine deglikozilirao sam dodatkom 1,2 U PNGase F u 10  $\mu\text{L}$  otopine 5  $\times$  PBS po uzorku i inkubacijom preko noći (18 sati) na 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Fluorescentno obilježavanje oslobođenih *N*-glikana postigao sam pomoću kemikalije 2-AB. Otopinu za obilježavanje pripremio sam otapanjem kemikalija 2-AB (19,2 mg/mL) i PB (44,8 mg/mL) u smjesi DMSO i ledene octene kiseline (70:30 v/v). Nakon dodatka smjese za obilježavanje (25  $\mu\text{L}$ ), uzorke sam inkubiraju na 65  $^{\circ}\text{C}$  dva sata te ih ohladio na sobnu temperaturu. Fluorescentno obilježene *N*-glikane pročistio sam iz smjese primjenom načela HILIC-SPE.

Obilježene *N*-glikane serumskih proteina pročistio sam od ostatka smjese pomoću wwPTFE filter pločice s veličinom pora 0,2  $\mu\text{m}$ . Pločicu postavljenu na stalak vakumske pumpe isprao sam s 200  $\mu\text{L}$  otopine 70 % etanola i te s 200  $\mu\text{L}$  ultra-čiste vode. Membrane sam zatim ekvilibrirao dodatkom 200  $\mu\text{L}$  otopine 96 % acetonitrila. U uzorke sam potom dodao 700  $\mu\text{L}$  hladnog acetonitrila i nanio ih na filter pločicu. Jažice sam ispirao pet puta s 200  $\mu\text{L}$  otopine 96 % acetonitrila. Obilježene *N*-glikani eluirao sam u dva navrata s 90  $\mu\text{L}$  ultra-čiste vode, inkubacijom 15 minuta na tresilici ( $\sim 200$  rpm) pri sobnoj temperaturi te centrifugiranjem pet min pri 183 RCF. Centrifugiranjem sam pročišćene glikane sakupio u PCR pločicu s 96 jažica, a ukupni volumen sakupljenih glikana iznosio je 180  $\mu\text{L}$  po uzorku. Glikane sam zatim koristio u daljnjim analizama ili ih pohranio na  $-20$   $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.4. Analiza fluorescentno obilježenih *N*-glikana antitijela IgA tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti

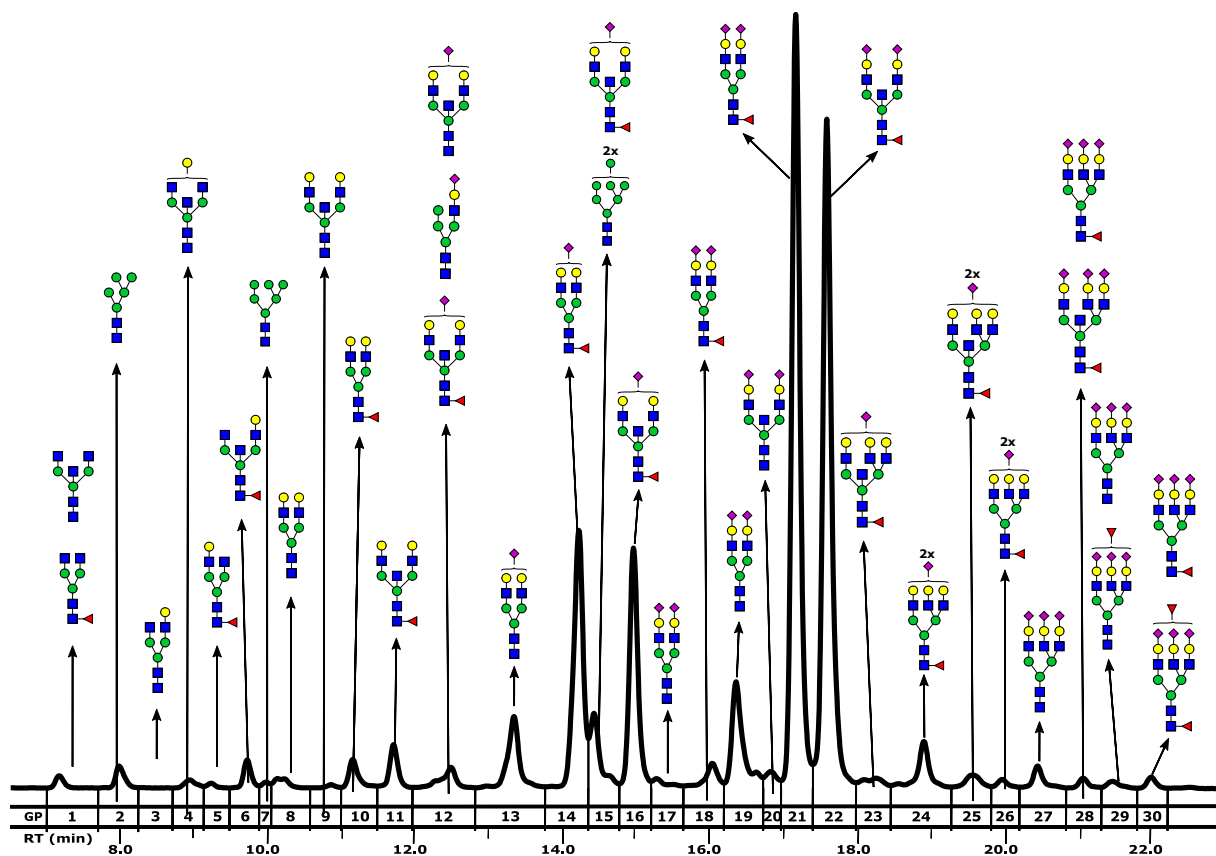
Razine fluorescentno obilježenih *N*-glikana analizirao sam instrumentom Waters Acquity UPLC H-Class. Navedeni instrument sastoji se od kvaternog upravljača otapalima, upravljača uzoraka i fluorescencijskog detektora s valnom duljinom ekscitacije postavljenom na 310 nm te emisije na 370 nm. Instrumentom upravlja računalni program Empower 3 (serija 3471, Waters). Razdvajanje *N*-glikana sam postigao metodom HILIC-UHPLC na amidnoj koloni ACQUITY Premier Glycan BEH duljine 150 mm. Primjena navedene tehnike dovodi do razdvajanja glikana prema njihovoj hidrofilnosti s time da se manji glikani kraće zadržavaju na koloni, dok se oni hidrofilniji s više šećernih podjedinica dulje zadržavaju na koloni. Kao otapalo A koristio sam 100 mM amonijev formijat (pH 4,4), dok kao otapalo B 100 % acetonitril. Za razdvajanje glikana upotrijebio sam linearni gradijent (Tablica 3) od 72 % do 59 % acetonitrila pri brzini protoka od 0,561 mL/min u analitičkom ciklusu u trajanju od 35 minuta. Temperaturu kolone postavio sam na 60 °C, a temperaturu komore s uzorcima na 10 °C.

**Tablica 3.** Gradijent otapala korišten tijekom analize *N*-glikana antitijela IgA.

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0,00	0,561	28,0	72,0
23,00	0,561	41,0	59,0
24,00	0,250	100,0	0,0
28,00	0,250	100,0	0,0
29,00	0,250	28,0	72,0
35,00	0,561	28,0	72,0
36,00	0,561	0,0	100,0
46,00	0,000	0,0	100,0

Kromatografski sustav sam kalibrirao korištenjem vanjskog standarda hidroliziranih glukoznih oligomera (dekstrana) obilježenih kemikalijom ProA, pomoću kojeg sam retencijska vremena pojedinačnih glikana pretvorio u glukozne jedinice. Kromatograme glikana sam zatim usporedio i poravnavao s prethodno identificiranim i anotiranim glikanima na molekuli IgA [139] kako bih odredio strukture glikanskih pikova.

Kromatograme sam obradio ručnom integracijom, pri čemu sam svaki kromatogram podijelio na 30 glikanskih (kromatografskih) pikova (GP1-GP30, Slika 7). Svaki glikanski pik sam normalizirao, odnosno kvantificirao kao postotak ukupne integrirane površine tog kromatograma. Strukture *N*-glikana koje se odnose na svaki glikanski pik opisane su detaljno u Tablici 4. Uz izravno mjerena svojstva glikana, odnosno razine pojedinih glikanskih pikova, izračunao sam i 12 deriviranih svojstava koja predstavljaju glikane sa sličnim strukturnim obilježjima, kao što su, na primjer, ukupna galaktozilacija, fukozilacija, sijalinizacija i slično (Tablica 5). Izračun deriviranih svojstava glikana pruža uvid u promjene u ukupnoj aktivnosti specifičnih glikozidaza i glikotransferaza uključenih u sintetski put glikana.



**Slika 7.** Reprezentativni kromatogram *N*-glikana otpuštenih s antitijela IgA. Strukture *N*-glikana predstavljene su shematski po podjedinicama: plavi kvadrat – GlcNAc, zeleni krug – manoz, crveni trokut – fukoza, žuti krug – galaktoza, ljubičasti romb – sijalinska kiselina. RT – retencijsko vrijeme, GP – glikanski pik. Preuzeto i prilagođeno iz Štambuk i sur., 2023.

[139].

**Tablica 4.** *N*-glikom serumske molekule IgA.

<b>Glikanski pik</b>	<b>Glikanska struktura*</b>	<b>Opis glikanske strukture</b>
IGP1	FA2; A2B	sržno fukoziliran, biantenarni; biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP2	M5	oligomanozni s pet manozna
IGP3	A2G1	monogalaktoziliran, biantenarni
IGP4	A2BG1	monogalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP5	FA2G1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni
IGP6	FA2BG1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP7	M6	oligomanozni sa šest manozna
IGP8	A2G2	digalaktoziliran, biantenarni
IGP9	A2BG2	digalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP10	FA2G2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni
IGP11	FA2BG2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP12	FA2BG2S1; A1M1G1S1; A2BG2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om; monogalaktoziliran i monosijaliniziran, hibridni; digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP13	A2G2S1	digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
IGP14	FA2G2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
IGP15	M8; FA2BG2S1	oligomanozni s osam manozna; sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP16	FA2BG2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP17	A2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
IGP18	FA2G2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
IGP19	A2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
IGP20	A2BG2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
IGP21	FA2G2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
IGP22	FA2BG2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-com

**Tablica 4 – nastavak.**

Glikanski pik	Glikanska struktura*	Opis glikanske strukture
IGP23	FA3BG3S1	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i monosijaliniziran, triantenarni s račvajućim GlcNAc-om
IGP24	FA3G3S2	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
IGP25	FA3BG3S2	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni s račvajućim GlcNAc-com
IGP26	FA3G3S2	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
IGP27	A3G3S3	trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
IGP28	FA3BG3S3; FA3G3S3	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni s račvajućim GlcNAc-com; sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
IGP29	A3F1G3S3; A3G3S3	antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni; , trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
IGP30	FA3F1G3S3; FA3G3S3	antenarno i sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni; sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni

\*najzastupljenije glikanske strukture u glikanskoj skupini. Strukturne kratice: svi *N*-glikani imaju 2 sržna GlcNAc-a; F na početku kratice označava sržnu fukožu  $\alpha$ 1,6-vezanu na unutarnji GlcNAc; M<sub>x</sub>, broj (x) manozu na sržnom GlcNAc-u; A<sub>x</sub>, broj antena (GlcNAc-a), odnosno grana, na trimanozilnoj srži; [3] i [6] označavaju na kojoj grani je vezana monosaharidna jedinica; A2, biantenarni s oba GlcNAc-a  $\beta$ 1,2-vezana; A3, triantenarni s GlcNAc-om  $\beta$ 1,2-vezanim na obje manoze i trećim GlcNAc-om  $\beta$ 1,4-vezanim na  $\alpha$ 1,3-vezanu manozu; A4, GlcNAc-i vezani kao A3 s dodatnim GlcNAc-om  $\beta$ 1,6-vezanim na  $\alpha$ 1,6-manozu; B, račvajući GlcNAc vezan  $\beta$ 1,4 na  $\beta$ 1,3 manozu; G(x), broj (x)  $\beta$ 1,4-vezanih galaktoza na antenu; F(x), broj (x) fukoza  $\alpha$ 1,3-vezanih na antenarni GlcNAc; S(x), broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu. Preuzeto i prilagođeno iz Štambuk i sur., 2023. [139].

**Tablica 5.** Izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma molekule IgA.

Derivirano svojstvo	Formula
Nisko razgranati glikani (LB)	IGP1 + IGP3 + IGP4 + IGP5 + IGP6 + IGP8 + IGP9 + IGP10 + IGP11 + IGP12 + IGP13 + IGP14 + IGP15 + IGP16 + IGP17 + IGP18 + IGP19 + IGP20 + IGP21 + IGP22
Visoko razgranati glikani (HB)	IGP23 + IGP24 + IGP25 + IGP26 + IGP27 + IGP28 + IGP29 + IGP30
Agalaktozilirani glikani (G0)	IGP1
Monogalaktozilirani glikani (G1)	IGP3 + IGP4 + IGP5 + IGP6 + 0,33 × IGP12
Digalaktozilirani glikani (G2)	IGP8 + IGP9 + IGP10 + IGP11 + IGP13 + IGP14 + IGP15 + IGP16 + IGP17 + IGP18 + IGP19 + IGP20 + IGP21 + IGP22
Trigalaktozilirani glikani (G3)	IGP23 + IGP24 + IGP25 + IGP26 + IGP27 + IGP28 + IGP29 + IGP30
Monosijalinizirani glikani (S1)	IGP12 + IGP13 + IGP14 + IGP15 + IGP16 + IGP23
Disijalinizirani glikani (S2)	IGP17 + IGP18 + IGP19 + IGP20 + IGP21 + IGP22 + IGP24 + IGP25 + IGP26
Trisijalinizirani glikani (S3)	IGP27 + IGP28 + IGP29 + IGP30
Glikani s račvujućim GlcNAc-om (B)	IGP1 + IGP3 + IGP6 + IGP9 + IGP11 + 0,67 × IGP12 + IGP15 + IGP16 + IGP20 + IGP22 + IGP23 + 0,5 × IGP25
Sržno fukozilirani glikani (CF)	IGP5 + IGP6 + IGP10 + IGP11 + 0,33 × IGP12 + IGP14 + IGP15 + IGP16 + IGP18 + IGP21 + IGP22 + IGP23 + IGP24 + IGP25 + IGP26 + IGP28 + IGP30
Oligomanozni glikani (HM)	IGP2 + IGP7

Kod određenih deriviranih svojstava, pojedini pikovi sudjeluju dijelom u izračunu, budući da se u tim pikovima nalazi više različitih struktura. Npr., svojstvo monogalaktozilacije računa se zbrajajući 33 % površine pika IGP12 jer se u tom piku nalaze još dvije jednako zastupljene strukture koje ne pripadaju ovom svojstvu.

### 3.4.5. Analiza fluorescentno obilježenih *N*-glikana serumskih proteina tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti

Razine fluorescentno obilježenih *N*-glikani analizirao sam instrumentom Waters Acquity UPLC H-Class, koji je prethodno opisan. Postupak analize *N*-glikana serumskih proteina sličan je postupku za analizu *N*-glikana antitijela IgA, uz promjene detektorskih valnih duljina, kolone, gradijenta otapala i trajanja analize. Fluorescencijsku detektorsku jedinicu postavio sam na valnu duljinu ekscitacije od 330 nm i emisije od 420 nm. Razdvajanje sam provodio na koloni Acquity Premier Glycan BEH duljine 150 mm sa 100 mM amonijevim formijatom (pH 4,4) kao otapalom A i 100 % acetonitrila kao otapalom B. Linearni gradijent od 70 % do 53 % acetonitrila pri brzini protoka od 0,561 mL/min primijenio sam u analitičkom ciklusu od 32,5 min (Tablica 6).

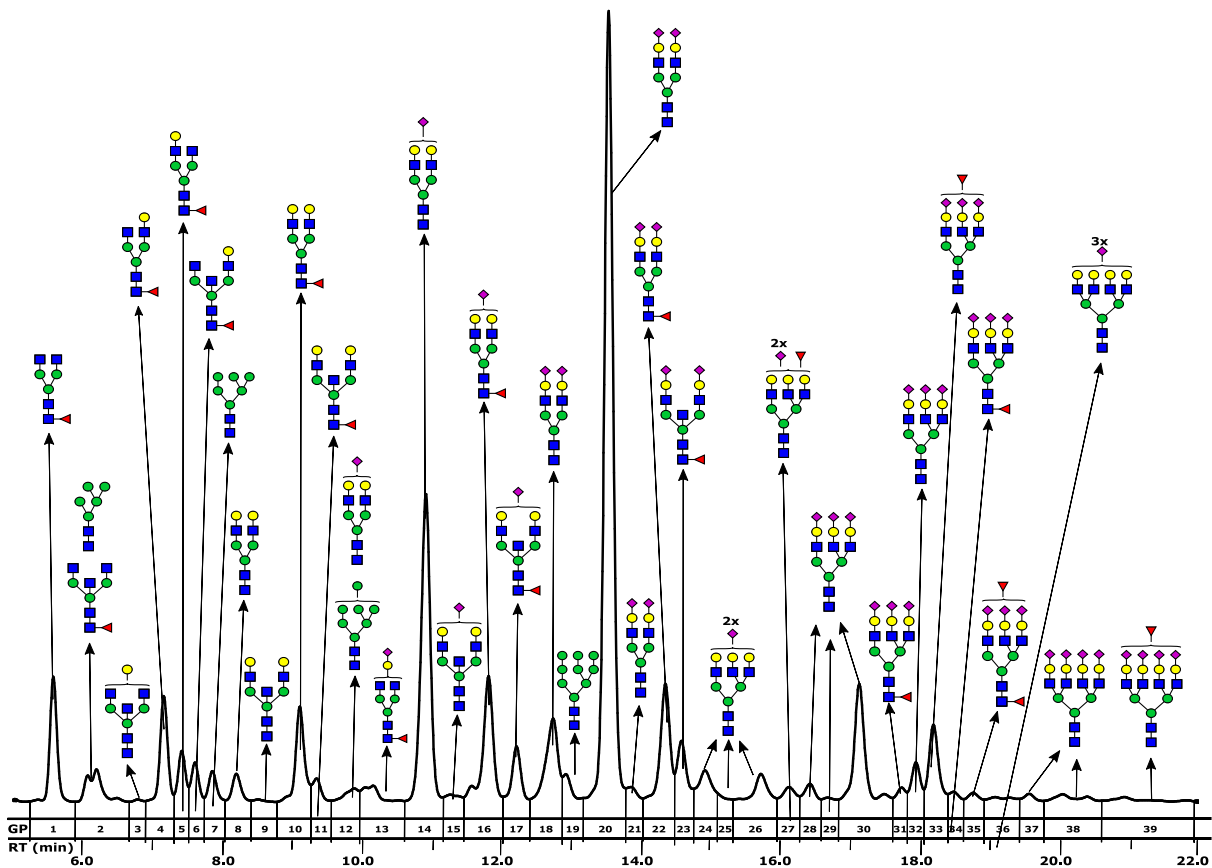
**Tablica 6.** Gradijent otapala korišten tijekom analize *N*-glikozilacije ukupnih serumskih proteina.

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0,00	0,561	30	70
1,47	0,561	30	70
24,81	0,561	47	53
25,50	0,250	100	0
28,00	0,250	100	0
29,00	0,250	30	70
32,50	0,561	30	70
45,00	0,400	0	100
55,00	0,000	0	100

Kromatografski sustav sam kalibrirao korištenjem vanjskog standarda hidroliziranih oligomera glukoze obilježenih kemikalijom 2-AB, pomoću kojeg sam retencijska vremena pojedinačnih glikana serumskih proteina pretvorio u glukozne jedinice te ih zatim uspoređuju s referentnim vrijednostima unutar baze podataka “GlycoStore” kako bih im odredio strukture [30].



Kromatografske podatke obradio sam ručno pri čemu sam svaki kromatogram podijelio na 39 glikanskih pikova (GP1-GP39, Slika 8). Svaki sam glikanski pik normalizirao, odnosno kvantificirao kao postotak ukupne integrirane površine. Strukture *N*-glikana koje se odnose na svaki GP opisane su detaljno u Tablici 7. Uz izravno izmjerena svojstva glikana, izračunao sam i 16 deriviranih svojstava koja su detaljno opisana u Tablici 8.



**Slika 8.** Reprezentativni kromatogram *N*-glikana otpuštenih s ukupnih serumskih proteina. Strukture *N*-glikana predstavljene su shematski po podjedinicama: plavi kvadrat – GlcNAc, zeleni krug – manoz, crveni trokut – fukoza, žuti krug – galaktoza, ljubičasti romb – sijalinska kiselina. RT – retencijsko vrijeme, GP – glikanski pik. Preuzeto i prilagođeno iz Štambuk i sur., 2023. [139].

**Tablica 7.** *N*-glikom ukupnih serumskih proteina.

<b>Glikanski pik</b>	<b>Glikanska struktura*</b>	<b>Opis glikanske strukture</b>
GP1	FA2	sržno fukoziliran, biantenarni
GP2	M5; FA2B	oligomanozni s pet manaza; sržno fukoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP3	A2BG1	monogalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP4	FA2[6]G1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni
GP5	FA2[3]G1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni
GP6	FA2[6]BG1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP7	M6	oligomanozni sa šest manaza
GP8	A2G2	digalaktoziliran, biantenarni
GP9	A2BG2	digalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP10	FA2G2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni
GP11	FA2BG2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP12	M7; A2G2S1	oligomanozan sa sedam manaza; digalaktoziliran, monosijaliniziran, biantenarni
GP13	FA2G1S1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
GP14	A2G2S1	digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
GP15	A2BG2S1	digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP16	FA2G2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
GP17	FA2BG2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP18	A2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP19	M9	oligomanozni s 9 manaza
GP20	A2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP21	A2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP22	FA2G2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP23	FA2BG2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om

**Tablica 7 – nastavak.**

Glikanski pik	Glikanska struktura*	Opis glikanske strukture
GP24	A3G3S2	trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP25	A3G3S2	trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP26	A3G3S2	trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP27	A3F1G3S2	antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP28	A3G3S3	trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP29	A3G3S3	trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP30	A3G3S3	trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP31	FA3G3S3	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP32	A3G3S3	trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP33	A3F1G3S3	antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP34	FA3G3S3	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP35	FA3F1G3S3	antenarno i sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP36	A4G4S3	tetragalaktoziliran i trisijaliniziran, tetraantenarni
GP37	A4G4S4	tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni
GP38	A4G4S4	tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni
GP39	A4F1G4S4	antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni

\*najzastupljenije glikanske strukture u glikanskoj skupini. Strukturne kratice: svi *N*-glikani imaju 2 sržna GlcNAc-a; F na početku kratice označava sržnu fukožu  $\alpha$ 1,6-vezanu na unutarnji GlcNAc; Mx, broj (x) manozna na sržnom GlcNAc-u; Ax, broj antena (GlcNAc-a), odnosno grana, na trimanozilnoj jezgri; [3] i [6] označavaju na kojoj grani je vezana monosaharidna jedinica; A2, biantenarni s oba GlcNAc-a  $\beta$ 1,2-vezana; A3, triantenarni s GlcNAc-om  $\beta$ 1,2-vezanim na obje manoze i trećim GlcNAc-om  $\beta$ 1,4-vezanim na  $\alpha$ 1,3-vezanu manozu; A4, GlcNAc-i vezani kao A3 s dodatnim GlcNAc-om  $\beta$ 1,6-vezanim na  $\alpha$ 1,6-manozu; B, račvajući GlcNAc vezan  $\beta$ 1,4 na  $\beta$ 1,3 manozu; G(x), broj (x)  $\beta$ 1,4-vezanih galaktoza na antenu; F(x), broj (x) fukoza  $\alpha$ 1,3-vezanih na antenarni GlcNAc; S(x), broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu.

**Tablica 8.** Izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma ukupnih serumskih proteina.

Derivirano svojstvo	Formula
nisko razgranati glikani (LB)	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5 × GP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
visoko razgranati glikani (HB)	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39
agalaktozilirani glikani (G0)	GP1 + GP2
monogalaktozilirani glikani (G1)	GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP13
digalaktozilirani glikani (G2)	GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5 × GP12 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
trigalaktozilirani glikani (G3)	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35
tetragalaktozilirani glikani (G4)	GP36 + GP37 + GP38 + GP39
neutralni glikani (S0)	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11
monosijalinizirani glikani (S1)	0,5 × GP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17
disijalinizirani glikani (S2)	GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 + GP25 + GP26 + GP27
trisijalinizirani glikani (S3)	GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36
tetrasijalinizirani glikani (S4)	GP37 + GP38 + GP39
glikani s računjućim GlcNAc-om (B)	GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11 + GP15 + GP17 + GP23
antenarno fukozilirani glikani (AF)	GP27 + GP33 + GP35 + GP39
sržno fukozilirani glikani (CF)	GP1 + GP2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP31 + GP34 + GP35
oligomanozni glikani (HM)	GP7 + 0,5 × GP12 + GP19

0,5 – polovica površine pika je uključena u izračun deriviranog svojstva.

### 3.5. Statistička obrada podataka

Sve statističke analize napravio sam u programskom jeziku R (v 4.1.3) [140]. Grafove sam generirao pomoću paketa ggplot2 [141]. Razine *N*-glikana normalizirao sam na ukupnu

površinu kromatograma, pri čemu sam površinu svakog kromatografskog pika podijelio s ukupnom površinom kromatograma u svrhu usporedivosti dobivenih mjerenja. Dobivene normalizirane površine logaritamski sam transformirao zbog svoje desno pomaknute distribucije, a zatim sam razlike u serijama korigirao metodom ComBat (R paket sva [142]). Nakon korekcije, podatke sam transformirao na originalnu skalu te sam iz takvih podataka izračunao derivirana svojstva glikana.

Razlike u razinama glikana antitijela IgA u odraslih bolesnika sa ŠBT1 i zdravih kontrola analizirao sam općim linearnim modelom: normaliziranu površinu modelirao sam kao zavisnu varijablu, dok sam ŠBT1, spol i dob modelirao kao nezavisne varijable. Učinak ŠBT1 na razine glikana antitijela IgA kod djece analizirao sam mješovitim modelom (R paket lme4 [143]) s istim zavisnim i nezavisnim varijablama kao kod odraslih, te obiteljskim identifikatorom modeliranim kao nasumičnim odsječkom. Zbog velikog broja testiranih modela te radi kontrole stope lažnih otkrića, dobivene p-vrijednosti korigirao sam Benjamini-Hochbergovom metodom koju su modificirali Li i Ji [144].

Asocijacije između *N*-glikana serumskih proteina i ŠBT1 analizirao sam na cijeloj populaciji općim linearnim modelom odraslih ispitanika. Log-transformiranu i normaliziranu površinu *N*-glikana ili derivirano svojstvo definirao sam kao zavisnu varijablu, dok sam ŠBT1 postavio kao nezavisnu varijablu. Izračunati koeficijent, dobiven općim linearnim modelom, predstavlja prirodni logaritam razlike u piku glikana ili deriviranom svojstvu kod ispitanika sa ŠBT1 u usporedbi s kontrolama. Korelaciju između *N*-glikana i deriviranih svojstava te glikemijskih parametara, trajanja bolesti, statusa komplikacija i pušenja također sam analizirao općim linearnim modelom, ali samo unutar skupine ispitanika sa ŠBT1. Log-transformiranu normaliziranu površinu glikana ili derivirano svojstvo definirao sam kao zavisnu varijablu. Nezavisna varijabla je svaki dodatno testirani parametar ispitanika zajedno s dobi i spolom kako bih uzeo u obzir razlike u njihovoj distribuciji unutar skupine sa ŠBT1. Izračunati koeficijent u ovom slučaju predstavlja prirodni logaritam promjene u površini glikanskog pika ili deriviranog svojstva za svaku jedinicu ili kategoriju kojom se opisuju parametri. Stopu lažnih otkrića kontrolirao sam Benjamini-Hochbergovom metodom. P-vrijednost manju od 0,05 smatrao sam značajnom. Izračunati koeficijenti nazivaju se koeficijenti B te njihova vrijednost definira veličinu i smjer povezanosti između nezavisne i zavisne varijable. Koeficijent B pokazuje koliko se očekivana vrijednost zavisne varijable mijenja za jednu jedinicu promjene u nezavisnoj varijabli, dok se druge varijable drže konstantnima.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. N-glikozilacija serumskih proteina u ŠBT1

##### 4.1.1. N-glikozilacija ukupnih serumskih proteina kod odraslih ispitanika sa ŠBT1

Razine N-glikana osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrola deskriptivno su prikazane u tablici u Prilogu 1. Analizom N-glikana serumskih proteina te statističkom obradom podataka otkriveno je 19 izravno izmjerenih N-glikanskih svojstava (GP) i četiri derivirana svojstva koja se značajno razlikuju između ispitivanih skupina (Tablica 9).

**Tablica 9.** Povezanost izravno mjerenih i deriviranih N-glikanskih svojstava ukupnih serumskih proteina sa statusom bolesti analizirana općim linearnim modelom. Prikazani su svi rezultati. Nominalno značajna svojstva zasjenjena su sivom, svojstva značajna nakon Benjamini-Hochberg korekcije za višestruka testiranja zasjenjena su zelenom.

N-glikansko svojstvo	Opis	B	p-vrijednost	Korigirana p-vrijednost
GP1	FA2	-0,078	$7,68 \times 10^{-2}$	$1,30 \times 10^{-1}$
GP2	M5; FA2B	0,045	$4,28 \times 10^{-2}$	$7,59 \times 10^{-2}$
GP3	A2BG1	0,042	$3,09 \times 10^{-1}$	$4,13 \times 10^{-1}$
GP4	FA2[6]G1	-0,123	$5,81 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-3}$
GP5	FA2[3]G1	-0,191	$6,48 \times 10^{-6}$	$2,53 \times 10^{-5}$
GP6	FA2[6]BG1	-0,038	$1,74 \times 10^{-1}$	$2,51 \times 10^{-1}$
GP7	M6	-0,183	$1,74 \times 10^{-8}$	$1,69 \times 10^{-7}$
GP8	A2G2	0,087	$1,23 \times 10^{-7}$	$8,00 \times 10^{-7}$
GP9	A2BG2	0,056	$2,58 \times 10^{-2}$	$5,04 \times 10^{-2}$
GP10	FA2G2	-0,043	$1,68 \times 10^{-1}$	$2,51 \times 10^{-1}$
GP11	FA2BG2	-0,013	$6,80 \times 10^{-1}$	$7,37 \times 10^{-1}$
GP12	M7; A2G2S1	0,131	$2,92 \times 10^{-28}$	$1,14 \times 10^{-26}$
GP13	FA2G1S1	-0,139	$7,59 \times 10^{-6}$	$2,69 \times 10^{-5}$
GP14	A2G2S1	0,042	$2,99 \times 10^{-5}$	$7,77 \times 10^{-5}$
GP15	A2BG2S1	0,012	$4,77 \times 10^{-1}$	$5,98 \times 10^{-1}$
GP16	FA2G2S1	0,026	$1,32 \times 10^{-1}$	$2,08 \times 10^{-1}$
GP17	FA2BG2S1	0,007	$8,04 \times 10^{-1}$	$8,25 \times 10^{-1}$
GP18	A2G2S2	0,079	$3,47 \times 10^{-6}$	$1,50 \times 10^{-5}$
GP19	M9	-0,009	$5,49 \times 10^{-1}$	$6,49 \times 10^{-1}$
GP20	A2G2S2	-0,013	$3,18 \times 10^{-1}$	$4,13 \times 10^{-1}$

**Tablica 9** – nastavak.

<b>N-glikansko svojstvo</b>	<b>Opis</b>	<b>B</b>	<b>p-vrijednost</b>	<b>Korigirana p-vrijednost</b>
GP21	A2G2S2	0,041	$2,70 \times 10^{-3}$	$5,86 \times 10^{-3}$
GP22	FA2G2S2	0,080	$1,15 \times 10^{-5}$	$3,62 \times 10^{-5}$
GP23	FA2BG2S2	0,039	$1,33 \times 10^{-1}$	$2,08 \times 10^{-1}$
GP24	A3G3S2	-0,043	$3,16 \times 10^{-2}$	$5,87 \times 10^{-2}$
GP25	A3G3S2	0,137	$6,21 \times 10^{-12}$	$1,21 \times 10^{-10}$
GP26	A3G3S2	-0,076	$1,21 \times 10^{-5}$	$3,62 \times 10^{-5}$
GP27	A3F1G3S2	0,179	$3,74 \times 10^{-8}$	$2,92 \times 10^{-7}$
GP28	A3G3S3	-0,010	$6,41 \times 10^{-1}$	$7,35 \times 10^{-1}$
GP29	A3G3S3	0,117	$9,21 \times 10^{-7}$	$4,49 \times 10^{-6}$
GP30	A3G3S3	-0,087	$4,83 \times 10^{-5}$	$1,18 \times 10^{-4}$
GP31	FA3G3S3	0,032	$2,20 \times 10^{-1}$	$3,06 \times 10^{-1}$
GP32	A3G3S3	-0,130	$3,20 \times 10^{-7}$	$1,78 \times 10^{-6}$
GP33	A3F1G3S3	0,137	$2,16 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-5}$
GP34	FA3G3S3	0,002	$9,18 \times 10^{-1}$	$9,18 \times 10^{-1}$
GP35	FA3F1G3S3	0,194	$5,94 \times 10^{-10}$	$7,72 \times 10^{-9}$
GP36	A4G4S3	0,008	$6,60 \times 10^{-1}$	$7,35 \times 10^{-1}$
GP37	A4G4S4	-0,009	$7,30 \times 10^{-1}$	$7,69 \times 10^{-1}$
GP38	A4G4S4	0,016	$4,90 \times 10^{-1}$	$5,98 \times 10^{-1}$
GP39	A4F1G4S4	0,084	$8,87 \times 10^{-3}$	$1,82 \times 10^{-2}$
LB	nisko razgranati glikani (LB)	0,002	$5,34 \times 10^{-1}$	$5,70 \times 10^{-1}$
HB	visoko razgranati glikani (HB)	-0,006	$6,60 \times 10^{-1}$	$6,60 \times 10^{-1}$
G0	agalaktozilirani glikani (G0)	-0,032	$3,46 \times 10^{-1}$	$4,98 \times 10^{-1}$
G1	monogalaktozilirani glikani (G1)	-0,123	$2,47 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-3}$
G2	digalaktozilirani glikani (G2)	0,020	$5,66 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10^{-3}$
G3	trigalaktozilirani glikani (G3)	-0,011	$4,36 \times 10^{-1}$	$4,98 \times 10^{-1}$
G4	tetragalaktozilirani glikani (G4)	0,029	$1,95 \times 10^{-1}$	$3,90 \times 10^{-1}$



**Tablica 9** – nastavak.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	Opis	B	p-vrijednost	Korigirana p-vrijednost
S0	neutralni glikani (S0)	-0,051	$5,58 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-1}$
S1	monosijalinizirani glikani (S1)	0,034	$5,54 \times 10^{-6}$	$4,43 \times 10^{-5}$
S2	disijalinizirani glikani (S2)	0,008	$4,02 \times 10^{-1}$	$4,98 \times 10^{-1}$
S3	trisijalinizirani glikani (S3)	-0,013	$4,10 \times 10^{-1}$	$4,98 \times 10^{-1}$
S4	tetrasijalinizirani glikani (S4)	0,035	$1,44 \times 10^{-1}$	$3,30 \times 10^{-1}$
B	glikani s račvajućim GlcNAc-om (B)	0,018	$3,48 \times 10^{-1}$	$4,98 \times 10^{-1}$
AF	antenarno fukozilirani glikani (AF)	0,140	$2,59 \times 10^{-6}$	$4,15 \times 10^{-5}$
CF	sržno fukozilirani glikani (CF)	-0,017	$3,18 \times 10^{-1}$	$4,98 \times 10^{-1}$
HM	oligomanozni glikani (HM)	-0,020	$6,24 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-1}$

**Antenarna fukozilacija povećana je u odraslih sa ŠBT1.** Najistaknutija razlika između *N*-glikoma ispitanika sa ŠBT1 i zdravih kontrola bila je povećanje deriviranog svojstva ukupne antenarne fukozilacije sa ŠBT1 ( $B = 0,140$ ,  $p = 4,15 \times 10^{-5}$ ). Ova promjena je potaknuta cjelokupnim povećanjem visoko razgranatih, antenarno fukoziliranih struktura *N*-glikoma ukupnih serumskih proteina (GP27, GP33, GP35 i GP39). Pojedinačna najjača asocijacija pronađena je za GP35 ( $B = 0,194$ ;  $p = 7,72 \times 10^{-9}$ ), triantenarnu i trisijaliniziranu strukturu sa sržnom i antenarnom fukozom (FA3F1G3S3).

**Monogalaktozilacija pada u odraslih sa ŠBT1.** Derivirano svojstvo monogalaktozilacije (strukture koje sadrže jednu galaktozu) značajno je smanjeno u odraslih osoba sa ŠBT1 u odnosu na zdrave kontrole ( $B = -0,123$ ;  $p = 1,32 \times 10^{-3}$ ). Ta promjena je primarno potaknuta smanjenim razina sržno fukoziliranih i monogalaktoziliranih glikana FA2[3]G1 (GP5) i FA2[6]G1 (GP4), kao i sržno fukoziliranog, monogalaktoziliranog i monosijaliniziranog glikana FA2G1S1 (GP13) u skupini sa ŠBT1.

**Digalaktozilacija i monosijalilacija povećane su u odraslih s ŠBT1.** Suprotno monogalaktozilaciji, digalaktozilacija je bila povećana u odraslih sa ŠBT1 ( $B = 0,020$ ;  $p = 2,26 \times 10^{-3}$ ) što je bilo potaknuto povećanjem u asijaliniziranom digalaktoziliranom glikanu GP8

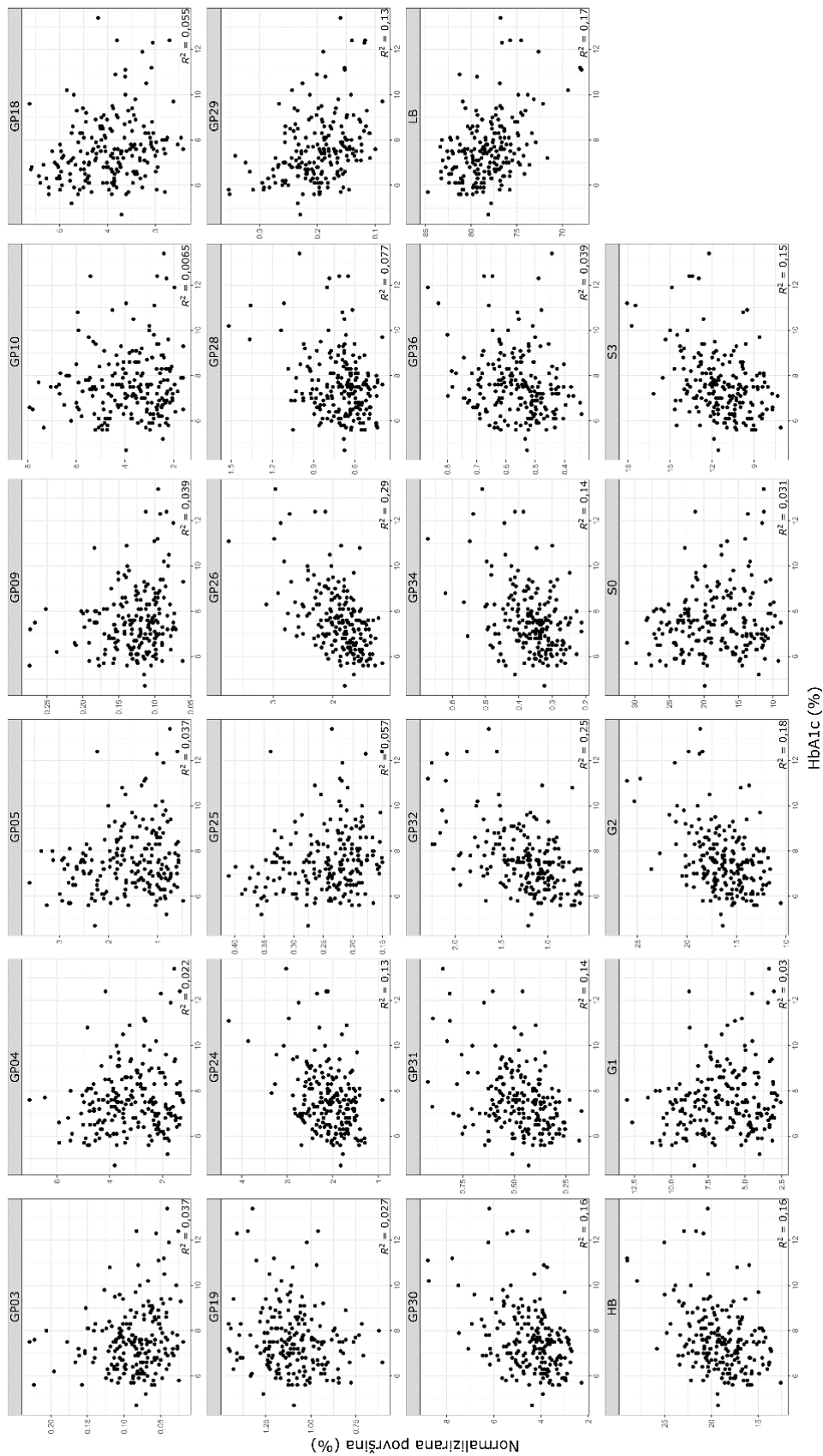
(A2G2), kao i u mono- i disijaliniziranim, digalaktoziliranim strukturama: GP12, GP14, GP18, GP21 i GP22. Monosijalinizacija je također bila povišena ( $B = 0,034$ ;  $p = 4,43 \times 10^{-5}$ ) kao odraz povećanja razina glikana strukture A2G2S1 (GP12 i GP14). Digalaktozilirani i disijalinizirani GP21 (A2G2S2) i njegova sržno fukozilirana varijanta GP22 (FA2G2S2) također su bili povećani u odraslih sa ŠBT1.

**Varijabilnost izomernih obrazaca glikana u ŠBT1.** Tijekom analize asocijacije *N*-glikana serumskih proteina sa ŠBT1, utvrđeno je da disijalinizirani GP25 i GP26 (izomeri A3G3S2) imaju obrnutu korelaciju sa ŠBT1: GP25 je statistički značajno povećan dok je GP26 smanjen. Slično, GP29 i GP30 (A3G3S3 izomeri) imali su suprotnu korelaciju sa ŠBT1; GP29 je bio povišen, dok je GP30 smanjen. Također, dodatni izomer strukture A3G3S3 (GP32) pokazao je značajan pad u ŠBT1.

#### 4.1.2. Korelacija *N*-glikoma ukupnih serumskih proteina s biokemijskim parametrima

Zatim su istražene asocijacije između *N*-glikana i sljedećih glikemijskih parametara: razine HbA1c, koncentracije glukoze natašte i koncentracije glukoze nakon obroka. Statistički značajna korelacija identificirana je između razine HbA1c i 17 od 39 direktno izmjerena *N*-glikanska svojstva, te između 6 od 16 deriviranih svojstava (Slika 9). Suprotno tome, koncentracije glukoze nakon obroka i natašte nisu utjecale na *N*-glikoprofil ukupnih proteina u serumu.

**Povećanje u razinama HbA1c povezano je s povećanom složenošću serumskih *N*-glikana.** Povećane vrijednosti HbA1c negativno su korelirale s jednostavnim, nisko razgranatim ( $B = -0,011$ ;  $p = 4,78 \times 10^{-9}$ ), monogalaktoziliranim ( $B = -0,046$ ;  $p = 0,048$ ) i asijaliniziranim glikanima ( $B = -0,034$ ;  $p = 0,048$ ). Suprotno tome, primijećena je pozitivna korelacija s deriviranim svojstvima koja prikazuju ukupne visoko razgranate strukture ( $B = 0,043$ ;  $p = 5,29 \times 10^{-8}$ ), trigalaktozilirane ( $B = 0,047$ ;  $p = 1,23 \times 10^{-8}$ ) i trisijalinizirane strukture ( $B = 0,047$ ;  $p = 1,69 \times 10^{-7}$ ). Povezanost svih svojstava *N*-glikana s lošom glikemijskom kontrolom prikazana je u Tablici 10. Kao što je vidljivo u tablici, promjene u tri derivirana svojstva su izgubila značajnost nakon korekcije za višestruka testiranja, a to su: digalaktozilacija (G2), strukture s račvujućim GlcNAc-om (B) te sržna fukozilacija (CF). Promjene u svakom od tih svojstava su negativne, odnosno padaju s povećanjem vrijednosti HbA1c.



**Slika 9.** Povezanost glikemijske kontrole s relativnom količinom serumskih *N*-glikana u odraslih sa ŠBT1. Prikazani su samo značajni rezultati ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 10.** Povezanost izravno izmjerenih i deriviranih *N*-glikanskih svojstava ukupnih serumskih proteina s lošom glikemijskom kontrolom analizirana općim linearnim modelom. Nominalno značajni rezultati zasjenjeni su sivom, rezultati značajni nakon korekcije zasjenjeni su zelenom.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	<b>B</b>	<b>p-vrijednost</b>	<b>BH-korigirana p-vrijednost</b>
GP1	-0,027	0,239	0,322
GP2	-0,019	0,081	0,132
GP3	-0,051	0,020	0,046
GP4	-0,047	0,020	0,046
GP5	-0,057	0,014	0,036
GP6	-0,029	0,077	0,131
GP7	0,006	0,798	0,819
GP8	-0,015	0,104	0,162
GP9	-0,037	0,008	0,027
GP10	-0,044	0,009	0,027
GP11	-0,024	0,179	0,259
GP12	-0,012	0,051	0,099
GP13	-0,035	0,047	0,097
GP14	-0,002	0,762	0,804
GP15	-0,012	0,200	0,279
GP16	-0,011	0,259	0,335
GP17	-0,017	0,267	0,335
GP18	-0,028	0,003	0,010
GP19	0,020	0,014	0,036
GP20	0,004	0,553	0,616
GP21	-0,013	0,064	0,114
GP22	0,009	0,323	0,393
GP23	-0,024	0,113	0,170
GP24	0,051	$4,45 \times 10^{-6}$	$2,48 \times 10^{-5}$
GP25	-0,031	0,008	0,027
GP26	0,073	$2,37 \times 10^{-15}$	$9,23 \times 10^{-14}$
GP27	0,005	0,741	0,803
GP28	0,042	$4,95 \times 10^{-4}$	0,002
GP29	-0,065	$5,04 \times 10^{-7}$	$3,27 \times 10^{-6}$
GP30	0,062	$1,76 \times 10^{-7}$	$1,37 \times 10^{-6}$

**Tablica 10** – nastavak.

<b>N-glikansko svojstvo</b>	<b>B</b>	<b>p-vrijednost</b>	<b>BH-korigirana p-vrijednost</b>
GP31	0,083	$9,50 \times 10^{-9}$	$1,24 \times 10^{-7}$
GP32	0,095	$6,13 \times 10^{-13}$	$1,19 \times 10^{-11}$
GP33	0,009	0,541	0,616
GP34	0,054	$2,87 \times 10^{-8}$	$2,80 \times 10^{-7}$
GP35	0,031	0,039	0,085
GP36	0,027	0,002	0,009
GP37	0,008	0,507	0,599
GP38	0,020	0,063	0,114
GP39	0,001	0,937	0,937
LB	-0,011	$2,99 \times 10^{-10}$	$4,78 \times 10^{-9}$
HB	0,043	$9,93 \times 10^{-9}$	$5,29 \times 10^{-8}$
G0	-0,024	0,163	0,237
G1	-0,046	0,016	0,048
G2	-0,006	0,037	0,066
G3	0,047	$1,53 \times 10^{-9}$	$1,23 \times 10^{-8}$
G4	0,014	0,199	0,266
S0	-0,034	0,018	0,048
S1	-0,006	0,134	0,214
S2	0,006	0,291	0,358
S3	0,047	$4,22 \times 10^{-8}$	$1,69 \times 10^{-7}$
S4	0,010	0,377	0,431
B	-0,022	0,030	0,066
AF	0,008	0,540	0,540
CF	-0,020	0,034	0,066
M	0,005	0,457	0,487

Derivirano svojstvo koje prikazuje ukupni sadržaj manoziliranih glikana (HM) nije doseglo statističku značajnost; međutim, pozitivna asocijacija s povećanjem razina HbA1c uočena je za visoko manozilirani glikan GP19 (Man9).

Izomeri strukture A3G3S2 (GP24, GP25 i GP26) nisu imali ujednačenu korelaciju s promjenama u vrijednostima HbA1c. Povećanje vrijednosti HbA1c pozitivno je asociiralo s GP24 i GP26 s, dok negativno s GP25. Slična pojava primijećena je za izomere A3G3S3 u kojem su slučaju GP28, GP30 i GP32 imali pozitivnu korelaciju s visokim HbA1c, dok je GP29

imao negativnu korelaciju. S druge strane, GP29 mogao bi se smanjivati kod ljudi s visokim vrijednostima HbA1c zbog povećanja u razinama njegovog sržno fukoziliranog oblika, GP31, koji se značajno povećao s visokim postotnim vrijednostima HbA1c. Promjene u sržnoj fukozilaciji nisu bile uniformne za cijeli *N*-glikom serumskih proteina. Iako nije primijećena značajna promjena za derivirano svojstvo koje prikazuje ukupnu sržnu fukozilaciju (prilagođena vrijednost  $p = 0,066$ , Tablica 10), neki jednostavni sržno fukozilirani glikani (GP4, GP5 i GP10) bili su negativno asocirani, dok su suprotno tome neki složeni trigalaktozilirani i trisijalinizirani glikani sa sržnom fukozom (GP31 i GP34) bili pozitivno povezani s rastom razina HbA1c.

4.1.3. Utjecaj statusa komplikacija, trajanja bolesti i pušenja na *N*-glikozilacijski profil ukupnih serumskih proteina u osoba sa ŠBT1

***N*-glikom serumskih proteina nije pod daljnjim utjecajem komplikacija ŠBT1.**

Nadalje, analizirana je povezanost *N*-glikozilacije ukupnih serumskih proteina sa statusom kliničkih komplikacija ŠBT1. Za povezanost *N*-glikana s dijabetičkim komplikacijama, sudionici su podijeljeni u kategorije na temelju težine njihovih komplikacija (albuminurija, retinopatija i hipertenzija; detaljno opisano u odjeljku 3.1. Ispitanici). U mom istraživanju, *N*-glikani nisu bili u korelaciji s komplikacijama dijabetesa. Nakon korekcije za višestruko testiranje, ni jedno izravno izmjereno, niti derivirano svojstvo *N*-glikana nije doseglo razinu značajnosti (podaci prikazani u Tablicama 11-13). U albuminuriji, između kategorija A1 i A2 primijećen je nominalno značajan pad izravno mjenog svojstva GP12, a između kategorija A1 i A3 nominalno povećanje strukture GP7 te nominalni pad u svojstvima GP18, GP21, GP28 i GP29 s težinom komplikacije (Tablica 11). *N*-glikozilacijska svojstva ukupnih serumskih proteina pokazala su samo jednu nominalnu promjenu između kategorija bez retinopatije i neproliferativne retinopatije, a to je povećanje sržno fukoziliranog, digalaktoziliranog i disijaliniziranog GP22 (FA2G2S2, Tablica 12). U hipertenziji dva izravno mjerena svojstva bila su nominalno smanjena (GP25 i GP29, Tablica 13), dok su dva bila nominalno povišena (GP26 i GP32, Tablica 13).

**Tablica 11.** Povezanost izravno izmjerenih i deriviranih *N*-glikanskih svojstava ukupnih serumskih proteina s albuminurijom u osoba sa ŠBT1 analizirana općim linearnim modelom. Albuminurija je podijeljena u tri kategorije (A1 – bez albuminurije ili blaga albuminurija, A2 – umjerena albuminurija, A3 – teška albuminurija). Prikazane su usporedbe između kategorija A1 i A2, te kategorija A1 i A3. Nominalno značajni rezultati zasjenjeni su sivom.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	B (A1/A2)	p (A1/A2)	korrigirana p-vrijednost (A1/A2)	B (A1/A3)	p (A1/A3)	korrigirana p-vrijednost (A1/A3)
GP1	0,118	0,202	0,798	0,186	0,331	0,537
GP2	0,028	0,541	0,844	0,057	0,54	0,702
GP3	0,084	0,351	0,844	0,263	0,156	0,385
GP4	0,133	0,105	0,798	0,277	0,102	0,36
GP5	0,101	0,288	0,844	0,257	0,19	0,412
GP6	0,057	0,39	0,844	0,25	0,066	0,292
GP7	0,102	0,236	0,798	0,457	0,01	0,136
GP8	-0,018	0,618	0,857	0,029	0,701	0,781
GP9	0,03	0,598	0,857	0,156	0,178	0,408
GP10	0,084	0,225	0,798	0,264	0,064	0,292
GP11	0,066	0,346	0,844	0,279	0,055	0,292
GP12	-0,051	0,045	0,798	-0,055	0,293	0,522
GP13	0,11	0,129	0,798	0,211	0,158	0,385
GP14	-0,029	0,199	0,798	-0,042	0,356	0,555
GP15	0,025	0,52	0,844	0,113	0,154	0,385
GP16	0,026	0,488	0,844	0,112	0,154	0,385
GP17	0,001	0,992	0,992	0,065	0,613	0,722
GP18	-0,062	0,093	0,798	-0,23	0,003	0,108
GP19	-0,017	0,604	0,857	-0,057	0,411	0,594
GP20	-0,029	0,307	0,844	-0,064	0,271	0,522
GP21	-0,044	0,123	0,798	-0,158	0,007	0,136
GP22	-0,045	0,246	0,798	-0,097	0,228	0,467
GP23	-0,001	0,992	0,992	-0,023	0,857	0,907
GP24	-0,018	0,697	0,857	-0,14	0,141	0,385
GP25	-0,042	0,378	0,844	-0,18	0,069	0,292
GP26	0,014	0,738	0,857	0,007	0,934	0,958
GP27	-0,015	0,803	0,895	-0,003	0,982	0,982

**Tablica 11** – nastavak.

<b>N-glikansko svojstvo</b>	<b>B (A1/A2)</b>	<b>p (A1/A2)</b>	<b>korrigirana p-vrijednost (A1/A2)</b>	<b>B (A1/A3)</b>	<b>p (A1/A3)</b>	<b>korrigirana p-vrijednost (A1/A3)</b>
GP28	-0,035	0,465	0,844	-0,224	0,026	0,199
GP29	-0,068	0,193	0,798	-0,262	0,015	0,148
GP30	0,001	0,983	0,992	-0,105	0,297	0,522
GP31	-0,093	0,119	0,798	-0,219	0,075	0,292
GP32	0,036	0,531	0,844	0,069	0,558	0,703
GP33	0,001	0,983	0,992	-0,021	0,86	0,907
GP34	-0,013	0,747	0,857	-0,085	0,308	0,522
GP35	-0,046	0,449	0,844	-0,079	0,53	0,702
GP36	0,025	0,482	0,844	0,063	0,393	0,589
GP37	0,018	0,725	0,857	-0,052	0,62	0,722
GP38	0,014	0,742	0,857	0,041	0,63	0,722
GP39	0,025	0,693	0,857	0,102	0,431	0,6
LB	0	0,967	0,977	0,009	0,543	0,686
HB	-0,003	0,922	0,977	-0,054	0,394	0,631
G0	0,08	0,257	0,685	0,129	0,372	0,631
G1	0,109	0,155	0,685	0,259	0,103	0,41
G2	-0,017	0,164	0,685	-0,018	0,462	0,672
G3	-0,007	0,84	0,977	-0,073	0,278	0,631
G4	0,02	0,644	0,977	0,049	0,578	0,686
S0	0,079	0,184	0,685	0,201	0,1	0,41
S1	-0,01	0,547	0,977	0,015	0,643	0,686
S2	-0,03	0,181	0,685	-0,081	0,077	0,41
S3	-0,005	0,895	0,977	-0,073	0,322	0,631
S4	0,018	0,687	0,977	0,045	0,631	0,686
B	0,023	0,574	0,977	0,098	0,249	0,631
AF	-0,002	0,977	0,977	-0,002	0,988	0,988
CF	0,046	0,241	0,685	0,115	0,158	0,504
HM	0,008	0,755	0,977	0,088	0,081	0,41



**Tablica 12.** Povezanost izravno izmjerenih i deriviranih *N*-glikanskih svojstava ukupnih serumskih proteina s retinopatijom u osoba sa ŠBT1 analizirana općim linearnim modelom. Retinopatija je podijeljena u tri kategorije (BR - bez retinopatije, NR – neproliferativna retinopatija, PR – proliferativna retinopatija). Prikazane su usporedbe između kategorija BR i NR, te kategorija BR i PR. Nominalno značajni rezultati zasjenjeni su sivom.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	B (BR/NR)	p (BR/NR)	korigirana p-vrijednost (BR/NR)	B (BR/PR)	p (BR/PR)	korigirana p-vrijednost (BR/PR)
GP1	-0,079	0,381	0,863	-0,053	0,683	0,924
GP2	-0,064	0,147	0,863	-0,058	0,364	0,924
GP3	-0,007	0,933	0,985	-0,047	0,715	0,924
GP4	-0,090	0,261	0,863	0,058	0,618	0,924
GP5	-0,016	0,861	0,985	0,117	0,384	0,924
GP6	-0,086	0,184	0,863	0,026	0,782	0,924
GP7	0,015	0,861	0,985	-0,015	0,906	0,992
GP8	0,037	0,299	0,863	-0,038	0,460	0,924
GP9	0,045	0,416	0,863	-0,062	0,433	0,924
GP10	-0,001	0,982	0,985	0,121	0,216	0,924
GP11	0,051	0,464	0,863	0,019	0,848	0,973
GP12	0,015	0,560	0,910	0,019	0,603	0,924
GP13	0,022	0,761	0,958	0,034	0,737	0,924
GP14	0,000	0,984	0,985	-0,026	0,413	0,924
GP15	0,028	0,458	0,863	-0,031	0,568	0,924
GP16	0,063	0,088	0,863	0,071	0,186	0,924
GP17	0,043	0,488	0,863	0,087	0,327	0,924
GP18	-0,039	0,298	0,863	0,000	0,999	0,999
GP19	-0,013	0,685	0,931	-0,014	0,765	0,924
GP20	-0,018	0,509	0,863	-0,002	0,955	0,999
GP21	-0,041	0,139	0,863	-0,024	0,545	0,924
GP22	0,076	0,044	0,863	0,066	0,227	0,924
GP23	0,083	0,164	0,863	0,148	0,087	0,924
GP24	0,007	0,869	0,985	-0,068	0,302	0,924
GP25	-0,039	0,406	0,863	-0,001	0,986	0,999
GP26	0,038	0,338	0,863	-0,053	0,350	0,924
GP27	0,059	0,291	0,863	-0,059	0,470	0,924

**Tablica 12** – nastavak.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	<b>B</b> (BR/NR)	<b>p</b> (BR/NR)	korigirana p-vrijednost (BR/NR)	<b>B</b> (BR/PR)	<b>p</b> (BR/PR)	korigirana p-vrijednost (BR/PR)
GP28	-0,001	0,985	0,985	-0,022	0,755	0,924
GP29	-0,046	0,381	0,863	0,029	0,699	0,924
GP30	-0,019	0,693	0,931	-0,048	0,495	0,924
GP31	0,029	0,630	0,931	0,048	0,583	0,924
GP32	0,026	0,646	0,931	-0,047	0,558	0,924
GP33	0,038	0,509	0,863	-0,052	0,526	0,924
GP34	0,062	0,120	0,863	-0,027	0,638	0,924
GP35	0,069	0,245	0,863	-0,034	0,691	0,924
GP36	-0,001	0,975	0,985	-0,069	0,177	0,924
GP37	-0,038	0,459	0,863	0,008	0,916	0,992
GP38	-0,019	0,658	0,931	-0,027	0,656	0,924
GP39	0,021	0,728	0,946	-0,031	0,730	0,924
LB	-0,004	0,579	0,959	0,010	0,353	0,852
HB	0,015	0,631	0,959	-0,043	0,329	0,852
G0	-0,076	0,266	0,959	-0,053	0,591	0,852
G1	-0,062	0,413	0,959	0,059	0,584	0,852
G2	0,007	0,536	0,959	0,013	0,435	0,852
G3	0,017	0,592	0,959	-0,045	0,329	0,852
G4	-0,005	0,899	0,959	-0,027	0,653	0,852
S0	-0,042	0,470	0,959	0,021	0,798	0,852
S1	0,019	0,213	0,959	0,007	0,770	0,852
S2	-0,001	0,964	0,964	0,004	0,907	0,907
S3	0,011	0,763	0,959	-0,041	0,424	0,852
S4	-0,007	0,875	0,959	-0,017	0,792	0,852
B	0,011	0,795	0,959	0,035	0,560	0,852
AF	0,043	0,423	0,959	-0,051	0,516	0,852
CF	0,008	0,827	0,959	0,045	0,423	0,852
HM	0,011	0,655	0,959	-0,017	0,629	0,852

**Tablica 13.** Povezanost izravno izmjerenih i deriviranih *N*-glikanskih svojstava ukupnih serumskih proteina s hipertenzijom u osoba sa ŠBT1 analizirana općim linearnim modelom. Hipertenzija je kategorizirana kao prisutna ili odsutna. Nominalno značajni rezultati zasjenjeni su sivom.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	B	p-vrijednost	korrigirana p-vrijednost
GP1	-0,085	0,300	0,681
GP2	-0,066	0,099	0,434
GP3	-0,140	0,076	0,434
GP4	-0,094	0,193	0,598
GP5	-0,064	0,445	0,749
GP6	-0,036	0,534	0,777
GP7	-0,034	0,666	0,787
GP8	-0,015	0,636	0,787
GP9	-0,048	0,331	0,681
GP10	-0,059	0,332	0,681
GP11	-0,014	0,829	0,874
GP12	-0,030	0,182	0,598
GP13	-0,031	0,631	0,787
GP14	0,006	0,742	0,827
GP15	-0,002	0,961	0,962
GP16	-0,002	0,962	0,962
GP17	0,024	0,664	0,787
GP18	-0,065	0,051	0,397
GP19	0,048	0,100	0,434
GP20	0,012	0,643	0,787
GP21	0,020	0,438	0,749
GP22	0,024	0,480	0,749
GP23	0,094	0,083	0,434
GP24	0,036	0,385	0,749
GP25	-0,087	0,040	0,395
GP26	0,087	0,015	0,395
GP27	-0,015	0,768	0,832
GP28	0,016	0,711	0,815
GP29	-0,102	0,031	0,395
GP30	0,045	0,304	0,681

**Tablica 13** – nastavak.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	B	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
GP31	0,042	0,436	0,749
GP32	0,114	0,023	0,395
GP33	-0,027	0,598	0,787
GP34	0,047	0,193	0,598
GP35	-0,039	0,467	0,749
GP36	-0,020	0,538	0,777
GP37	-0,059	0,199	0,598
GP38	-0,038	0,312	0,681
GP39	-0,069	0,217	0,606
LB	-0,006	0,374	0,772
HB	0,020	0,460	0,772
G0	-0,077	0,215	0,772
G1	-0,073	0,285	0,772
G2	0,006	0,585	0,780
G3	0,030	0,303	0,772
G4	-0,045	0,239	0,772
S0	-0,063	0,232	0,772
S1	0,004	0,760	0,869
S2	0,014	0,483	0,772
S3	0,025	0,444	0,772
S4	-0,052	0,201	0,772
B	0,008	0,830	0,886
AF	-0,030	0,538	0,780
CF	-0,016	0,639	0,786
M	0,003	0,888	0,888

***N*-glikozilacija serumskih proteina ne mijenja se ovisno o duljini trajanja ŠBT1.** Zatim je ispitana korelacija između trajanja bolesti i *N*-glikana. Nije utvrđena značajna korelacija između trajanja bolesti i glikanskih svojstava, iako je istraživanje uključilo osobe u dobi od 18 do 70 godina s trajanjem bolesti između 1 i 47 godina. Svojstva glikana koja su izgubila značaj nakon korekcije p-vrijednosti prikazana su u Tablici 14. Ukupno tri izravno mjerena glikanska svojstva (GP12, GP26 i GP32) su izgubila značajnost nakon korekcije za višestruka testiranja.

**Tablica 14.** Povezanost duljine trajanja ŠBT1 s izravno izmjerenim i deriviranim *N*-glikanskim svojstvima ukupnih serumskih proteina analizirana općim linearnim modelom. Nominalno značajni rezultati zasjenjeni su sivom.

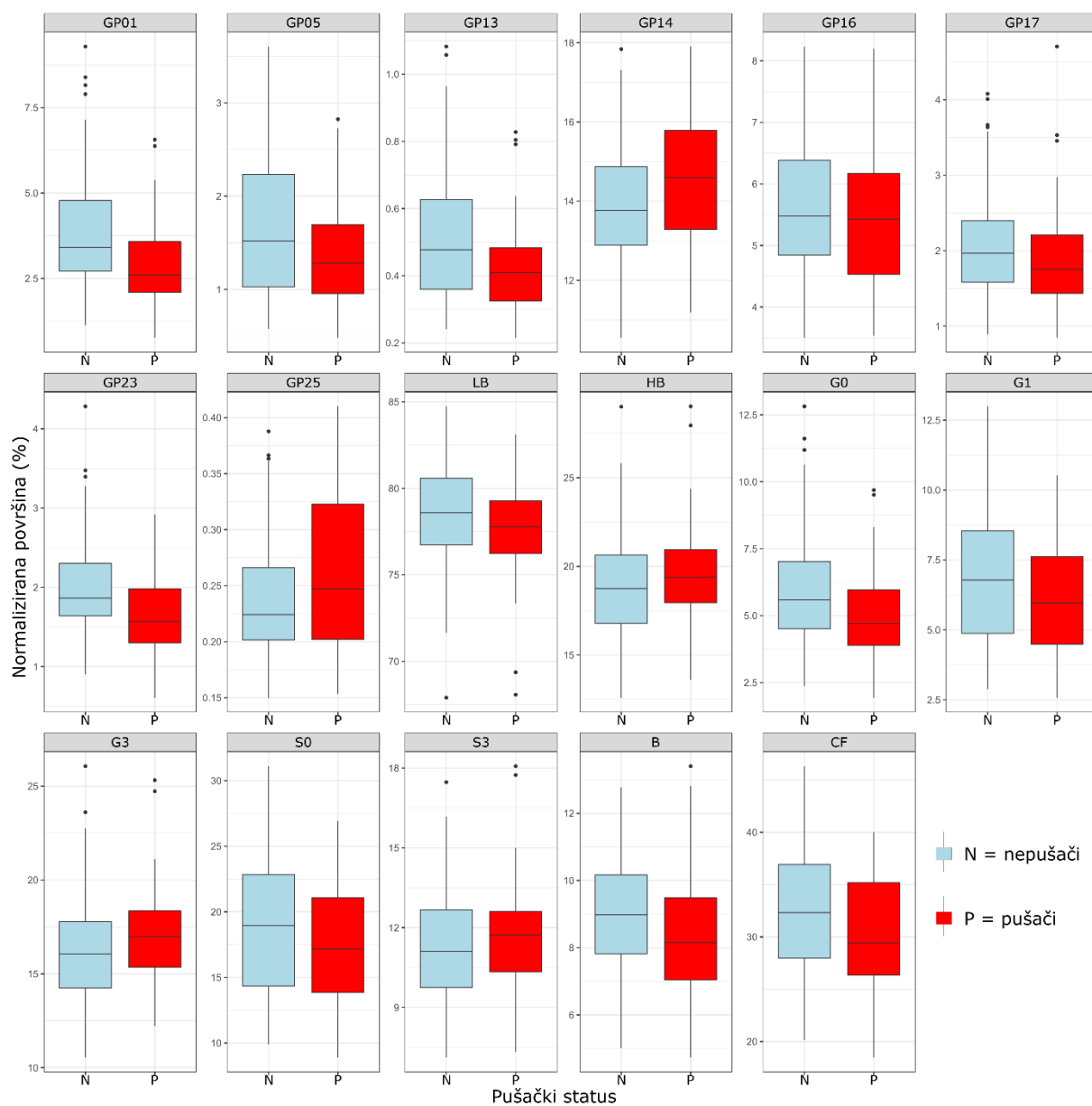
<i>N</i> -glikansko svojstvo	<b>B</b>	<b>p-vrijednost</b>	<b>korrigirana p-vrijednost</b>
GP1	0,002	0,473	0,693
GP2	0,002	0,230	0,575
GP3	0,004	0,221	0,575
GP4	0,003	0,209	0,575
GP5	0,006	0,062	0,485
GP6	0,004	0,111	0,575
GP7	0,002	0,481	0,693
GP8	0,000	0,929	0,953
GP9	0,002	0,228	0,575
GP10	0,003	0,164	0,575
GP11	0,003	0,182	0,575
GP12	0,002	0,022	0,425
GP13	0,002	0,333	0,590
GP14	-0,001	0,187	0,575
GP15	0,000	0,892	0,941
GP16	0,000	0,821	0,915
GP17	0,001	0,497	0,693
GP18	0,002	0,157	0,575
GP19	-0,002	0,062	0,485
GP20	-0,001	0,325	0,590
GP21	-0,001	0,169	0,575
GP22	-0,001	0,317	0,590
GP23	-0,002	0,435	0,679
GP24	-0,002	0,261	0,575
GP25	0,000	0,995	0,995
GP26	-0,003	0,020	0,425
GP27	-0,001	0,770	0,883
GP28	0,000	0,861	0,933
GP29	0,002	0,364	0,611
GP30	-0,001	0,376	0,611
GP31	-0,002	0,280	0,575

**Tablica 14 – nastavak.**

<i>N</i> -glikansko svojstvo	B	p-vrijednost	korigirana p-vrijednost
GP32	-0,004	0,039	0,485
GP33	0,001	0,629	0,818
GP34	-0,001	0,671	0,844
GP35	0,001	0,721	0,875
GP36	-0,001	0,257	0,575
GP37	0,002	0,277	0,575
GP38	0,000	0,740	0,875
GP39	0,001	0,578	0,778
LB	0,000	0,371	0,649
HB	-0,001	0,380	0,649
G0	0,002	0,379	0,649
G1	0,004	0,116	0,649
G2	0,000	0,459	0,649
G3	-0,001	0,291	0,649
G4	0,001	0,696	0,738
S0	0,003	0,160	0,649
S1	0,000	0,578	0,661
S2	-0,001	0,249	0,649
S3	-0,001	0,475	0,649
S4	0,001	0,486	0,649
B	0,001	0,300	0,649
AF	0,001	0,738	0,738
CF	0,002	0,241	0,649
M	0,000	0,574	0,661

***N*-glikom ukupnih serumskih proteina u osoba sa ŠBT1 pod utjecajem je pušenja.** *N*-glikoprofil ukupnih serumskih proteina pušača pokazao je značajno veću zastupljenost složenijih, visoko razgranatih glikoformi i, obrnuto, manju zastupljenost jednostavnijih struktura u usporedbi s nepušačima. Osam izravno mjerenih te devet deriviranih glikanskih svojstava bilo je promijenjeno u *N*-glikomu pušača sa ŠBT1. Značajne povezanosti navika pušenja s *N*-glikanima sažete su na Slici 10. Kod pušača su pronađene značajno snižene razine agalaktoziliranih ( $B = -0,142$ ;  $p = 0,035$ ), monogalaktoziliranih ( $B = -0,142$ ;  $p = 0,035$ ), asijaliniziranih ( $B = -0,106$ ;  $p = 0,036$ ), i sržno fukoziliranih ( $B = -0,099$ ;  $p = 0,011$ ) struktura

te struktura s računjućim GlcNAc-om ( $B = -0,093$ ;  $p = 0,024$ ). S druge strane, utvrđene su povišene razine složenijih trigalaktoziliranih ( $B = 0,062$ ;  $p = 0,035$ ) i trisijaliniziranih ( $B = 0,061$ ;  $p = 0,043$ ) glikana.



**Slika 10.** Promjene u *N*-glikomu ukupnih serumskih proteina kod odraslih sa ŠBT1 podijeljenih na pušače i nepušače. Prikazane su samo značajne promjene ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. N-glikozilacija antitijela IgA u ŠBT1

N-glikom serumskog antitijela IgA analiziran je u uzorcima 62 djece na početku bolesti i 86 njihove zdrave braće i sestara. Osim toga, analizirana je i N-glikozilacija serumskog antitijela IgA u 84 odrasle osobe sa ŠBT1 i 84 zdrava dobrovoljca. Cilj je identificirati razlike u izravno izmjerenim i deriviranim svojstvima N-glikana antitijela IgA između zdravih ispitanika i ispitanika sa ŠBT1 u odrasloj i pedijatrijskoj populaciji (Tablice 15 i 16).

### 4.2.1. N-glikozilacija antitijela IgA kod djece na početku ŠBT1

**Početak ŠBT1 kod djece povezan je s povećanim razinama oligomanoznog glikana antitijela IgA.** Kod djece na početku bolesti, samo je jedno N-glikansko svojstvo bilo značajno povezano sa ŠBT1: IGP2 (Man5) bio je povećan u ŠBT1 ( $B = 0,529$ ,  $p = 0,0067$ ). Dva izravno izmjerena i četiri derivirana svojstva N-glikana izgubile su statističku značajnost nakon korekcije za višestruko testiranje (Tablica 15). Promjene deriviranih svojstava koje su izgubile značajnost su smanjenje nisko razgranatih, trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih struktura i povećanje visokih manoziliranih glikana.

**Tablica 15.** Povezanost N-glikana antitijela IgA s nedavnom pojavom ŠBT1 u djece analizirana mješovitim linearnim modelom. Statistički značajna svojstva N-glikana zasjenjena su zelenom. Nominalno značajni rezultati zasjenjeni su sivom.

N-glikansko svojstvo	Opis	B	p	Korigirana p-vrijednost
IGP1	FA2/A2B	0,040	0,7734	0,9482
IGP2	M5	0,529	0,0004	0,0067
IGP3	A2G1	0,006	0,9696	0,9858
IGP4	A2BG1	-0,137	0,3456	0,8018
IGP5	FA2G1	-0,017	0,9159	0,9858
IGP6	FA2BG1	0,212	0,1564	0,5213
IGP7	M6	0,227	0,1731	0,5213
IGP8	A2G2	0,049	0,7596	0,9482
IGP9	A2BG2	0,024	0,8711	0,9858
IGP10	FA2G2	0,129	0,4120	0,8108
IGP11	FA2BG2	0,107	0,4631	0,8588
IGP12	FA2BG2S1/A1M1G1S1/A2BG2S1	0,325	0,0214	0,1348
IGP13	A2G2S1	0,136	0,4057	0,8108



**Tablica 15** – nastavak.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	Opis	B	p	Korigirana p-vrijednost
IGP14	FA2G2S1	-0,004	0,9716	0,9858
IGP15	M8/FA2BG2S1	0,160	0,2456	0,6919
IGP16	FA2BG2S1/A1M1G1S1/A2BG2S1	0,045	0,7297	0,9482
IGP17	A2G2S2	-0,158	0,3267	0,8018
IGP18	FA2G2S2	0,016	0,9168	0,9858
IGP19	A2G2S2	-0,007	0,9649	0,9858
IGP20	A2BG2S2	-0,081	0,6068	0,9272
IGP21	FA2G2S2	-0,079	0,5538	0,9272
IGP22	FA2BG2S2	0,002	0,9858	0,9858
IGP23	FA3BG3S1	0,079	0,5883	0,9272
IGP24	FA3G3S2	-0,056	0,6807	0,9482
IGP25	FA3BG3S2	-0,212	0,1642	0,5213
IGP26	FA3G3S2	-0,136	0,2945	0,7791
IGP27	A3G3S3	-0,211	0,1406	0,5213
IGP28	FA3BG3S3/FA3G3S3	-0,031	0,8022	0,9564
IGP29	A3F1G3S3/A3G3S3	-0,246	0,1180	0,5213
IGP30	FA3F1G3S3/FA3G3S3	-0,378	0,0097	0,1232
LB	nisko razgranati glikani (LB)	-0,055	0,6982	0,9482
HB	visoko razgranati glikani (HB)	-0,296	0,0243	0,1348
G0	agalaktozilirani glikani (G0)	0,040	0,7734	0,9482
G1	monogalaktozilirani glikani (G1)	0,057	0,7003	0,9482
G2	digalaktozilirani glikani (G2)	-0,112	0,4186	0,8108
G3	trigalaktozilirani glikani (G3)	-0,296	0,0243	0,1348
S1	Monosijalinizirani glikani	0,237	0,1416	0,5213
S2	disijalinizirani glikani	-0,149	0,3585	0,8018
S3	trisijalinizirani glikani)	-0,314	0,0261	0,1348
B	Glikani s račvućim GlcNAc-om	0,071	0,5809	0,9272
CF	Sržno fukozilirani glikani	-0,090	0,5626	0,9272
HM	Visoko manozni glikani	0,376	0,0173	0,1348

#### 4.2.2. *N*-glikozilacija antitijela IgA kod odraslih sa ŠBT1

**ŠBT1 reflektirana je brojim promjenama u *N*-glikomu antitijela IgA kod odraslih ispitanika.** Za razliku od djece, kod odraslih je primijećen povećan broj značajnih povezanosti *N*-glikana antitijela IgA sa ŠBT1 (Tablica 16). Ukupno 13 izravno izmjerenih i 7 deriviranih svojstava značajno je promijenjeno u odraslih sa ŠBT1. Za izravno mjerena svojstva *N*-glikana, najjače uočene povezanosti sa ŠBT1 bile su povećanje IGP17 i IGP19 ( $p = 4,35 \times 10^{-14}$ ,  $p = 1,60 \times 10^{-18}$ ), glikanski pikovi koji se sastoje od disijaliniziranih i digalaktoziliranih, biantenarnih izomera (A2G2S2). Najistaknutija asocijacija visoko razgranatih struktura sa ŠBT1 pronađena je za IGP29 ( $p = 1,98 \times 10^{-8}$ ) koji predstavlja trisijaliniziranu i trigalaktoziliranu strukturu (A3G3S3) te njenu sržno fukoziliranu varijantu (A3F1G3S3). Samo tri izravno izmjerena *N*-glikana antitijela IgA bila su značajno smanjena kod odraslih (IGP14, IGP21 i IGP25) i zanimljivo je da se svaki od navedenih glikanskih svojstava sadrži sržnu fukozu. U skladu s tim, najizraženija promjena u deriviranim svojstvima bilo je smanjenje ukupnih sržno fukoziliranih *N*-glikana ( $p = 1,21 \times 10^{-9}$ ). Ostale razlike uključivale su pomak prema složenim visoko razgranatim strukturama te popratno smanjenje nisko razgranatih struktura. Uočeno je smanjenje digalaktoziliranih te suprotno tome povećanje trigalaktoziliranih glikana, kao i povišene razine trisijaliniziranih i visoko manoziliranih glikana u ŠBT1.

**Tablica 16.** Povezanost *N*-glikana antitijela IgA sa ŠBT1 u odraslih analizirana općim linearnim modelom. Statistički značajna svojstva *N*-glikana označena su masnim slovima. Sivo sjenčanje označava svojstva *N*-glikana koja su izgubila značaj nakon korekcije.

<b><i>N</i>-glikansko svojstvo</b>	<b>Opis</b>	<b>B</b>	<b>p</b>	<b>Korigirana p-vrijednost</b>
IGP1	FA2/A2B	0,251	0,0877	0,1501
IGP2	M5	0,584	$3,67 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-4}$
IGP3	A2G1	0,187	0,2157	0,3188
IGP4	A2BG1	0,393	0,0079	0,0168
IGP5	FA2G1	0,603	$8,56 \times 10^{-5}$	$3,61 \times 10^{-4}$
IGP6	FA2BG1	0,048	0,7373	0,7657
IGP7	M6	0,562	$7,45 \times 10^{-5}$	$3,47 \times 10^{-4}$
IGP8	A2G2	0,060	0,6860	0,7657
IGP9	A2BG2	0,144	0,3303	0,4295
IGP10	FA2G2	0,053	0,7283	0,7657

**Tablica 16** – nastavak.

<b>N-glikansko svojstvo</b>	<b>Opis</b>	<b>B</b>	<b>p</b>	<b>Korigirana p-vrijednost</b>
IGP11	FA2BG2	-0,094	0,5332	0,6542
IGP12	FA2BG2S1/A1M1G1S1/ A2BG2S1	0,204	0,1666	0,2643
IGP13	A2G2S1	0,443	0,0019	0,0050
IGP14	FA2G2S1	-0,547	$1,95 \times 10^{-4}$	$6,89 \times 10^{-4}$
IGP15	M8/FA2BG2S1	-0,054	0,7219	0,7657
IGP16	FA2BG2S1/A1M1G1S1/ A2BG2S1	-0,037	0,7941	0,7941
IGP17	A2G2S2	1,071	$3,29 \times 10^{-15}$	$4,35 \times 10^{-14}$
IGP18	FA2G2S2	0,311	0,0350	0,0679
IGP19	A2G2S2	1,226	$8,44 \times 10^{-20}$	$1,60 \times 10^{-18}$
IGP20	A2BG2S2	0,066	0,6614	0,7657
IGP21	FA2G2S2	-0,492	$4,90 \times 10^{-4}$	0,0015
IGP22	FA2BG2S2	-0,176	0,2444	0,3381
IGP23	FA3BG3S1	0,053	0,7327	0,7657
IGP24	FA3G3S2	0,354	0,0202	0,0411
IGP25	FA3BG3S2	-0,484	0,0017	0,0048
IGP26	FA3G3S2	-0,190	0,2093	0,3188
IGP27	A3G3S3	0,420	0,0042	0,0094
IGP28	FA3BG3S3/FA3G3S3	-0,225	0,1383	0,2277
IGP29	A3F1G3S3/A3G3S3	0,879	$2,41 \times 10^{-9}$	$1,98 \times 10^{-8}$
IGP30	FA3F1G3S3/FA3G3S3	-0,049	0,7480	0,7657
LB	nisko razgranati glikani (LB)	-0,574	$1,05 \times 10^{-4}$	$4,05 \times 10^{-4}$
HB	visoko razgranati glikani (HB)	0,466	0,0022	0,0052
G0	agalaktozilirani glikani (G0)	0,251	0,0877	0,1501
G1	monogalaktozilirani glikani (G1)	0,263	0,0733	0,1364
G2	digalaktozilirani glikani (G2)	-0,526	$2,87 \times 10^{-4}$	$9,34 \times 10^{-4}$
G3	trigalaktozilirani glikani (G3)	0,466	0,0022	0,0052
S1	Monosijalinizirani glikani	-0,158	0,2911	0,3903
S2	disijalinizirani glikani	-0,172	0,2420	0,3381
S3	trisijalinizirani glikani)	0,629	$2,99 \times 10^{-5}$	$1,78 \times 10^{-4}$

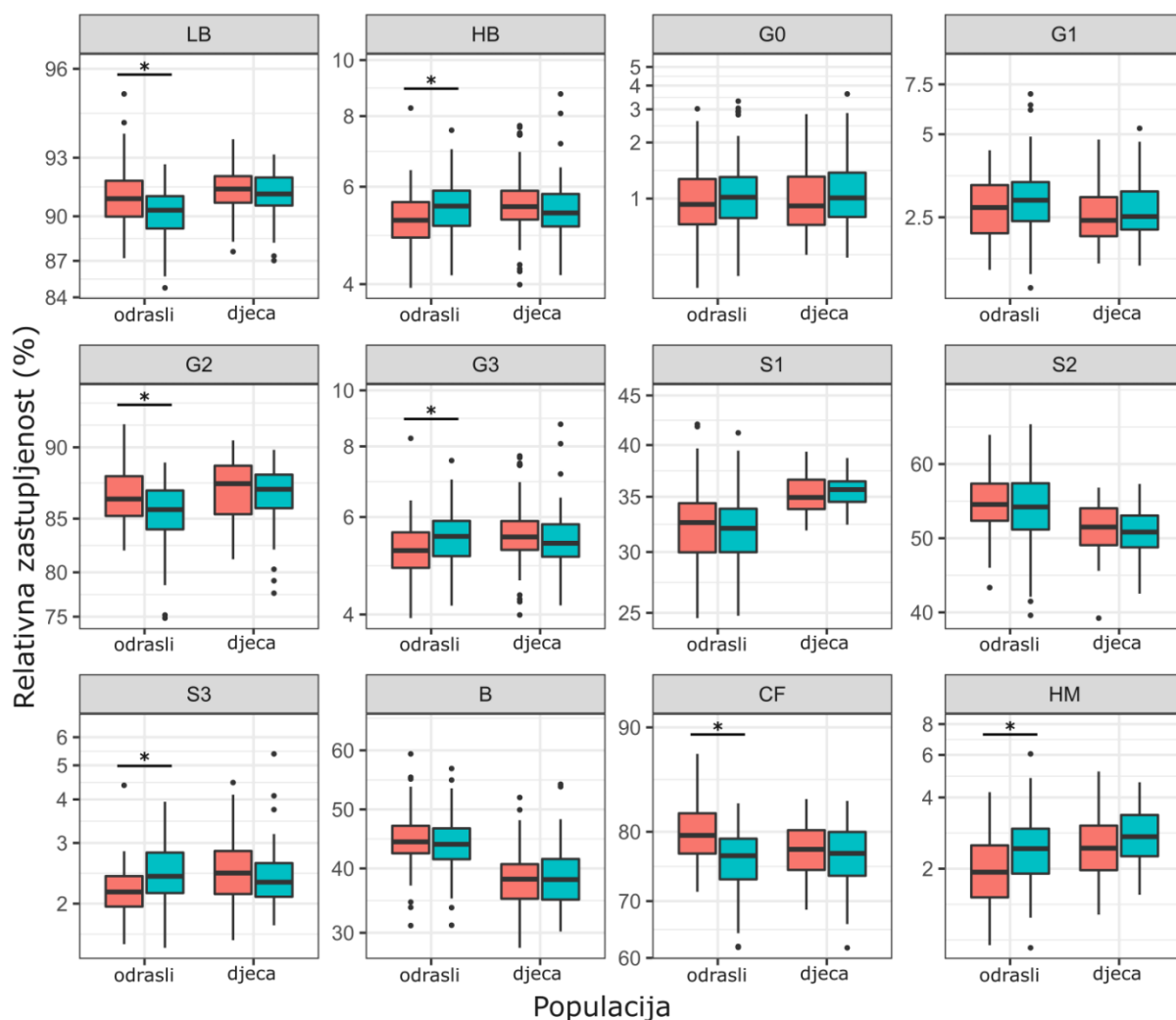
**Tablica 16** – nastavak.

<b>N-glikansko svojstvo</b>	<b>Opis</b>	<b>B</b>	<b>p</b>	<b>Korigirana p-vrijednost</b>
B	Glikani s račvućim GlcNAc-om	-0,108	0,4548	0,5743
CF	Sržno fukozilirani glikani	-0,900	$1,20 \times 10^{-10}$	$1,21 \times 10^{-9}$
HM	Visoko manozni glikani	0,604	$1,57 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-4}$

#### 4.2.3. Usporedba N-glikozilacijskih obrazaca antitijela IgA između dječje i odrasle populacije sa ŠBT1

Za bolju usporedbu i razumijevanje rezultata, izravno izmjerena i derivirana svojstva N-glikana odrasle i dječje populacije detaljno su prikazana na Slikama 11 i 12.

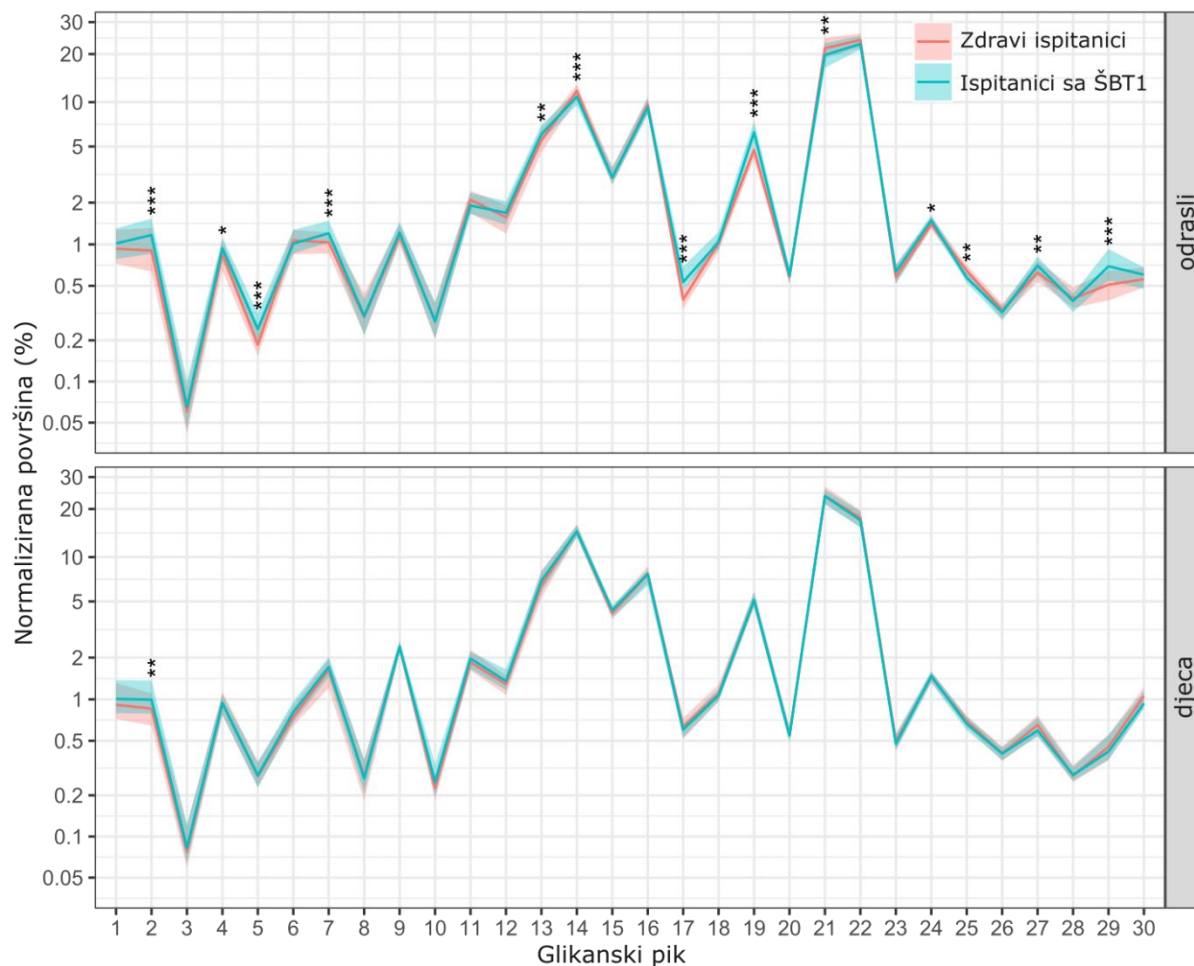
**N-glikom antitijela IgA pokazuje povećanje monosijalinizacije te smanjenje struktura s račvućim GlcNAc-om kod djece u odnosu na odraslu populaciju sa ŠBT1.** Kod djece sa ŠBT1 ni jedno derivirano svojstvo nije doseglo razinu značajnosti nakon korekcije za višestruka testiranja, međutim, četiri derivirana svojstva bila su nominalno značajna. Suprotno tome, primijećene su statistički značajne promjene u sedam deriviranih svojstava antitijela IgA kod odraslih sa ŠBT1. Svojstva prisutna kod odraslih, a koja nisu bila nominalno značajna u dječjoj populaciji su: pad u nisko razgranatim strukturama i digalaktoziliranim strukturama ta pad u sržno fukoziliranim N-glikanima u osoba sa ŠBT1 (Slika 11, LB, G2, CF). U obje populacije primijećen je porast u deriviranom svojstvu koje opisuje oligomanozne strukture (Slika 11, HM), iako je navedeno svojstvo kod djece izgubilo značajnost nakon korekcije. Ostala tri svojstva koja opisuju visoko razgranate glikane, trisijalinizirane i trigalaktozilirane strukture sugeriraju na promjene u obje populacije, međutim, primijećena je obrnuta asocijacija navedenih svojstava sa ŠBT1 kod dviju populacija (Slika 11, HB, G3, S3). Kod djece su ta derivirana svojstva nominalno smanjena, dok je kod odraslih zabilježen statistički značajan porast u tim svojstvima u odnosu na zdrave kontrole. Zbog dizajna eksperimenta, nije moguće izravno statistički uspoređivati rezultate dobivene na dječjoj i odrasloj populaciji, već samo njihove promjene u odnosu na kontrolne skupine. Ipak, grafovi sugeriraju da dječja populacija, uključujući ispitanike sa i bez ŠBT1, pokazuje trend povišene monosijalinizacije te smanjene razine struktura s račvućim GlcNAc-om na antitijelu IgA u odnosu na odraslu populaciju (Slika 11, S1, B).



**Slika 11.** Usporedba deriviranih svojstava *N*-glikana antitijela IgA u ovisnosti o prisutnosti ŠBT1 između djece i odraslih. P-vrijednosti su naznačene iznad odgovarajućih grafova. Crvena boja – zdravi ispitanici; zelena boja – ispitanici sa ŠBT1. Značajne asocijacije označene su zvjezdicom (\*).

**Izravno izmjerena *N*-glikozilacijska svojstva antitijela IgA ukazuju na specifične razlike između dječje i odrasle populacije sa ŠBT1.** Od izravno izmjerenih *N*-glikozilacijskih svojstava, u djece na početku bolesti samo je IGP2 (Man5) povećan sa ŠBT1. Ista promjena primijećena je u odrasloj populaciji gdje je također i IGP7 (Man6) povećan u ŠBT1. Usporedba glikozilacijskih obrazaca izravno mjenjenih svojstava antitijela IgA dviju populacija prikazana je na Slici 12. Kao i u prijašnjem slučaju zbog dizajna eksperimenta, nije moguće izravno statistički uspoređivati podatke dviju populacija; međutim, promjene na grafovima sugeriraju da nekolicina izravno izmjerenih svojstava izražava drugačiju ponašanje kod djece u usporedbi s odraslom populacijom prema međusobnom omjeru površina glikanskih pikova. Najizraženije

razlike koje se naznačuju na grafu (Slika 12) su manji relativni udio IGP6 u odnosu na IGP7 kod djece, obrnuti omjeri IGP21 i IGP22 u usporedbi dviju populacija te različito ponašanje posljednja dva *N*-glikanska svojstva, IGP29 i IGP30.



**Slika 12.** Usporedba *N*-glikozilacijskih profila izravno izmjerenih svojstava antitijela IgA između djece i odraslih. X-os predstavlja glikanski pik antitijela IgA (IGP); Y-os predstavlja relativnu količinu *N*-glikana. Razina značajnosti označena je \*. Crvena linija – zdravi ispitanici; zelena linija – ispitanici sa ŠBT1.

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. *N*-glikozilacija serumskih proteina u ŠBT1

Analiza razina *N*-glikana ukupnih serumskih proteina provedena je na 200 odraslih ispitanika sa ŠBT1 i 298 zdravih kontrola. Relativne razine *N*-glikana uspoređene su između ispitanika sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih osoba, a uočene razlike koje su dosegle statističku značajnost uspoređene su s rezultatima prethodne studije u djece i adolescenata na početku bolesti [9] kako bi se identificirale sličnosti i razlike u promjenama glikana (Tablica 17). Također je ispitana korelaciju između *N*-glikana i glikemijske kontrole, statusa komplikacija, trajanja bolesti i navika pušenja u ispitanika sa ŠBT1.

**Tablica 17.** Usporedba značajnih asocijacija *N*-glikana ukupnih serumskih proteina sa ŠBT1 između odrasle populacije i djece na početku bolesti. Podaci za djecu preuzeti su i prilagođeni iz Rudman i sur., 2022. [9]. „Povećanje“ označava *N*-glikansko svojstvo pozitivno korelirano sa ŠBT1, „Smanjenje“ označava *N*-glikansko svojstvo negativno asocirano sa ŠBT1.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	Opis	Promjene kod odraslih povezane sa ŠBT1	Promjene kod djece povezane s početkom ŠBT1 [9]
GP1	FA2		
GP2	M5; FA2B		Povećanje
GP3	A2BG1		
GP4	FA2[6]G1	Smanjenje	Smanjenje
GP5	FA2[3]G1	Smanjenje	Smanjenje
GP6	FA2[6]BG1		
GP7	M6	Smanjenje	Povećanje
GP8	A2G2	Povećanje	
GP9	A2BG2		
GP10	FA2G2		Smanjenje
GP11	FA2BG2		
GP12	M7; A2G2S1	Povećanje	Povećanje
GP13	FA2G1S1	Smanjenje	
GP14	A2G2S1	Povećanje	
GP15	A2BG2S1		
GP16	FA2G2S1		
GP17	FA2BG2S1		
GP18	A2G2S2	Povećanje	



**Tablica 17** – nastavak.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	Opis	Promjene kod odraslih povezane sa ŠBT1	Promjene kod djece povezane s početkom ŠBT1 [9]
GP19	M9		
GP20	A2G2S2		
GP21	A2G2S2	Povećanje	Povećanje
GP22	FA2G2S2	Povećanje	Povećanje
GP23	FA2BG2S2		Povećanje
GP24	A3G3S2		
GP25	A3G3S2	Povećanje	Povećanje
GP26	A3G3S2	Smanjenje	
GP27	A3F1G3S2	Povećanje	
GP28	A3G3S3		
GP29	A3G3S3	Povećanje	Povećanje
GP30	A3G3S3	Smanjenje	
GP31	FA3G3S3		
GP32	A3G3S3	Smanjenje	
GP33	A3F1G3S3	Povećanje	
GP34	FA3G3S3		
GP35	FA3F1G3S3	Povećanje	
GP36	A4G4S3		
GP37	A4G4S4		
GP38	A4G4S4		
GP39	A4F1G4S4	Povećanje	
LB	nisko razgranati glikani		
HB	visoko razgranati glikani		
G0	agalaktozilirani glikani		
G1	monogalaktozilirani glikani	Smanjenje	Smanjenje
G2	digalaktozilirani glikani	Povećanje	

**Tablica 17** – nastavak.

<i>N</i> -glikansko svojstvo	Opis	Promjene kod odraslih povezane sa ŠBT1	Promjene kod djece povezane s početkom ŠBT1 [9]
G3	trigalaktozilirani glikani		
G4	tetragalaktozilirani glikani		
S0	neutralni glikani		
S1	monosijalinizirani glikani	Povećanje	
S2	disijalinizirani glikani		
S3	trisijalinizirani glikani		
S4	tetrasijalinizirani glikani		
B	glikani s račvajućim GlcNAc-om		Povećanje
AF	antenarno fukozilirani glikani	Povećanje	
CF	sržno fukozilirani glikani		
HM	oligomanozni glikani		Povećanje

#### 5.1.1. Promjene *N*-glikozilacije ukupnih serumskih proteina kod odraslih sa ŠBT1 i djece na početku bolesti

U usporedbi s *N*-glikomom ukupnih proteina plazme u djece sa ŠBT1, sedam izravno izmjerenih glikanskih svojstava i jedno derivirano svojstvo (smanjena monogalaktozilacija) bili su zajednički djeci i odraslima sa ŠBT1; dvanaest izravno mjerenih i tri derivirana svojstva identificirane su kao nove asocijacije kod odraslih ispitanika; dok četiri izravno mjerena i dva derivirana svojstva koja su bila relevantna kod djece, nisu bila značajna kod odraslih.

Najistaknutija promjena povezana sa ŠBT1 u odraslih bilo je povećanje deriviranog svojstva ukupne antenarne fukozilacije (ili  $\alpha$ -1,3-fukozilacija) serumskih proteinskih *N*-glikana. Povećane razina  $\alpha$ 1,3-fukozilacije triantenarnih i tetraantenarnih glikana ranije su zabilježene u serumima ljudi s kroničnom upalom [145], te je otkriveno da je glavni nositelj  $\alpha$ 3-

fukoziliranih struktura u ljudskom serumu protein AGP [146]. AGP je protein akutne faze koji se proizvodi i glikozilira u jetri, a istraživanja su pokazala da se koncentracije AGP u plazmi ne razlikuju značajno između odraslih osoba sa ŠBT1 i zdravih osoba [6,147]. Iako u mom istraživanju nije određivana koncentracija proteina AGP u serumu, rezultati sugeriraju da je povećanje antenarne fukozilacije posljedica promjena u glikozilaciji, a ne poremećaja razine AGP. Povećana  $\alpha$ 3-fukozilacija proteina AGP prethodno je uočena kod osoba sa ŠBT1, doduše u istraživanju temeljenom na lektinskim testovima [6]. U recentnom istraživanju uspoređena je i antenarna fukozilacija između različitih tipova dijabetesa te je pokazano da ispitanici sa ŠBT1 u pravilu imaju najviše razine antenarne fukozilacije glikopeptida AGP [55]. Iako je promjena u antenarnoj fukozilaciji bila najjača i statistički najznačajnija asocijacija u mom istraživanju, niti jedno od ovih glikanskih svojstava, uključujući bilo koju od izravno izmjerenih glikana sa antenarnom fukozom, nisu ranije primijećeni kod djece na početku bolesti [9] (Tablica 17). Navedeno sugerira da ova promjena nije povezana s autoimunom reakcijom usmjerenom protiv antigena Langerhansovih otočića na početku ŠBT1, ali može se tumačiti kao posljedica abnormalnih metaboličkih procesa tijekom dugotrajne ŠBT1 popraćene upalom.

Derivirano svojstvo koje opisuje monogalaktozilirane strukture bilo je negativno povezano sa ŠBT1 u odraslih ispitanika. Ta je promjena primarno bila uzrokovana smanjenim razinama glikana FA2G1S1 te dviju struktura koje potječu isključivo sa serumskog antitijela IgG [146] (FA2[3]G1 i FA2[6]G1). U istraživanju na djeci novodijagnosticiranoj ŠBT1 primijećena su slična opažanja smanjene monogalaktozilacije, kao i smanjene razina glikana FA2[3]G1 i FA2[6]G1 [9], međutim, promjena u strukturi FA2G1S1 nije uočena u njihovom slučaju. Zanimljivo je da su u tom prethodnom istraživanju dvojici nezahvaćene braće i s vrlo niskom monogalaktozilacijom (ispod Q1) kasnije dijagnosticirali ŠBT1. Postojanost smanjene monogalaktozilacije u djece na početku bolesti i odraslih sa ŠBT1 mogla bi biti posredovana genskim čimbenicima koji pridonose predispoziciji na autoimune bolesti.

Suprotno tome, digalaktozilacija, potaknuta povećanjem asijaliniziranih digalaktoziliranih i mono- i disijaliniziranih, digalaktoziliranih struktura, bila je povećana u odraslih osoba sa ŠBT1, dok je monosijalinizacija također bila povišena povećanjem u razinama glikana A2G2S1. A2G2S1 je struktura koja se nalazi na nekoliko serumskih glikoproteina, a primarno na  $\alpha$ -1B-glikoproteinu, haptoglobinu i antitijelu IgA [146]. Otkriveno je da svi ovi proteini imaju bitnu ulogu u ŠBT1 ili pokazuju poremećaje koncentracije, odnosno funkcije kod ljudi s tom bolešću: razine  $\alpha$ -1B-glikoproteina pozitivno su povezane s lošom

glikemijskom kontrolom i ŠBT1 [148]; haptoglobin ima dobro poznatu ulogu u predispoziciji za dijabetičke kardiovaskularne komplikacije bolesti [149]; za antitijelo IgA je primijećen poremećaj katabolizma u ŠBT1 [18]. Haptoglobin također služi kao ligand za siglec-2 (CD22) [150], imunoglobulinu sličan lektin prisutan na imunskim stanicama i  $\beta$ -stanicama gušterače koje proizvode inzulin [151]. Promjene u sijalinizaciji haptoglobina mogle bi modulirati njegovo vezanje na CD22 i time imati ulogu procesima upale te potencijalno i u održavanju homeostaze glukoze. Promjene ovih dvaju deriviranih svojstava su nove asocijacije sa ŠBT1 u odraslim ispitanicima koje nisu ranije primijećene kod djece [9].

Digalaktozilirani i disijalinizirani GP21 (A2G2S2) i njegov sržno fukoziliran oblik GP22 (FA2G2S2) bili su povećani i kod djece i kod odraslih sa ŠBT1. Ove strukture karakteristične su za niz glikoproteina, a daleko najzastupljenije su na  $\alpha$ -1-antitripsinu i hemopeksinu [146].  $\alpha$ -1-antitripsin je protein koji ima dokazano protuupalno i imunomodulatorno djelovanje u kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti [152], no pojavljuje se sve više dokaza o njegovoj ulozi u drugim upalnim i autoimunim stanjima, kao što je šećerna bolest [153,154], u kojem se postepeno utvrđuje njegov terapijski potencijal [155,156]. Također je pokazano da je hemopeksin pojačano eksprimiran u krvnoj plazmi ispitanika sa ŠBT1 te da je njegova ekspresija povezana s oksidativnim stresom izazvanim glukozom [32].

Povećanje digalaktoziliranog, monosijaliniziranog GP14 (A2G2S1) nije primijećeno u djece, ali treba napomenuti da je analiza *N*-glikoma kod djece rađena na uzorcima plazme dok je moje istraživanje rađeno na uzorcima seruma. Iako su *N*-glikomi seruma i plazme usporedivi, postoje razlike uglavnom u strukturama koje potječu sa fibrinogena (GP14 i GP20) [157]. To su glikani A2G2S1 i A2G2S2 te predstavljaju najdominantnije strukture vezane na fibrinogen [157]. Te se strukture također nalaze na nizu različitih proteina u plazmi, međutim *N*-glikani sa fibrinogena čine značajan udio u *N*-glikomu plazme, posebno za GP14. Procjena usporedivosti ovih promjena glikana zahtijevala bi dodatna istraživanja.

Pik GP12, koji je povećan kod djece i odraslih sa ŠBT1, sastoji se od dvije strukture: oligomanoznog Man7 i monosijaliniziranog glikana A2G2S1. Struktura Man7 u ljudskom serumu uglavnom potječe s imunoglobulina E (IgE) [146] koji ima dobro poznatu ulogu u alergijskim reakcijama te je opaženo da su razine IgE povišene u djece sa ŠBT1 [17] i da je povećana učestalost alergija posredovanim antitijelom IgE u djece i adolescenata sa ŠBT1 [158]. S obzirom na navedeno, povećanje razina GP12 u djece sa ŠBT1 moglo bi biti posljedica povišenih razina IgE. Suprotno Man7, digalaktozilirana i monosijalinizirana struktura A2G2S1

nalazi se na više različitih proteina seruma spomenutih ranije. Donekle je teško procijeniti je li povećanje u GP12 uzrokovano promjenom u točno istoj glikanskoj strukturi u slučaju djece i odraslih, budući da je u istraživanju na djeci derivirano svojstvo koje prikazuje ukupnu manozilaciju proteina plazme značajno povećano, a u djece je potaknuto povećanjem GP2, GP7 i GP12 (Man5, Man6, odnosno Man7) [9]. U tom istraživanju nije uočena značajna promjena za derivirano svojstvo manozilacije, ali je za monosijalinizaciju. U nedavnom istraživanju također je pokazano da su visoko manozilirane *N*-glikanske strukture na komponenti komplementa C3, koji ima značajnu ulogu u upalnom odgovoru, povećane kod djece na početku ŠBT1 [159]. Za razliku od povećanja razina oligomanoznih struktura kod djece, GP7 (Man6) bio je značajno smanjen u odraslih sa ŠBT1, a taj glikan se uglavnom nalazi na imunoglobulinu M [146]. Imunoglobulin M je antitijelo koje također funkcionira kao ligand za receptor CD22 [150] te bi potencijalno mogao imati ulogu u autoimunom šećernom bolesti. Iako su rezultati kod djece i odraslih suprotnog pomaka, ovo opažanje moglo bi se objasniti istraživanjima koja pokazuju da je koncentracija IgM povećana na početku ŠBT1 [136], a smanjena u odraslih s tom bolešću [118], što ukazuje na poremećaje i ovog imunoglobulina u šećernom bolesti.

U prethodnom istraživanju *N*-glikozilacije u djece i adolescenata na početku bolesti, derivirano svojstvo koje opisuje strukture s račvajućim GlcNAc-om bilo je povišeno u skupini sa ŠBT1 u usporedbi s njihovom zdravom braćom i sestrama te su u istraživanju identificirane nove genske varijante koja pridonose nastajanju ovih promjena, a prethodno nisu prijavljene za opću europsku populaciju [9,62]. Nove povezanosti pronađene su između genskih varijanti bliskih kandidatnom genu *MGAT3*, koji kodira *N*-acetilglukozaminiltransferazu (transferazu račvajućeg GlcNAc-a) i dva glikana s račvajućim GlcNAc-om (FA2BG2S2 i FA2BG2) vezanima na IgG [62]. Te promjene u razinama glikana nisu se odražavale u diferencijalnoj glikemijskoj kontroli (vidi odjeljak u nastavku), niti su perzistirale u odrasloj dobi. U tom pogledu, ti glikani mogli bi biti posebno važni za procese na početku bolesti ili biti važni pokazatelji procesa na početku bolesti.

Di- i trisijalinizirane *N*-glikanske strukture, kao što su A3G3S2 i A3G3S3, prisutne su u više glikanskih pikova kromatograma u različitim izomernim oblicima, koji se razlikuju po tipu veze sijalinske kiseline. U ovom istraživanju je primijećena povećana sklonost prema određenom tipu veze sijalinske kiseline. Utvrđeno je da različiti izomeri disijaliniziranog glikana A3G3S2 imaju obrnutu korelaciju sa ŠBT1 (GP25 je povećan, a GP26 je smanjen). Alternativno, postoji mogućnost da bi GP26 mogao biti smanjen zbog povećanja njegove

antenarno fukozilirane varijante, GP27. Dok se A3G3S2 može pripisati raznim proteinima, također je objavljeno da postoji kao nepotpuna glikoforma na proteinu AGP [146]. Slično prethodnom opažanju, izomeri A3G3S3 imali su neuniformnu korelaciju sa ŠBT1 (GP29 je bio povećan, a GP30 smanjen). Dodatni izomer A3G3S3 strukture (GP32) također je smanjen u ŠBT1; međutim, to bi moglo biti posljedica povećanja njegovog antenarno fukoziliranog oblika (GP33). Struktura A3G3S3 se nalazi na nizu različitih serumskih glikoproteina, a najviše na AGP-u [146]. Zanimljivo je da su glikani GP25 i GP29 također bili povišeni u djece sa ŠBT1, ali nije primijećeno smanjenje njihovih izomernih oblika (GP26 i GP30) [9]. Ovi rezultati mogli bi ukazivati na promijenjenu aktivnost specifičnih sijaliltransferaza u odraslih sa ŠBT1. Sijalinske kiseline utječu na uklanjanje proteina iz seruma i izravno su uključene u aktivaciju i kontrolu imunskog sustava, međutim, dokazano je da te funkcije ovise o tipu vezanja ( $\alpha$ -2,6 ili  $\alpha$ -2,3) sijalinske kiseline [160,161]. Sklonost prema  $\alpha$ -2,6 tipu vezanja sijalinske kiseline, za koji je odgovorna sijaliltransferaza ST6GAL1, opažena je u ŠBT2 [162]. Međutim, smanjena ekspresija gena *ST6GAL1* u B-stanicama asocirana je s rizičnim alelima za ŠBT1 [163]. Aktivnost enzima ST6GAL1 bila je povećana nakon upale u serumu i jetri štakora [164] te je predložena uloga te sijaliltransferaze u ograničavanju upale tijekom starenja [165]. U suštini, enzim ST6GAL1 mogao bi imati ulogu u suzbijanju akutne i kronične upale u različitim patofiziološkim stanjima. Suprotno  $\alpha$ -2,6 sijalinizaciji, stopa  $\alpha$ -2,3 sijalinizacije pada u ŠBT2, međutim porast  $\alpha$ -2,3 sijalinizacije pronađen je u post-kirurškoj, akutnoj upali [65,166]. Štoviše, razine i  $\alpha$ -2,3 i  $\alpha$ -2,6 sijalinizacije kompleksnijih glikana bile su povišene u pacijenata s upalnom bolešću crijeva u odnosu na zdrave kontrole [167]. Kompleksni, sijalinizirani i fukozilirani glikani često sadrže terminalne epitope sijalil-Lewis X (epitopi koji se sastoje od antenarne fukoze s  $\alpha$ -2,3-vezanom sijalinskom kiselinom), osobito na proteinima akutne faze [33, 35, 46]. Pretpostavlja se da povećane razine epitopa sijalil-Lewis X na glikoproteinima plazme tijekom upale imaju protuupalne učinke blokiranjem adhezije i ekstravazacije imunskih stanica u tkiva [47]. Promjena  $\alpha$ -2,3 sijalinizacije mogla bi biti indikator poremećenih protuupalnih mehanizama. Nažalost zbog dizajna i načina određivanja struktura *N*-glikoma ukupnih serumskih proteina u ovom eksperimentu, nije moguće zaključivati o tipovima vezanja prisutnim u pojedinim glikanskim pikovima.

#### 5.1.2. *N*-glikom ukupnih serumskih proteina i glikemijska regulacija

U istraživanju je određena i povezanost između glikemijskih parametara (razine HbA1c, koncentracije glukoze natašte i postprandijalno) i *N*-glikozilacije ukupnih serumskih proteina u

odraslih osoba sa ŠBT1. Promjene u razinama HbA1c snažno su korelirane s *N*-glikomom ispitanika, dok s druge strane nije uočena korelacija između koncentracije glukoze natašte i postprandijalno te *N*-glikana ukupnih serumskih proteina. Slično opažanje također su utvrdili i autori Bermingham i sur. [7].

Najistaknutije promjene povezane s povećanjem razina HbA1c mogu se sažeti kao porast u visoko razgranatim, trigalaktoziliranim i trisijaliniziranim strukturama, odnosno da je loša glikemijska kontrola obilježena povećanom složenošću *N*-glikoma ukupnih serumskih proteina. Posljedično, nisko razgranati glikani imaju manju zastupljenost kod ljudi s lošom glikemijskom kontrolom. Ovo je djelomično u skladu s prethodnim studijama u kojima je povećanje razina HbA1c povezano s nižom relativnom zastupljenošću jednostavnih biantenarnih *N*-glikana i višom relativnom zastupljenošću složenijih struktura s više grananja, galaktozilacije i sijalinizacije [7,47]. U ovom istraživanju je uočena negativna povezanost sržno fukožiliranih, monogalaktoziliranih GP4 i GP5 (FA2G1) s povećanjem razina HbA1c. Ti su glikani negativno korelirali sa ŠBT1 kod odraslih ispitanika, ali i kod djece na početku bolesti [9], kao i s lošom glikemijskom kontrolom [7]; stoga njihovu stvarnu individualnu vrijednost u procjeni rizika treba uzeti u obzir nakon korekcije za glikemijski status.

Derivirano svojstvo koje opisuje ukupne oligomanozne glikane nije doseglo statističku značajnost; međutim, pozitivna povezanost s porastom u vrijednostima HbA1c uočena je za visoko manozilirani GP19 (Man9). Autori Clerc i sur. pokazali su da Man9 uglavnom potječe od apolipoproteina B-100 (ApoB-100) i u mnogo manjoj mjeri od imunoglobulina D [146]. Također je pokazano da je koncentracija ApoB-100 pozitivno korelirana s lošom glikemijskom kontrolom [168,169], stoga se ta razlika može objasniti povećanjem relativnih koncentracija ApoB-100 u ukupnim serumskim proteinima.

Slično kao i sa ŠBT1, uočena je sklonost prema specifičnim izomerima A3G3S2 i A3G3S3 glikana s porastom u vrijednostima HbA1c. Zanimljivo je da je asocijacija ovih sklonosti s promjenama u razinama HbA1c bila obrnuta u odnosu na asocijaciju sa ŠBT1: pik GP25 se povećao u ŠBT1, a pik GP26 smanjio, dok su njihove povezanosti bile suprotne s porastom u razinama HbA1c. Slična je pojava uočena za trigalaktozilirane i trisijalinizirane glikane A3G3S3: GP29 je imao negativnu korelaciju, dok je GP30 imao pozitivnu korelaciju s povećanjem razina HbA1c. U usporedbi s *N*-glikanskim asocijacijama za ŠBT1, uočene su povišene razine GP29 i smanjene razine GP30. To bi moglo ukazivati na sklonost tipu vezanja sijalinske kiseline kod pojedinaca s lošom glikemijskom kontrolom i povećanu aktivnost

specifičnih sijaliltransferaza. Kao što je već spomenuto, pristranost prema  $\alpha$ -2,6 sijalinizaciji prethodno je uočena u ŠBT2 [162] što bi moglo ukazivati na zajednički dugoročni odgovor na povišene koncentracije glukoze u krvi, u slučaju da su promjene u  $\alpha$ -2,6 sijalinizaciji korelirane s porastom u razinama HbA1c.

Pozitivna povezanost visokih razina HbA1c s visoko razgranatim strukturama *N*-glikana također se može objasniti povećanim priljevom glukoze u biosintetski put heksozamina, uzrokovanim hiperglikemijom, čime se utječe na enzimsku kinetiku i dostupnost supstrata donora potrebnog za grananje *N*-glikana, kao što je već postulirano ranije [7].

### 5.1.3. Utjecaj dijabetičkih komplikacija, trajanja bolesti i pušenja na *N*-glikozilaciju u ŠBT1

Iako su dijabetičke komplikacije često u korelaciji s visokim razinama HbA1c (vrijednosti više od 7,2 %) [170], čiji se učinak snažno odražava u *N*-glikomu, u mom istraživanju *N*-glikani nisu bili u korelaciji sa statusom komplikacija. U zasebnoj studiji na dijabetičkoj retinopatiji uočeno je povećanje razina glikana u staklovini oka, specifičnije povećanje sijaliniziranih glikana te izostanak promjena u *N*-glikomu plazmatskih proteina [63]. U tom istraživanju je također pokazano da stimulacija mikrovaskularnih endotelnih stanica mrežnice visokim razinama glukoze *in vitro* dovodi do pojačane ekspresije sijaliltransferaza ST3GAL1 i ST3GAL4. Navedena opažanja sugeriraju na lokalni odgovor stanica i tkiva na visoku razinu glukoze, umjesto sustavnog odgovora [63]. Nadalje, u drugom istraživanju pokazana je povezanost *N*-glikozilacijskih svojstava molekule IgG i ukupnih serumskih proteina s dijabetičkom bolesti bubrega, točnije složenijih *N*-glikana s većim omjerom albumina i kreatinina i strmijim padom procijenjene brzine glomerularne filtracije (eGFR, engl. *Estimated glomerular filtration rate*) [7]. Poland i suradnici su s druge strane primijetili su povećanje antenarne fukozilacije AGP-a u odnosu na povećano izlučivanje urinarnog albumina u ŠBT1 [6]. Usprkos tim opažanjima, ništa od navedenog nije replicirano u mom istraživanju. Nedostatak asocijacija između glikana i dijabetičkih komplikacija mogao bi biti rezultat ograničenja dizajna eksperimenta: kategorizacije podataka i činjenice da većina ispitanika ima blage ili umjerene komplikacije. Nominalno značajne promjene *N*-glikana ukupnih serumskih proteina sa stupnjem albuminurije opažene u mom istraživanju uključuju porast u oligomanoznom GP7 (Man6) te pad u trigalaktoziliranom i trisijaliniziranom GP23 (A3G3S3). Promjene u tim *N*-glikanskim svojstvima primijećene su i u istraživanju Birmingham i suradnika, koji su pokazali istosmjernu značajnu korelaciju s rastućim omjerom albumina i kreatinina i padajućom stopom procijenjene glomerularne filtracije [7]. Asocijacije *N*-glikana



antitijela IgG s hipertenzijom potvrđene su već u nekoliko istraživanja [171–173]. Unatoč tome, gotovo je nepostojeći broj istraživanja u dostupnoj literaturi, koja istražuju asocijacije *N*-glikoma ukupnih serumskih proteina s hipertenzijom. U ovom istraživanju nisu pronađene statistički značajne asocijacije *N*-glikana s hipertenzijom u osoba sa ŠBT1, međutim, zabilježene su nominalne promjene u visoko razgranatim, di- i trisijaliniziranim strukturama.

Uz utjecaj komplikacija, u ovom istraživanju je ispitan učinak trajanja bolesti na *N*-glikoprofil ukupnih serumskih proteina, međutim, niti jedno od glikozilacijskih svojstava nije pokazalo značajne asocijacije s trajanjem bolesti. Prema navedenom je moguće zaključiti da iako se *N*-glikozilacija ukupnih serumskih proteina razlikuje kod djece i odraslih sa ŠBT1, samo trajanje bolesti nema izražen utjecaj na *N*-glikom pojedinaца sa ŠBT1. Razlike između dvije dobne skupine mogle biti posljedica patofizioloških procesa koji se događaju u osoba sa ŠBT1 tijekom puberteta, te promjena imunskih i metaboličkih aspekata uzrokovanih odgovorom na blagu kroničnu upalu koja prati ovu autoimunu bolest [174].

Zajedno s lošom glikemijskom kontrolom, pušenje doprinosi riziku od razvoja dijabetičkih komplikacija. Činjenica da pušenje izaziva promjene u glikozilacijskim obrascima različitih glikoproteina poznata je iz prethodnih studija [175,176]. U mom je istraživanju kod pušača sa ŠBT1 uočen pomak od jednostavnih prema visoko razgranatim glikanima, kao i promjene u ukupnoj sržnoj fukozilaciji te glikanima koji nose račvajući GlcNAc. Ove promjene u *N*-glikomu ukupnih serumskih proteina podudaraju se s promjenama često viđenim u upalnim procesima (povećanje visokih razgranatih struktura, visoko galaktoziliranih i visoko sijaliniziranih glikana), što sugerira da pušenje dovodi do upale [177,178]. Uz pojedine razlike, moji rezultati donekle se podudaraju s prethodnim studijama [175,176,179]. U prijašnjim istraživanjima je uočeno povećanje antenarne fukozilacije za koje nije pronađena statistički značajna povezanost u ovom istraživanju. Također je kod pušača sa ŠBT1 uočeno smanjenje razina struktura koje nose račvajući GlcNAc, dok je suprotna povezanost prethodno prijavljena za opću populaciju, iako u njihovom slučaju za *N*-glikane IgG-a [179]. Nepodudarnost mojih i literaturnih podataka mogla bi biti posljedica interakcija između pušenja, koje izaziva brojne patofiziološke promjene, i pozadinskih procesa aktivne autoimune bolesti kao što je ŠBT1. Ukratko, u ovom istraživanju su otkrivene nove asocijacije između glikozilacije i pušenja, koje također potvrđuju proupalni fenotip *N*-glikoma serumskih proteina.

## 5.2. *N*-glikozilacija antitijela IgA u ŠBT1

Antitijelo IgA je obilno glikozilirana važna komponenta imunskog sustava te drugi najzastupljeniji izotip antitijela u ljudskom organizmu [35]. *N*-glikozilacija antitijela IgA je nedovoljno proučavana u kontekstu ŠBT1, posebice u djetinjstvu. Ovo je prvo istraživanje koje je analiziralo *N*-glikozilaciju proteina IgA u djece i odraslih sa ŠBT1. Rezultati pokazuju da se ŠBT1 ne odražava značajno na *N*-glikom antitijela IgA u djece na početku bolesti, budući da je kod djece sa ŠBT1 samo jedno *N*-glikansko svojstvo (Man5) povišeno u odnosu na njihovu zdravu braću i sestre. S druge strane, u odraslih je primijećeno mnoštvo promjena sa ŠBT1 te pomaci u *N*-glikomu antitijela IgA prema složenijim triantenarnim strukturama u odnosu na zdrave ispitanike.

Istraživanja su pokazala da koncentracija antitijela IgA u serumu raste kod dijela ispitanika sa ŠBT1 [17,18], a smatra se da je to posljedica poremećenog katabolizma, tj. umanjene mogućnosti uklanjanja antitijela IgA iz cirkulacije, što dovodi do njegove povećane koncentracije. Osim toga, dokazano je da razgradnja antitijela IgA u jetri uvelike ovisi o glikozilaciji ovog antitijela te da su receptori ASGPR u hepatocitima ključni za prepoznavanje pravilno glikozilirane molekule IgA koja bi trebala imati izložene terminalne galaktoze [101]. Asocijacije *N*-glikozilacijskih svojstava sa ŠBT1 u mojoj studiji sugeriraju da bi navedeno doista mogle biti u korelaciji, budući je primijećeno značajno povećanje kompleksnih struktura, uključujući povećanje trigalaktozilacije i trisijalinizacije u odraslih sa ŠBT1. U tom slučaju povećana sijalinizacija može smanjiti dostupnost terminalnih galaktoza na molekuli IgA te djelovati kao inhibitor i spriječiti vezanje za receptor ASGPR, koji je ključan za kataboliziranje tog glikoproteina u jetri. Put posredovan receptorom ASGPR predstavlja većinski udio kataboliziranja antitijela IgA i njegovih imunokompleksa. U fiziološkim okolnostima, postoji povezanost između obilja *O*-vezanih oligosaharida i brzine kataboličke razgradnje [180] te zbog prisutnosti tih *O*-glikana, povećanje *N*-glikozilacije možda neće imati značajan učinak na ovaj katabolički proces, osim ako izrazito sijalinizirane glikoforme sa svojim negativnim nabojem značajno inhibiraju prepoznavanje receptora [181].

Najrasprostranjenija post-translacijska glikozilacijska modifikacija je sržna fukozilacija, katalizirana enzimom fukoziltransferaza 8 (FUT8). Sržna fukozilacija igra ključnu ulogu u induciranju odgovarajućeg imunskog odgovora [182]. U skupini odraslih ispitanika primijećena je značajno smanjena sržna fukozilacija na molekuli IgA u ŠBT1. Za razliku od antitijela IgA gdje uloga sržne fukozilacije nije dovoljno istražena, smanjena sržna fukozilacija

antitijela IgG dovodi do povećane stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima i većeg afiniteta prema receptoru Fcγ<sub>3</sub>RIII [183]. Sličan način moduliranja funkcije potencijalno bi mogao postojati za antitijelo IgA, budući da su demonstrirane njegove pro- i protuupalne sposobnosti [74]. U prilog tome ide i otkriće da receptor Fcγ<sub>3</sub>RIII pripada istoj obitelji proteina kao i Fcα<sub>1</sub>RI [184] te bi mogao imati srodne regulatorne puteve.

Povećane razine visokih razgranatih, trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih struktura u odraslih sa ŠBT1 mogle bi sugerirati pomak prema podklasi IgA1, koja je prema literaturi ta koja nosi dotične glikane [80]. Povećanje razina sijalinskih kiselina također ukazuje na povećanu aktivnost sijaliltransferaza. Ranije je pokazano da IgA2 ima proupalno djelovanje te da IgA1 bez sijaliniziranih *N*-glikana ima povećan proupalni kapacitet [45]. Je li povećanje sijalinizacije uočeno u ovom istraživanju samo posljedica patofizioloških promjena u sustavu ili pokušaj ublažavanja upale, pitanje je daljnjih istraživanja. Ostaje činjenica da ŠBT1 prati nizak stupanj trajne upale [174] te da podklasa IgA1, posebno kada je obilno sijalinizirana, ima manji afinitet prema receptorima Fcα<sub>1</sub>RI, čime gubi svoje proupalne sposobnosti. Međutim, još uvijek se raspravlja o ulozi oligosaharida u procesu prepoznavanja antitijela IgA od strane receptora Fcα<sub>1</sub>RI. Utvrđeno je da sijalinska kiselina usporava vezanje IgA na ove receptore [185], što sugerira da bi prekomjerna sijalinizacija mogla ometati funkcionalno mjesto vezanja zbog konformacijskih smetnji. Druga mogućnost, kako je predložena u istraživanju o IgA nefropatiji [186], te podržano u eritrocitno-makrofagnom modelu [181] jest da bi povećanje razina sijalinske kiseline moglo učiniti IgA negativnije nabijenim, čime bi se spriječilo njegovo vezanje elektrostatičkom odbojnošću. Prekomjerna, nefiziološka sijalinizacija također može potaknuti upalu, jer smanjuje interakciju s Fcα<sub>2</sub>RI steričkom smetnjom zbog činjenice da vezanje monomernog IgA na Fcα<sub>2</sub>RI pokreće inhibitorne ITAM signale putem  $\gamma$  lanca te održava homeostatske uvjete [74]. Zanimljivo je da je, za razliku od odraslih, u djece sa ŠBT1 primjećujemo nominalno smanjenje visoko razgranatih, trigalaktoziliranih i trisijaliniziranih *N*-glikana, koji se gubi nakon korekcije za višestruka testiranja. Te promjene mogle bi predstavljati neznačajan pomak ravnoteže prema podklasi IgA2, koja djeluje proupalno, u djece na početku bolesti ili bi mogle biti posljedica smanjene razgranatosti i sijalinizacije podklase IgA1, što bi naglasilo njegovo proupalno djelovanje. U oba slučaja navedene promjene mogle bi doprinosti kroničnoj sustavnoj upali koja se javlja već u ranoj dobi kod osoba sa ŠBT1 [174,187]. Također je zabilježeno smanjenje razina nisko razgranatih i digalaktoziliranih struktura koje se u većoj mjeri pripisuju molekulama podklase IgA2. Molekule podklase IgA2 u pravilu nosi jednostavne oligomanozne ili biantenarne glikane [80]. Prijašnje istraživanje o imunokompleksima u

šećernim bolestima pokazalo je da su imunokompleksi koji sadrže molekule podklase IgA1 i IgA2 karakteristični za ŠBT2, dok su imunokompleksi koji sadrže primarno molekule podklase IgA1 najčešće opaženi u ŠBT1 [115]. U tom slučaju bi molekule podklase IgA2 mogle imati veću dostupnost za vezanje za receptore Fc $\alpha$ , a time i izraženiji proupalni učinak. Nadalje, zbog povećane trisijalinizacije koja bi se mogla pripisati molekulama podklase IgA1, ta podklasa bi potencijalno pokazivala smanjeni afinitet prema receptorima Fc $\alpha$ , te na taj način dopustila podklasi IgA2 da se veže za ove receptore s manjom kompeticijom.

S druge strane, u odraslih sa ŠBT1 došlo je do značajnog povećanja oligomanoznih struktura, koje su također nominalno prisutne u djece na početku bolesti. Oligomanozne strukture postoje na antitijelima podklase IgA1, ali su znatno obilnije na proupalnim molekulama podklase IgA2 [94]. Te bi strukture mogle imati ulogu u induciranju sustavne upale aktivacijom komplementa lektinskim putem. Oligomanozne strukture također potencijalno narušavaju katabolizam antitijela IgA, budući da postoji više agalaktoziliranih glikana koji nemaju terminalnu galaktozu potrebnu za prepoznavanje i posljedičnu razgradnju. Osim toga, jedino *N*-glikansko svojstvo antitijela IgA koje je bilo značajno u djece bilo je povećanje Man5, što je također zabilježeno kod odraslih gdje se javlja i povećanje Man6. Povećana razina manozilacije na antitijelu IgA može uzrokovati prepoznavanje i vezivanje molekula MBL, čime se pokreće upalna kaskada aktivacije komplementa lektinskim putem [188]. Nadalje, pokazalo se da se koncentracija molekula MBL povećava u ŠBT1 [33,34], što bi moglo poslužiti za daljnje stimuliranje upale koja je u tijeku zbog pretjerano manoziliranih *N*-glikana antitijela IgA. Pretpostavlja se da se razina MBL i štetna aktivacija komplementa povećavaju kao posljedica šećerne bolesti. U nedavnom radu o djeci na početku ŠBT1, pokazano je da je Man5 na antitijelu IgG značajno povećan u ŠBT1 te da se derivirano svojstvo koje opisuje oligomanozne strukture najviše razlikuje od svih deriviranih svojstava između ispitivanih skupina za *N*-glikane ukupnih plazmatskih proteina [9].

Zanimljivo je da su razine antitijela IgA u djece sa ŠBT1 prema literaturnim podacima također povećane [17], unatoč gotovo normalnoj *N*-glikozilaciji i činjenici da njihova antitijela IgA ne pokazuju povećanje složenih obilno sijaliniziranih *N*-glikana koji bi dovodili do otežanog katabolizma u hepatocitima. Navedeno sugerira da *N*-glikozilacija antitijela IgA značajno ne reflektira patofiziološke promjene na početku ŠBT1 u ranoj dobi, već potencijalno ima ulogu u ili je posljedica dugotrajnih upalnih procesa koji prate uznapredovalu ŠBT1 u odrasloj dobi.

## **6. ZAKLJUČCI**

Ovo istraživanje je ispitalo povezanost *N*-glikozilacije i ŠBT1 u odraslih i usporedilo rezultate s prethodno nađenima u djece na početku bolesti.

U ukupnim serumskim proteinima odraslih sa ŠBT1 otkriveno je smanjenje monogalaktozilacije i promjene u sedam izravno izmjerenih glikana, zajedničke djeci na početku ŠBT1 i odraslima s tom autoimunom bolesti, što može ukazivati na potencijalnu povezanost s genetskim čimbenicima koji doprinose predispoziciji za razvoj autoimunih bolesti. Također su pronađene promjene u *N*-glikanima specifične za odrasle ispitanike sa ŠBT1, kao što su povećana digalaktozilacija, monosijalinizacija i antenarna fukozilacija, koje mogu odražavati promijenjeni metabolizam glukoze i istovremene upalne procese u odraslih s ŠBT1. Nadalje, identificirane su određene promjene u *N*-glikomu ukupnih serumskih proteina jedinstvene za djecu na početku ŠBT1, uključujući povećanje oligomanoznih struktura i glikana s računajućim GlcNAc-om. Te su promjene nedavno povezane s novo prijavljenim genetskim varijantama u istraživanjima genetske asocijacije ŠBT1, podupirući njihovu važnost u nastanku bolesti i sugerirajući potencijalne ciljeve za intervenciju ili praćenje ranog napredovanja bolesti.

Također je pokazano da *N*-glikom nije pod utjecajem trajanja bolesti u odraslih, već da razlike između dobnih skupina u ŠBT1 mogu biti posljedica patofizioloških procesa tijekom puberteta i promjena u imunskim i metaboličkim aspektima uzrokovanim kroničnom upalom. Dijabetičke komplikacije nisu doprinijele promjenama u *N*-glikomu ukupnih serumskih proteina, međutim, vrijedi napomenuti da su u istraživanju ispitanici kategorizirani s obzirom na težinu dijabetičkih komplikacija te većina ispitanika je imala blage ili umjerene komplikacije. Zbog navedenog je moguće da nisu pronađene značajne asocijacije sa statusom komplikacija. Opažena korelacija *N*-glikana s glikemijskom kontrolom podržava prethodna istraživanja koja su pokazala povećanu složenost *N*-glikana, potencijalno uzrokovanu većim priljevom glukoze u biosintetski put heksozamina. Osim toga, otkriveno je da je pušenje u ŠBT1 rezultiralo promjenama *N*-glikana povezanim s upalom, koja se donekle razlikuje od prethodnih rezultata opisanih u općoj populaciji. Razlike u promjenama mogle bi se pripisati potencijalnoj interakciji između patofizioloških promjena uzrokovanih pušenjem te bioloških procesa aktivnih tijekom šećerne bolesti.

Nadalje, otkrivene su promjene u obrascima *N*-glikozilacije antitijela IgA kod osoba sa ŠBT1, koje mogu imati implikacije u imunskom odgovoru i upalnim procesima. U ŠBT1, promjene u *N*-glikozilaciji antitijela IgA iznimno se razlikuju između djece i odraslih. Odrasli ispitanici pokazuju povećanje složenih glikanskih struktura, trigalaktozilacije, trisijalinizacije i

oligomanoznih glikana, te vrlo izražen pad u sržnoj fukozilaciji. Suprotno tome, u djece na početku ŠBT1, pronađena je samo jedna značajna asocijacija *N*-glikoma antitijela IgA i ŠBT1 (povećanje u strukturi Man5), koja sugerira da *N*-glikozilacija antitijela IgA nije znatno asocirana s početkom bolesti, te da su promjene u odrasloj dobi rezultat dugotrajnih upalnih procesa u ŠBT1. Promjene *N*-glikana u odraslih ispitanika sa ŠBT1 sugeriraju moguće učinke na katabolizam antitijela IgA te na njegove pro- i protuupalne funkcije, kao i na sposobnost aktivacije komplementa, međutim, potencijalne naznake promjene omjera podklasa IgA1 i IgA2 zahtijevale bi dodatna istraživanja.

Zaključno, istraživanje daje sveobuhvatniji prikaz promjena u *N*-glikomu koje bi mogle biti specifični pokazatelji ili relevantni za procese na početku ŠBT1 i one koji se javljaju nakon uspostavljanja bolesti. Također naglašava važnost istraživanja *N*-glikozilacije kao modulatora imunskih procesa te nedovoljno istraženu ulogu antitijela IgA u ŠBT1.

## **7. POPIS LITERATURE**



- [1] N.A. Elsayed, G. Aleppo, V.R. Aroda, R.R. Bannuru, F.M. Brown, D. Bruemmer, B.S. Collins, M.E. Hilliard, D. Isaacs, E.L. Johnson, S. Kahan, K. Khunti, M. Kosiborod, J. Leon, S.K. Lyons, L. Murdock, M. Lou Perry, P. Prahalad, R.E. Pratley, J.J. Seley, R.C. Stanton, R.A. Gabbay, 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of care in diabetes—2023, *Diabetes Care*. 46 (2023) S19. <https://doi.org/10.2337/DC23-S002>.
- [2] M. Mobasser, M. Shirmohammadi, T. Amiri, N. Vahed, H.H. Fard, M. Ghojzadeh, Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: A systematic review and meta-analysis, *Heal. Promot. Perspect.* 10 (2020) 98–115. <https://doi.org/10.34172/hpp.2020.18>.
- [3] P. Stanley, N-glycans, *Encycl. Cell Biol.* Vol. 1-6, Second Ed. 2 (2022) 487–494. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821618-7.00047-X>.
- [4] G. Lauc, I. Rudan, H. Campbell, P.M. Rudd, Complex genetic regulation of protein glycosylation, *Mol. Biosyst.* 6 (2010) 329–335. <https://doi.org/10.1039/b910377e>.
- [5] C. Reily, T.J. Stewart, M.B. Renfrow, J. Novak, Glycosylation in health and disease, *Nat. Rev. Nephrol.* 15 (2019) 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- [6] D.C.W. Poland, C.G. Schalkwijk, C.D.A. Stehouwer, C.A.M. Koeleman, B. Van Het Hof, W. Van Dijk, Increased  $\alpha$ 3-fucosylation of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in type I diabetic patients is related to vascular function, *Glycoconj. J.* 18 (2001) 261–268. <https://doi.org/10.1023/A:1012412908983>.
- [7] M.L. Bermingham, M. Colombo, S.J. McGurnaghan, L.A.K. Blackburn, F. Vučković, M.P. Baković, I. Trbojević-Akmačić, G. Lauc, F. Agakov, A.S. Agakova, C. Hayward, L. Klarić, C.N.A. Palmer, J.R. Petrie, J. Chalmers, A. Collier, F. Green, R.S. Lindsay, S. Macrury, J.A. McKnight, A.W. Patrick, S. Thekkepat, O. Gornik, P.M. McKeigue, H.M. Colhoun, N-glycan profile and kidney disease in type 1 diabetes, *Diabetes Care*. 41 (2018) 79–87. <https://doi.org/10.2337/dc17-1042>.
- [8] M. Colombo, A.A. Shehni, I. Thoma, S.J. McGurnaghan, L.A.K. Blackburn, H. Wilkinson, A. Collier, A.W. Patrick, J.R. Petrie, P.M. McKeigue, R. Saldova, H.M. Colhoun, Quantitative levels of serum N-glycans in type 1 diabetes and their association with kidney disease, *Glycobiology*. 31 (2021) 613–623. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa106>.

- [9] N. Rudman, D. Kifer, S. Kaur, V. Simunović, A. Cvetko, F. Pociot, G. Morahan, O. Gornik, Children at onset of type 1 diabetes show altered N-glycosylation of plasma proteins and IgG, *Diabetologia*. 65 (2022) 1315–1327. <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05703-8>.
- [10] M.A. Kerr, The structure and function of human IgA, *Biochem. J.* 271 (1990) 285–296. <https://doi.org/10.1042/bj2710285>.
- [11] K.W. Leong, J.L. Ding, The unexplored roles of human serum IgA, *DNA Cell Biol.* 33 (2014) 823–829. <https://doi.org/10.1089/DNA.2014.2639>.
- [12] G. Kovacs, N. Sipeki, B. Suga, T. Tornai, K. Fechner, G.L. Norman, Z. Shums, P. Antal-Szalmás, M. Papp, Significance of serological markers in the disease course of ulcerative colitis in a prospective clinical cohort of patients, *PLoS One*. 13 (2018) e0194166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194166>.
- [13] R. Lin, H. Chen, W. Shu, M. Sun, L. Fang, Y. Shi, Z. Pang, W. Wu, Z. Liu, Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease, *J. Transl. Med.* 16 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1723-0>.
- [14] J.D. Kinslow, L.K. Blum, K.D. Deane, M.K. Demoruelle, Y. Okamoto, M.C. Parish, S. Kongpachith, L.J. Lahey, J.M. Norris, W.H. Robinson, V.M. Holers, Elevated IgA plasmablast levels in subjects at risk of developing rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatol.* 68 (2016) 2372–2383. <https://doi.org/10.1002/art.39771>.
- [15] R.J. Eliçabe, J.E. Silva, M.N. Dave, M.G. Lacoste, H. Tamashiro, R. Blas, A. Munarriz, G.A. Rabinovich, M.S. Di Genaro, Association between IL-17 and IgA in the joints of patients with inflammatory arthropathies, *BMC Immunol.* 18 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12865-017-0189-9>.
- [16] S. Ben Mkaddem, I. Christou, E. Rossato, L. Berthelot, A. Lehuen, R.C. Monteiro, IgA, IgA receptors, and their anti-inflammatory properties, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 382 (2014) 221–235. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0_10).
- [17] J. Svensson, S. Eising, H.B. Mortensen, M. Christiansen, I. Laursen, Ø. Lernmark, A. Nilsson, L.B. Simonsen, B. Carstensen, F. Pociot, J. Johannesen, 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 (2012) 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.10.019>.
- [18] J. Huang, G. Huang, X. Li, F. Hu, Z. Xie, Y. Xiao, S. Luo, C. Chao, K. Guo, F.S. Wong, Z. Zhou, L. Wen, Altered systemic and intestinal IgA immune responses in individuals with type 1 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 105 (2020) e4616–e4625. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa590>.
- [19] L.A. DiMeglio, C. Evans-Molina, R.A. Oram, Type 1 diabetes, *Lancet* (London, England). 391 (2018) 2449. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5).
- [20] A. Green, S.M. Hede, C.C. Patterson, S.H. Wild, G. Imperatore, G. Roglic, D. Beran, Type 1 diabetes in 2017: global estimates of incident and prevalent cases in children and adults, *Diabetologia.* 64 (2021) 2741–2750. <https://doi.org/10.1007/S00125-021-05571-8>.
- [21] A. Chobot, J. Polanska, A. Brandt, G. Deja, B. Glowinska-Olszewska, O. Pilecki, A. Szadkowska, M. Mysliwiec, P. Jarosz-Chobot, Updated 24-year trend of type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase, *Diabet. Med.* 34 (2017) 1252–1258. <https://doi.org/10.1111/DME.13345>.
- [22] C.C. Patterson, E. Gyürüs, J. Rosenbauer, O. Cinek, A. Neu, E. Schober, R.C. Parslow, G. Joner, J. Svensson, C. Castell, P.J. Bingley, E. Schoenle, P. Jarosz-Chobot, B. Urbonaitė, U. Rothe, C. Krzisnik, C. Ionescu-Tirgoviste, I. Weets, M. Kocova, G. Stipancic, M. Samardzic, C.E.D. Beaufort, A. Green, G.G. Dahlquist, G. Soltész, Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase, *Diabetologia.* 55 (2012) 2142–2147. <https://doi.org/10.1007/S00125-012-2571-8>.
- [23] G.D. Ogle, F. Wang, G.A. Gregory, J. Maniam, Type 1 Diabetes estimates in children and adults, *Int. Diabetes Fed. Reports.* 102 (2022) 1–15. <https://diabetes-indonesia.net/2023/01/idf-diabetes-atlas-reports-2022-type-1-diabetes-estimates-in-children-and-adults/>.
- [24] S. Alshiekh, H.E. Larsson, S.-A. Ivarsson, Å. Lernmark, Autoimmune type 1 diabetes, *Textb. Diabetes.* (2016) 143–153. <https://doi.org/10.1002/9781118924853.ch10>.

- [25] P. Concannon, S.S. Rich, G.T. Nepom, Genetics of type 1A diabetes, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 1646–1654. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0808284>.
- [26] S. Onengut-Gumuscu, W.-M. Chen, O. Burren, N.J. Cooper, A.R. Quinlan, J.C. Mychaleckyj, E. Farber, J.K. Bonnie, M. Szpak, E. Schofield, P. Achuthan, H. Guo, M.D. Fortune, H. Stevens, N.M. Walker, L.D. Ward, A. Kundaje, M. Kellis, M.J. Daly, J.C. Barrett, J.D. Cooper, P. Deloukas, Type 1 Diabetes Genetics Consortium, J.A. Todd, C. Wallace, P. Concannon, S.S. Rich, Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers, *Nat. Genet.* 47 (2015) 381–386. <https://doi.org/10.1038/ng.3245>.
- [27] A.O. De Beeck, D.L. Eizirik, Viral infections in type 1 diabetes mellitus — why the  $\beta$  cells?, *Nat. Rev. Endocrinol.* 12 (2016) 263. <https://doi.org/10.1038/NREND0.2016.30>.
- [28] C.M. Filippi, M.G. Von Herrath, Viral trigger for type 1 diabetes: Pros and cons, *Diabetes.* 57 (2008) 2863. <https://doi.org/10.2337/DB07-1023>.
- [29] K. Zorena, M. Michalska, M. Kurpas, M. Jaskulak, A. Murawska, S. Rostami, Environmental factors and the risk of developing type 1 diabetes—old disease and new data, *Biol.* 2022, Vol. 11, Page 608. 11 (2022) 608. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11040608>.
- [30] S. Esposito, G. Toni, G. Tascini, E. Santi, M.G. Berioli, N. Principi, Environmental factors associated with type 1 diabetes, *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00592>.
- [31] P. Arvan, M. Pietropaolo, D. Ostrov, C.J. Rhodes, Islet autoantigens: Structure, function, localization, and regulation, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2012). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007658>.
- [32] C.C. Chen, Y.C. Lu, Y.W. Chen, W.L. Lee, C.H. Lu, Y.H. Chen, Y.C. Lee, S.T. Lin, J.F. Timms, Y.R. Lee, H.C. Chou, H.L. Chan, Hemopexin is up-regulated in plasma from type 1 diabetes mellitus patients: Role of glucose-induced ROS, *J. Proteomics.* 75 (2012) 3760–3777. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2012.04.047>.
- [33] J.A. Østergaard, M. Bjerre, F. Dagnæs-Hansen, T.K. Hansen, S. Thiel, A. Flyvbjerg, Diabetes-induced changes in mannan-binding lectin levels and complement activation in

- a mouse model of type 1 diabetes, *Scand. J. Immunol.* 77 (2013) 187–194. <https://doi.org/10.1111/SJI.12027>.
- [34] T.K. Hansen, S. Thiel, S.T. Knudsen, C.H. Gravholt, J.S. Christiansen, C.E. Mogensen, P.L. Poulsen, Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 4857–4861. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030742>.
- [35] Risk factors for diabetes-related complications | Diabetes | CDC, (bez dat.). <https://www.cdc.gov/diabetes/data/statistics-report/risks-complications.html> (pristupljeno 08. rujan 2023.).
- [36] J.S. Skyler, Hope vs hype: where are we in type 1 diabetes?, *Diabetologia.* 61 (2018) 509–516. <https://doi.org/10.1007/S00125-017-4530-X>.
- [37] A. Varki, Biological roles of glycans, *Glycobiology.* 27 (2017) 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>.
- [38] S. Sun, Y. Hu, M. Ao, P. Shah, J. Chen, W. Yang, X. Jia, Y. Tian, S. Thomas, H. Zhang, N-GlycositeAtlas: A database resource for mass spectrometry-based human N-linked glycoprotein and glycosylation site mapping, *Clin. Proteomics.* 16 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9254-0>.
- [39] H.P. Hammes, X. Du, D. Edelstein, T. Taguchi, T. Matsumura, Q. Ju, J. Lin, A. Bierhaus, P. Nawroth, D. Hannak, M. Neumaier, R. Bergfeld, I. Giardino, M. Brownlee, Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy, *Nat. Med.* 9 (2003) 294–299. <https://doi.org/10.1038/NM834>.
- [40] D.A. McClain, Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes, *J. Diabetes Complications.* 16 (2002) 72–80. [https://doi.org/10.1016/s1056-8727\(01\)00188-x](https://doi.org/10.1016/s1056-8727(01)00188-x).
- [41] S. Milewski, I. Gabriel, J. Olchowy, Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast, *Yeast.* 23 (2006) 1–14. <https://doi.org/10.1002/YEA.1337>.
- [42] Marshall S, Bacote V, Traxinger RR, 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 (1991) 4706–4712. <https://www.jbc.org/content/266/8/4706.short>.
- [43] K. Sasai, Y. Ikeda, T. Fujii, T. Tsuda, N. Taniguchi, UDP-GlcNAc concentration is an important factor in the biosynthesis of beta1,6-branched oligosaccharides: regulation based on the kinetic properties of N-acetylglucosaminyltransferase V, *Glycobiology*. 12 (2002) 119–127. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/12.2.119>.
- [44] K.S. Lau, E.A. Partridge, A. Grigorian, C.I. Silvescu, V.N. Reinhold, M. Demetriou, J.W. Dennis, Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation, *Cell*. 129 (2007) 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.049>.
- [45] K. Taparra, P.T. Tran, N.E. Zachara, Hijacking the hexosamine biosynthetic pathway to promote emt-mediated neoplastic phenotypes, *Front. Oncol.* 6 (2016). <https://doi.org/10.3389/FONC.2016.00085>.
- [46] C. Wittenbecher, T. Štambuk, O. Kuxhaus, N. Rudman, F. Vučković, J. Štambuk, C. Schiborn, D. Rahelić, S. Dietrich, O. Gornik, M. Perola, H. Boeing, M.B. Schulze, G. Lauc, Plasma N-glycans as emerging biomarkers of cardiometabolic risk: A prospective investigation in the epic-potsdam cohort study, *Diabetes Care*. 43 (2020) 661–668. <https://doi.org/10.2337/dc19-1507>.
- [47] T. Keser, I. Gornik, F. Vučković, N. Selak, T. Pavić, E. Lukić, I. Gudelj, H. Gašparović, B. Biočina, T. Tilin, A. Wennerström, S. Männistö, V. Salomaa, A. Havulinna, W. Wang, J.F. Wilson, N. Charutvedi, M. Perola, H. Campbell, G. Lauc, O. Gornik, Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes, *Diabetologia*. 60 (2017) 2352–2360. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4426-9>.
- [48] A. Cvetko, M. Mangino, M. Tijardović, D. Kifer, M. Falchi, T. Keser, M. Perola, T.D. Spector, G. Lauc, C. Menni, O. Gornik, Plasma N-glycome shows continuous deterioration as the diagnosis of insulin resistance approaches., *BMJ Open Diabetes Res. Care*. 9 (2021). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2021-002263>.
- [49] E. Adua, E. Memarian, A. Russell, I. Trbojević-Akmačić, I. Gudelj, J. Jurić, P. Roberts, G. Lauc, W. Wang, High throughput profiling of whole plasma N-glycans in type II

- diabetes mellitus patients and healthy individuals: A perspective from a Ghanaian population, *Arch. Biochem. Biophys.* 661 (2019) 10–21. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2018.10.015>.
- [50] A. Paneque, H. Fortus, J. Zheng, G. Werlen, E. Jacinto, The hexosamine biosynthesis pathway: regulation and function, *Genes* 2023, Vol. 14, Page 933. 14 (2023) 933. <https://doi.org/10.3390/GENES14040933>.
- [51] M.G. Buse, Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: Current status, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 290 (2006). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2005>.
- [52] K. Ohtsubo, J.D. Marth, Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell.* 126 (2006) 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>.
- [53] A. Juszczak, T. Pavić, F. Vučković, A.J. Bennett, N. Shah, E. Pape Medvidović, C.J. Groves, M. Šekerija, K. Chandler, C. Burrows, N. Rojnić Putarek, M. Vučić Lovrenčić, J. Čuća Knežević, T.J. James, A.L. Gloyn, G. Lauc, M.I. McCarthy, K.R. Owen, O. Gornik, Plasma fucosylated glycans and C-reactive protein as biomarkers of HNF1A-MODY in young adult-onset nonautoimmune diabetes., *Diabetes Care.* 42 (2019) 17–26. <https://doi.org/10.2337/dc18-0422>.
- [54] G. Thanabalasingham, J.E. Huffman, J.J. Kattla, M. Novokmet, I. Rudan, A.L. Gloyn, C. Hayward, B. Adamczyk, R.M. Reynolds, A. Muzinic, N. Hassanali, M. Pucic, A.J. Bennett, A. Essafi, O. Polasek, S.A. Mughal, I. Redzic, D. Primorac, L. Zgaga, I. Kolcic, T. Hansen, D. Gasperikova, E. Tjora, M.W.J. Strachan, T. Nielsen, J. Stanik, I. Klimes, O.B. Pedersen, P.R. Njølstad, S.H. Wild, U. Gyllensten, O. Gornik, J.F. Wilson, N.D. Hastie, H. Campbell, M.I. McCarthy, P.M. Rudd, K.R. Owen, G. Lauc, A.F. Wright, Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile., *Diabetes.* 62 (2013) 1329–1337. <https://doi.org/10.2337/db12-0880>.
- [55] M. Tijardović, T. Štambuk, A. Juszczak, T. Keser, D. Gasperikova, M. Novokmet, E. Tjora, E. Pape Medvidović, J. Stanik, P. Rasmus Njølstad, G. Lauc, K.R. Owen, O. Gornik, Fucosylated AGP glycopeptides as biomarkers of HNF1A-maturity onset diabetes of the young, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 185 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109226>.

- [56] K. Ohtsubo, M.Z. Chen, J.M. Olefsky, J.D. Marth, Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport, *Nat. Med.* 17 (2011) 1067–1076. <https://doi.org/10.1038/NM.2414>.
- [57] K. Ohtsubo, S. Takamatsu, C. Gao, H. Korekane, T.M. Kurosawa, N. Taniguchi, N-Glycosylation modulates the membrane sub-domain distribution and activity of glucose transporter 2 in pancreatic beta cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434 (2013) 346–351. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.03.076>.
- [58] N. Rudman, O. Gornik, G. Lauc, Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes, *FEBS Lett.* 593 (2019) 1598–1615. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13495>.
- [59] M. Demetriou, M. Granovsky, S. Quaggin, J.W. Dennis, Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation, *Nature.* 409 (2001) 733–739. <https://doi.org/10.1038/35055582>.
- [60] A. Grigorian, S.U. Lee, W. Tian, I.J. Chen, G. Gao, R. Mendelsohn, J.W. Dennis, M. Demetriou, Control of T cell-mediated autoimmunity by metabolite flux to N-glycan biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 20027–20035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701890200>.
- [61] D.J. Smyth, J.D. Cooper, J.M.M. Howson, P. Clarke, K. Downes, T. Mistry, H. Stevens, N.M. Walker, J.A. Todd, FUT2 nonsecretor status links type 1 diabetes susceptibility and resistance to infection, *Diabetes.* 60 (2011) 3081–3084. <https://doi.org/10.2337/DB11-0638>.
- [62] N. Rudman, S. Kaur, V. Simunović, D. Kifer, D. Šoić, T. Keser, T. Štambuk, L. Klarić, F. Pociot, G. Morahan, O. Gornik, Integrated glycomics and genetics analyses reveal a potential role for N-glycosylation of plasma proteins and IgGs, as well as the complement system, in the development of type 1 diabetes, *Diabetologia.* 66 (2023) 1071–1083. <https://doi.org/10.1007/s00125-023-05881-z>.
- [63] S. Inafuku, K. Noda, M. Amano, T. Ohashi, C. Yoshizawa, W. Saito, M. Murata, A. Kanda, S.I. Nishimura, S. Ishida, Alteration of N-glycan profiles in diabetic retinopathy, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (2015) 5316–5322. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-16747>.



- [64] O. Gornik, J. Wagner, M. Pucić, A. Knezević, I. Redzic, G. Lauc, Stability of N-glycan profiles in human plasma, *Glycobiology*. 19 (2009) 1547–1553. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp134>.
- [65] M. Novokmet, E. Lukić, F. Vučković, Ž. Đurić, T. Keser, K. Rajšl, D. Remondini, G. Castellani, H. Gašparović, O. Gornik, G. Lauc, Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation., *Sci. Rep.* 4 (2014) 4347. <https://doi.org/10.1038/srep04347>.
- [66] R. Hennig, S. Cajic, M. Borowiak, M. Hoffmann, R. Kottler, U. Reichl, E. Rapp, Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome, *Biochim. Biophys. Acta*. 1860 (2016) 1728–1738. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2016.03.035>.
- [67] V. Dotz, M. Wuhrer, N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases, *FEBS Lett.* 593 (2019) 2966–2976. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13598>.
- [68] O. Gornik, G. Lauc, Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases, *Dis. Markers*. 25 (2008) 267–278. <https://doi.org/10.1155/2008/493289>.
- [69] G. Lauc, I. Trbojević-Akmačić, ur., *The role of glycosylation in health and disease*, Springer International Publishing, Cham, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-70115-4>.
- [70] R.M. Anthony, J. V. Ravetch, A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs, *J. Clin. Immunol.* 30 Suppl 1 (2010). <https://doi.org/10.1007/S10875-010-9405-6>.
- [71] K. Masuda, T. Kubota, E. Kaneko, S. Iida, M. Wakitani, Y. Kobayashi-Natsume, A. Kubota, K. Shitara, K. Nakamura, Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 3122–3131. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2007.02.005>.
- [72] S. Iida, H. Misaka, M. Inoue, M. Shibata, R. Nakano, N. Yamane-Ohnuki, M. Wakitani, K. Yano, K. Shitara, M. Satoh, Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the

- inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 2879–2887. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2619>.
- [73] H.W. Schroeder, L. Cavacini, Structure and function of immunoglobulins, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S41. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2009.09.046>.
- [74] P. de Sousa-Pereira, J.M. Woof, IgA: Structure, function, and developability, *Antibodies.* 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/ANTIB8040057>.
- [75] A.J. Macpherson, B. Yilmaz, J.P. Limenitakis, S.C. Ganal-Vonarburg, IgA function in relation to the intestinal microbiota, *Annu. Rev. Immunol.* 36 (2018) 359–381. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042617-053238>.
- [76] E.M. Yoo, S.L. Morrison, IgA: An immune glycoprotein, *Clin. Immunol.* 116 (2005) 3–10. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2005.03.010>.
- [77] S. Kawamura, N. Saitou, S. Ueda, Concerted evolution of the primate immunoglobulin  $\alpha$ -gene through gene conversion, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 7359–7367. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42525-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42525-2).
- [78] J.M. Woof, M.W. Russell, Structure and function relationships in IgA, *Mucosal Immunol.* 4 (2011) 590–597. <https://doi.org/10.1038/MI.2011.39>.
- [79] X. Xie, L. Gao, P. Liu, J. Lv, W.H. Lu, H. Zhang, J. Jin, Propensity of IgA to self-aggregate via tailpiece cysteine-471 and treatment of IgA nephropathy using cysteamine, *JCI insight.* 6 (2021). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.150551>.
- [80] L. Ding, X. Chen, H. Cheng, T. Zhang, Z. Li, Advances in IgA glycosylation and its correlation with diseases, *Front. Chem.* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.974854>.
- [81] Johansen, Braathen, Brandtzaeg, Role of J chain in secretory immunoglobulin formation, *Scand. J. Immunol.* 52 (2000) 240–248. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3083.2000.00790.X>.
- [82] A. Breedveld, M. Van Egmond, IgA and Fc $\alpha$ RI: Pathological roles and therapeutic opportunities, *Front. Immunol.* 10 (2019) 553.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00553>.

- [83] P. Brandtzaeg, F.E. Johansen, Mucosal B cells: Phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties, *Immunol. Rev.* 206 (2005) 32–63. <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2005.00283.X>.
- [84] K. Takahashi, A.D. Smith, K. Poulsen, M. Kilian, B.A. Julian, J. Mestecky, J. Novak, M.B. Renfrow, Naturally occurring structural isomers in serum IgA1 O-glycosylation, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 692–702. <https://doi.org/10.1021/PR200608Q>.
- [85] B.W. Senior, J.M. Woof, Effect of mutations in the human immunoglobulin A1 (IgA1) hinge on its susceptibility to cleavage by diverse bacterial IgA1 proteases, *Infect. Immun.* 73 (2005) 1515–1522. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1515-1522.2005>.
- [86] B.A. Cobb, The history of IgG glycosylation and where we are now, *Glycobiology.* 30 (2020) 202–213. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWZ065>.
- [87] L.R. Ruhaak, K. Kim, C. Stroble, S.L. Taylor, Q. Hong, S. Miyamoto, C.B. Lebrilla, G. Leiserowitz, Protein-specific differential glycosylation of immunoglobulins in serum of ovarian cancer patients, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 1002–1010. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.5B01071>.
- [88] H.J. Lomax-Browne, C. Robertson, A. Antonopoulos, A.J.C. Leathem, S.M. Haslam, A. Dell, M. V. Dwek, Serum IgA1 shows increased levels of  $\alpha$  2,6-linked sialic acid in breast cancer, *Interface Focus.* 9 (2019). <https://doi.org/10.1098/RSFS.2018.0079>.
- [89] S. Zhang, X. Cao, C. Liu, W. Li, W. Zeng, B. Li, H. Chi, M. Liu, X. Qin, L. Tang, G. Yan, Z. Ge, Y. Liu, Q. Gao, H. Lu, N-glycopeptide signatures of IgA2 in serum from patients with hepatitis B virus-related liver diseases, *Mol. Cell. Proteomics.* 18 (2019) 2262–2272. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA119.001722>.
- [90] K. Singh, C. Chang, M.E. Gershwin, IgA deficiency and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.* 13 (2014) 163–177. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2013.10.005>.
- [91] H. Suzuki, J. Yasutake, Y. Makita, Y. Tanbo, K. Yamasaki, T. Sofue, T. Kano, Y. Suzuki, IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis, *Kidney Int.* 93 (2018) 700–

705. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2017.10.019>.
- [92] H. Suzuki, J. Novak, IgA glycosylation and immune complex formation in IgAN, *Semin. Immunopathol.* 43 (2021) 669–678. <https://doi.org/10.1007/S00281-021-00883-8>.
- [93] J. Novak, M. Tomana, M. Kilian, L. Coward, R. Kulhavy, S. Barnes, J. Mestecky, Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 1047–1056. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00019-0](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00019-0).
- [94] U. Steffen, C.A. Koeleman, M. V. Sokolova, H. Bang, A. Kleyer, J. Rech, H. Unterweger, M. Schicht, F. Garreis, J. Hahn, F.T. Andes, F. Hartmann, M. Hahn, A. Mahajan, F. Paulsen, M. Hoffmann, G. Lochnit, L.E. Muñoz, M. Wuhrer, D. Falck, M. Herrmann, G. Schett, IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13992-8>.
- [95] L. Royle, A. Roos, D.J. Harvey, M.R. Wormald, D. Van Gijlswijk-Janssen, E.R.M. Redwan, I.A. Wilson, M.R. Daha, R.A. Dwek, P.M. Rudd, Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 20140–20153. <https://doi.org/10.1074/JBC.M301436200>.
- [96] N. Deshpande, P.H. Jensen, N.H. Packer, D. Kolarich, GlycoSpectrumScan: Fishing glycopeptides from MS spectra of protease digests of human colostrum sIgA, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 1063–1075. <https://doi.org/10.1021/PR900956X>.
- [97] J. Huang, A. Guerrero, E. Parker, J.S. Strum, J.T. Smilowitz, J.B. German, C.B. Lebrilla, Site-specific glycosylation of secretory immunoglobulin A from human colostrum, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 1335–1349. <https://doi.org/10.1021/PR500826Q>.
- [98] K.E. Huus, C. Petersen, B.B. Finlay, Diversity and dynamism of IgA-microbiota interactions, *Nat. Rev. Immunol.* 21 (2021) 514–525. <https://doi.org/10.1038/S41577-021-00506-1>.
- [99] T.S. Mattu, R.J. Pleass, A.C. Willis, M. Kilian, M.R. Wormald, A.C. Lellouch, P.M. Rudd, J.M. Woof, R.A. Dwek, 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 (1998) 2260–2272. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.4.2260>.

- [100] S. Lehoux, T. Ju, Separation of two distinct O-glycoforms of human IgA1 by serial lectin chromatography followed by mass spectrometry O-glycan analysis, *Methods Enzymol.* 585 (2017) 61–75. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2016.10.003>.
- [101] A. Rifai, K. Fadden, S.L. Morrison, K.R. Chintalacharuvu, The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 2171–2181. <https://doi.org/10.1084/JEM.191.12.2171>.
- [102] K. Molyneux, D. Wimbury, I. Pawluczyk, M. Muto, J. Bhachu, P.R. Mertens, J. Feehally, J. Barratt,  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells, *Kidney Int.* 92 (2017) 1458–1468. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2017.05.002>.
- [103] A. Shibuya, N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroyama, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, Y. Endo, T. Fujita, T. Miyabayashi, S. Sakano, T. Tsuji, E. Nakayama, J.H. Phillips, L.L. Lanier, H. Nakauchi, Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 441–446. <https://doi.org/10.1038/80886>.
- [104] E. Aleyd, M.H. Heineke, M. van Egmond, The era of the immunoglobulin A Fc receptor Fc $\alpha$ RI; its function and potential as target in disease, *Immunol. Rev.* 268 (2015) 123–138. <https://doi.org/10.1111/IMR.12337>.
- [105] M. Van Egmond, C.A. Damen, A.B. Van Spriël, G. Vidarsson, E. Van Garderen, J.G.J. Van De Winkel, IgA and the IgA Fc receptor, *Trends Immunol.* 22 (2001) 205–211. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01873-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01873-7).
- [106] M.M.J. van Gool, M. van Egmond, IgA and Fc $\alpha$ RI: Versatile players in homeostasis, infection, and autoimmunity, *ImmunoTargets Ther.* 9 (2021) 351–372. <https://doi.org/10.2147/ITT.S266242>.
- [107] M. Lecocq, B. Detry, A. Guisset, C. Pilette, Fc $\alpha$ RI-mediated inhibition of IL-12 production and priming by IFN- $\gamma$  of human monocytes and dendritic cells, *J. Immunol.* 190 (2013) 2362–2371. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1201128>.
- [108] C. Saha, M. Das, V. Patil, E. Stephen-Victor, M. Sharma, S. Wymann, M. Jordi, C. Vonarburg, S. V. Kaveri, J. Bayry, Monomeric immunoglobulin A from plasma inhibits

- human Th17 responses in vitro independent of Fc $\alpha$ RI and DC-SIGN, *Front. Immunol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00275>.
- [109] B. Pasquier, P. Launay, Y. Kanamaru, I.C. Moura, S. Pfirsch, C. Ruffié, D. Hénin, M. Benhamou, M. Pretolani, U. Blank, R.C. Monteiro, Identification of Fc $\alpha$ RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR $\gamma$  ITAM, *Immunity.* 22 (2005) 31–42. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2004.11.017>.
- [110] Y. Kanamaru, S. Pfirsch, M. Aloulou, F. Vrtovnik, M. Essig, C. Loirat, G. Deschênes, C. Guérin-Marchand, U. Blank, R.C. Monteiro, Inhibitory ITAM signaling by Fc $\alpha$ RI-FcR $\gamma$  chain controls multiple activating responses and prevents renal inflammation, *J. Immunol.* 180 (2008) 2669–2678. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.4.2669>.
- [111] S.L. Keasey, K.E. Schmid, M.S. Lee, J. Meegan, P. Tomas, M. Minto, A.P. Tikhonov, B. Schweitzer, R.G. Ulrich, Extensive antibody cross-reactivity among infectious gram-negative bacteria revealed by proteome microarray analysis, *Mol. Cell. Proteomics.* 8 (2009) 924–935. <https://doi.org/10.1074/MCP.M800213-MCP200>.
- [112] J.J. Bunker, S.A. Erickson, T.M. Flynn, C. Henry, J.C. Koval, M. Meisel, B. Jabri, D.A. Antonopoulos, P.C. Wilson, A. Bendelac, Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota, *Science.* 358 (2017). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN6619>.
- [113] T. Rollenske, V. Szijarto, J. Lukasiewicz, L.M. Guachalla, K. Stojkovic, K. Hartl, L. Stulik, S. Kocher, F. Lasitschka, M. Al-Saeedi, J. Schröder-Braunstein, M. Von Frankenberg, G. Gaebelein, P. Hoffmann, S. Klein, K. Heeg, E. Nagy, G. Nagy, H. Wardemann, Cross-specificity of protective human antibodies against *Klebsiella pneumoniae* LPS O-antigen, *Nat. Immunol.* 19 (2018) 617–624. <https://doi.org/10.1038/S41590-018-0106-2>.
- [114] I.S. Hansen, D.L.P. Baeten, J. den Dunnen, The inflammatory function of human IgA, *Cell. Mol. Life Sci.* 76 (2019) 1041. <https://doi.org/10.1007/S00018-018-2976-8>.
- [115] G. Triolo, E. Giardina, G. Seddio, C. Terrizzi, Analysis of IgA1 and IgA2 subclass distribution in IgA- containing circulating immune complexes in patients with diabetes mellitus., *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 66 (1987) 116–119.

- [116] D. DL, E. KB, G. AP, H. HF, D. C, V. JP, Changes in size, subclass, and metabolic properties of serum immunoglobulin A in liver diseases and in other diseases with high serum immunoglobulin A, *J. Clin. Invest.* 71 (1983) 358–367. <https://doi.org/10.1172/JCI110777>.
- [117] T. Robert, L. Berthelot, A. Cambier, E. Rondeau, R.C. Monteiro, Molecular insights into the pathogenesis of iga nephropathy, *Trends Mol. Med.* 21 (2015) 762–775. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2015.10.003>.
- [118] M. Ardawi, H.A.N. Nasrat, A.A. Bahnassy, Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients, *Diabet. Med.* 11 (1994) 384–387. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1994.tb00290.x>.
- [119] J.V. Nimmerjahn, F., Ravetch, Fc-gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Review Immunology, Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 34–47.
- [120] C. Rosales, Fc $\gamma$  receptor heterogeneity in leukocyte functional responses, *Front. Immunol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00280>.
- [121] M.M. Gomes, S.B. Wall, K. Takahashi, J. Novak, M.B. Renfrow, A.B. Herr, Analysis of IgA1 N-glycosylation and its contribution to Fc $\alpha$ RI binding, *Biochemistry.* 47 (2008) 11285–11299. <https://doi.org/10.1021/BI801185B>.
- [122] K. Göritzer, A. Turupcu, D. Maresch, J. Novak, F. Altmann, C. Oostenbrink, C. Obinger, R. Strasser, Distinct Fc $\alpha$  receptor N-glycans modulate the binding affinity to immunoglobulin A (IgA) antibodies, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 13995–14008. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.009954>.
- [123] M.T. Posgai, S. Tonddast-Navaei, M. Jayasinghe, G.M. Ibrahim, G. Stan, A.B. Herr, Fc $\alpha$ RI binding at the IgA1 CH2–CH3 interface induces long-range conformational changes that are transmitted to the hinge region, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E8882–E8891. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1807478115/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- [124] N.R. Medjeral-Thomas, H.T. Cook, M.C. Pickering, Complement activation in IgA nephropathy, *Semin. Immunopathol.* 43 (2021) 679–690. <https://doi.org/10.1007/S00281-021-00882-9>.

- [125] Y.L. Chiu, W.C. Lin, K.H. Shu, Y.W. Fang, F.C. Chang, Y.H. Chou, C.F. Wu, W.C. Chiang, S.L. Lin, Y.M. Chen, M.S. Wu, Alternative complement pathway is activated and associated with galactose-deficient IgA1 antibody in IgA nephropathy patients, *Front. Immunol.* 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.638309>.
- [126] I. Terai, K. Kobayashi, J.-P. Vaerman, N. Mafune, Degalactosylated and/or denatured IgA, but not native IgA in any form, bind to mannose-binding lectin, *J. Immunol.* 177 (2006) 1737–1745. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.3.1737>.
- [127] E.B. Nikolova, M. Tomana, M.W. Russell, The role of the carbohydrate chains in complement (C3) fixation by solid-phase-bound human IgA., *Immunology.* 82 (1994) 321–7.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927504><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1414811>.
- [128] M. Klasić, V. Zoldoš, Epigenetics of immunoglobulin G glycosylation, *Exp. Suppl.* 112 (2021) 289–301. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3_9).
- [129] A.L. Hansen, C. Reily, J. Novak, M.B. Renfrow, Immunoglobulin A glycosylation and its role in disease, *Exp. Suppl.* 112 (2021) 433–477. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3_14).
- [130] D. Greco, F. Maggio, Selective immunoglobulin a deficiency in type 1 diabetes mellitus: A prevalence study in Western Sicily (Italy), *Diabetes Metab. J.* 39 (2015) 132–136. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.2.132>.
- [131] O. Boyarchuk, L. Dobrovolska, H. Svystunovych, Selective immunoglobulin A deficiency in children with diabetes mellitus: Data from a medical center in Ukraine, *PLoS One.* 17 (2022) e0277273. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0277273>.
- [132] F.H. Abouali, D.S. Sheha, H.M. Elsayed, N.A. Ibrahim, S.T. Kamal, Y.S. Sharawy, IgA deficiency in type 1 diabetes mellitus patients, *QJM An Int. J. Med.* 113 (2020). <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcaa052.055>.
- [133] B.A.M. Ali, M.A. Sayed, H.M. Moness, M.M. Mahmoud, Assessment of serum levels of immunoglobulin a and immunoglobulin g in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus (T1D), *Curr. Pediatr. Res.* 21 (2017) 627–631.



- [134] F.K. Gorus, C.L. Vandewalle, F. Winnock, F. Lebleu, B. Keymeulen, B. Van Der Auwera, A. Falorni, H. Dorchy, F. Féry, D.G. Pipeleers, Increased prevalence of abnormal immunoglobulin M, G, and A concentrations at clinical onset of insulin-dependent diabetes mellitus: A registry-based study, *u: Pancreas*, Lippincott Williams and Wilkins, 1998: str. 50–59. <https://doi.org/10.1097/00006676-199801000-00009>.
- [135] A. Ahmadiafshar, M.R. Mohsenifard, S. Mazloomzadeh, Evaluation of serum & salivary IgA in patients with type 1 diabetes, *PLoS One*. 10 (2015) e0122757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122757>.
- [136] T. Decraene, C. Vandewalle, D. Pipeleers, F.K. Gorus, Increased concentrations of total IgM at clinical onset of type 1 (insulin-dependent) diabetes: Correlation with IgM binding to cells, *Clin. Chem.* 38 (1992) 1762–1767. <https://doi.org/10.1093/clinchem/38.9.1762>.
- [137] J. Svensson, C.S. Cerqueira, P. Kjærsgaard, L. Lyngsøe, T. Hertel, M. Madsen, H. Mortensen, J. Johannesen, Danish registry of childhood and adolescent diabetes, *Clin. Epidemiol.* Volume 8 (2016) 679–683. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S99469>.
- [138] M. Nemčić, M. Tijardović, N. Rudman, T. Bulum, M. Tomić, B. Plavša, S. Vučković Rebrina, M. Vučić Lovrenčić, L. Duvnjak, G. Morahan, O. Gornik, N-glycosylation of serum proteins in adult type 1 diabetes mellitus exposes further changes compared to children at the disease onset, *Clin. Chim. Acta.* 543 (2023) 117298. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2023.117298>.
- [139] T. Štambuk, D. Kifer, L. Smirčić-Duvnjak, M.V. Lovrenčić, O. Gornik, Associations between plasma protein, IgG and IgA N-glycosylation and metabolic health markers in pregnancy and gestational diabetes, *PLoS One*. 18 (2023) e0284838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284838>.
- [140] R.D.C.T. 3.6.3, A language and environment for statistical computing, R found. Stat. Comput. (2020) <https://www.R-project.org>. <http://www.r-project.org>.
- [141] Wickham, H, *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*, Springer-Verlag, (2009).
- [142] J.T. Leek, W.E. Johnson, H.S. Parker, A.E. Jaffe, J.D. Storey, The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments,

- Bioinformatics. 28 (2012) 882–883. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts034>.
- [143] D. Bates, M. Mächler, E. Zurich, B.M. Bolker, S.C. Walker, Fitting linear mixed-effects models using lme4, *J. Stat. Softw.* 69 (2021) 1–33.
- [144] J. Li, L. Ji, Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix, *Heredity (Edinb)*. 95 (2005) 221–227. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800717>.
- [145] K. Higai, Y. Aoki, Y. Azuma, K. Matsumoto, Glycosylation of site-specific glycans of alpha1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1725 (2005) 128–135. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2005.03.012>.
- [146] F. Clerc, K.R. Reiding, B.C. Jansen, G.S.M. Kammeijer, A. Bondt, M. Wuhrer, Human plasma protein N-glycosylation, *Glycoconj. J.* 33 (2016) 309–343. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9626-2>.
- [147] E. Akbay, I. Yetkin, R. Ersoy, S. Kulaksizoglu, F. Törüner, M. Arslan, The relationship between levels of alpha1-acid glycoprotein and metabolic parameters of diabetes mellitus., *Diabetes. Nutr. Metab.* 17 (2004) 331–335.
- [148] E. Gourgari, J. Ma, M.P. Playford, N.N. Mehta, R. Goldman, A.T. Remaley, S.M. Gordon, Proteomic alterations of HDL in youth with type 1 diabetes and their associations with glycemic control: a case–control study, *Cardiovasc. Diabetol.* 18 (2019) 43. <https://doi.org/10.1186/S12933-019-0846-9>.
- [149] T. Costacou, A.P. Levy, Haptoglobin genotype and its role in diabetic cardiovascular disease, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 5 (2012) 423. <https://doi.org/10.1007/S12265-012-9361-Z>.
- [150] K. Hanasaki, L.D. Powell, A. Varki, Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7543–7550. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7543>.
- [151] G. Dharmadhikari, K. Stolz, M. Hauke, N.G. Morgan, A. Varki, E. De Koning, S. Kelm, K. Maedler, Siglec-7 restores  $\beta$ -cell function and survival and reduces inflammation in

- pancreatic islets from patients with diabetes, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep45319>.
- [152] D.A. Bergin, K. Hurley, N.G. McElvaney, E.P. Reeves, Alpha-1 antitrypsin: a potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 60 (2012) 81–97. <https://doi.org/10.1007/S00005-012-0162-5>.
- [153] M. Sandler, B.M. Gemperli, C. Hanekom, S.H. Kühn, Serum alpha 1-protease inhibitor in diabetes mellitus: reduced concentration and impaired activity, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 5 (1988) 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(88\)80059-7](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(88)80059-7).
- [154] Y. Lu, M. Tang, C. Wasserfall, Z. Kou, M. Campbell-Thompson, T. Gardemann, J. Crawford, M. Atkinson, S. Song, Alpha1-antitrypsin gene therapy modulates cellular immunity and efficiently prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice, *Hum. Gene Ther.* 17 (2006) 625–634. <https://doi.org/10.1089/HUM.2006.17.625>.
- [155] G.C. Weir, M.R. Ehlers, K.M. Harris, S. Kanaparthi, A. Long, D. Phippard, L.J. Weiner, B. Jepson, J.G. McNamara, M. Koulmanda, T.B. Strom, Alpha-1 antitrypsin treatment of new-onset type 1 diabetes: An open-label, phase I clinical trial (RETAIN) to assess safety and pharmacokinetics, *Pediatr. Diabetes.* 19 (2018) 945–954. <https://doi.org/10.1111/PEDI.12660>.
- [156] S.S. Park, R.R. Ortega, C.W. Agudelo, J.P. Perez, B.P. Gandara, I. Garcia-Arcos, C. McCarthy, P. Geraghty, Therapeutic potential of alpha-1 antitrypsin in type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Medicina (B. Aires)*. 57 (2021). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA57040397>.
- [157] B. Adameczyk, W.B. Struwe, A. Ercan, P.A. Nigrovic, P.M. Rudd, Characterization of fibrinogen glycosylation and its importance for serum/plasma N-glycome analysis, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 444–454. <https://doi.org/10.1021/pr300813h>.
- [158] S. Klamt, M. Vogel, T.M. Kapellen, A. Hiemisch, F. Prenzel, S. Zachariae, U. Ceglarek, J. Thiery, W. Kiess, Association between IgE-mediated allergies and diabetes mellitus type 1 in children and adolescents, *Pediatr. Diabetes.* 16 (2015) 493–503. <https://doi.org/10.1111/PEDI.12298>.
- [159] D. Šoić, T. Keser, J. Štambuk, D. Kifer, F. Pociot, G. Lauc, G. Morahan, M. Novokmet,

- O. Gornik, High-throughput human complement C3 N-glycoprofilng identifies markers of early onset type 1 diabetes mellitus in children, *Mol. Cell. Proteomics*. 21 (2022) 100407. <https://doi.org/10.1016/J.MCPRO.2022.100407>.
- [160] A. Varki, P. Gagneux, Multifarious roles of sialic acids in immunity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253 (2012) 16. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2012.06517.X>.
- [161] T.R. McCurdy, V. Bhakta, L.J. Eltringham-Smith, S. Gataiance, A.E. Fox-Robichaud, W.P. Sheffield, In vivo clearance of alpha-1 acid glycoprotein is influenced by the extent of its N-linked glycosylation and by its interaction with the vessel wall, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) 11. <https://doi.org/10.1155/2012/292730>.
- [162] V. Dotz, R.F.H. Lemmers, K.R. Reiding, A.L. Hipgrave Ederveen, A.G. Lieveise, M.T. Mulder, E.J.G. Sijbrands, M. Wuhrer, M. van Hoek, Plasma protein N-glycan signatures of type 2 diabetes, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018) 2613–2622. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.08.005>.
- [163] R. Ram, M. Mehta, Q.T. Nguyen, I. Larma, B.O. Boehm, F. Pociot, P. Concannon, G. Morahan, Systematic evaluation of genes and genetic variants associated with type 1 diabetes susceptibility, *J. Immunol.* 196 (2016) 3043–3053. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1502056>.
- [164] H.A. Kaplan, B.M. Woloski, M. Hellman, J.C. Jamieson, Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 11505–11509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44256-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44256-6).
- [165] M. Catera, V. Borelli, N. Malagolini, M. Chiricolo, G. Venturi, C. Reis, H. Osorio, P.M. Abruzzo, M. Capri, D. Monti, R. Ostan, C. Franceschi, F. Dall’Olio, Identification of novel plasma glycosylation-associated markers of aging, *Oncotarget*. 7 (2016) 7455. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7059>.
- [166] I. Gudelj, M. Baciarello, I. Ugrina, M. De Gregori, V. Napolioni, P.M. Ingelmo, D. Bugada, S. De Gregori, L. Đerek, M. Pučić-Baković, M. Novokmet, O. Gornik, G. Saccani Jotti, T. Meschi, G. Lauc, M. Allegri, Changes in total plasma and serum N-glycome composition and patient-controlled analgesia after major abdominal surgery., *Sci. Rep.* 6 (2016) 31234. <https://doi.org/10.1038/srep31234>.

- [167] F. Clerc, M. Novokmet, V. Dotz, K.R. Reiding, N. de Haan, G.S.M. Kammeijer, H. Dalebout, M.R. Bladergroen, F. Vukovic, E. Rapp, S.R. Targan, G. Barron, N. Manetti, A. Latiano, D.P.B. McGovern, V. Annese, G. Lauc, M. Wuhrer, Plasma N-glycan signatures are associated with features of inflammatory bowel diseases., *Gastroenterology*. 155 (2018) 829–843. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.05.030>.
- [168] S.-E. Jang, W.-J. Park, H.-H. Kim, S.-R. Yoo, J.-R. Lee, M.-K. Oh, Association of apolipoprotein B with HbA1c in nondiabetic adults, *Korean J. Fam. Pract.* 7 (2017) 844–850. <https://doi.org/10.21215/kjfp.2017.7.6.844>.
- [169] J.J. Albers, S.M. Marcovina, G. Imperatore, B.M. Snively, J. Stafford, W.Y. Fujimoto, E.J. Mayer-Davis, D.B. Petitti, C. Pihoker, L. Dolan, D.M. Dabelea, Prevalence and determinants of elevated apolipoprotein B and dense low-density lipoprotein in youths with type 1 and type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 735–742. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2176>.
- [170] S.I. Sherwani, H.A. Khan, A. Ekhzaimy, A. Masood, M.K. Sakharkar, Significance of HbA1c test in diagnosis and prognosis of diabetic patients, *Biomark. Insights*. 11 (2016) 95–104. <https://doi.org/10.4137/Bmi.s38440>.
- [171] D. Kifer, P. Louca, A. Cvetko, H. Deriš, A. Cindrić, H. Grallert, A. Peters, O. Polašek, O. Gornik, M. Mangino, T.D. Spector, A.M. Valdes, S. Padmanabhan, C. Gieger, G. Lauc, C. Menni, N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension, *J. Hypertens.* 39 (2021) 2527–2533. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002963>.
- [172] X. Meng, M. Song, M. Vilaj, J. Štambuk, M. Dolikun, J. Zhang, D. Liu, H. Wang, X. Zhang, J. Zhang, W. Cao, A. Momčilović, I. Trbojević-Akmačić, X. Li, D. Zheng, L. Wu, X. Guo, Y. Wang, G. Lauc, W. Wang, Glycosylation of IgG associates with hypertension and type 2 diabetes mellitus comorbidity in the chinese muslim ethnic minorities and the han chinese, *J. Pers. Med.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/jpm11070614>.
- [173] Y. Wang, L. Klarić, X. Yu, K. Thaqi, J. Dong, M. Novokmet, J. Wilson, O. Polasek, Y. Liu, J. Krištić, S. Ge, M. Pučić-Baković, L. Wu, Y. Zhou, I. Ugrina, M. Song, J. Zhang, X. Guo, Q. Zeng, I. Rudan, H. Campbell, Y. Aulchenko, G. Lauc, W. Wang, The association between glycosylation of immunoglobulin G and hypertension: A multiple

- ethnic cross-sectional study, *Medicine (Baltimore)*. 95 (2016). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000003379>.
- [174] M. Clark, C.J. Kroger, R.M. Tisch, Type 1 diabetes: A chronic anti-self-inflammatory response, *Front. Immunol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01898>.
- [175] A. Knežević, O. Gornik, O. Polašek, M. Pučić, I. Redžić, M. Novokmet, P.M. Rudd, A.F. Wright, H. Campbell, I. Rudan, G. Lauc, Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans, *Glycobiology*. 20 (2010) 959–969. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq051>.
- [176] J.A. Vasseur, J.A. Goetz, W.R. Alley, M. V. Novotny, Smoking and lung cancer-induced changes in N-glycosylation of blood serum proteins, *Glycobiology*. 22 (2012) 1684–1708. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws108>.
- [177] J. Lee, V. Taneja, R. Vassallo, Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms, *J. Dent. Res.* 91 (2012) 142–149. <https://doi.org/10.1177/0022034511421200>.
- [178] H. Van Der Vaart, D.S. Postma, W. Timens, N.H.T. Ten Hacken, Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: A review, *Thorax*. 59 (2004) 713–721. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.012468>.
- [179] T. Pavić, D. Dilber, D. Kifer, N. Selak, T. Keser, C.D.S. Ljubičić, A. Vukić Dugac, G. Lauc, L. Rumora, O. Gornik, N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease, *J. Transl. Med.* 16 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1695-0>.
- [180] Y. Pilatte, J. Bignon, C.R. Lambré, Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity, *Glycobiology*. 3 (1993) 201–218. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/3.3.201>.
- [181] R. Schauer, A.K. Shukla, C. Schröder, E. Müller, The anti-recognition function of sialic acids: Studies with erythrocytes and macrophages, *Pure Appl. Chem.* 56 (1984) 907–921. <https://doi.org/10.1351/PAC198456070907/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.

- [182] Y. Sun, X. Li, T. Wang, W. Li, Core fucosylation regulates the function of pre-BCR, BCR and IgG in humoral immunity, *Front. Immunol.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.844427>.
- [183] J. Golay, A.E. Andrea, I. Cattaneo, Role of Fc core fucosylation in the effector function of IgG1 antibodies, *Front. Immunol.* 13 (2022) 929895. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.929895/BIBTEX>.
- [184] M. Daëron, Fc receptors and Fc receptor-like molecules within the immunoreceptor family, *Encyclopedia of Immunobiology.* 2 (2016) 360–370. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.929895/BIBTEX>.
- [185] C. Basset, V. Durand, N. Mimassi, Y.L. Pennec, P. Youinou, M. Dueymes, Enhanced sialyltransferase activity in B lymphocytes from patients with primary Sjögren’s syndrome, *Scand. J. Immunol.* 51 (2000) 307–311. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3083.2000.00692.X>.
- [186] J.C.K. Leung, P.Y.K. Poon, K.N. Lai, Increased sialylation of polymeric immunoglobulin A1: mechanism of selective glomerular deposition in immunoglobulin A nephropathy?, *J. Lab. Clin. Med.* 133 (1999) 152–160. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(99\)90008-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(99)90008-2).
- [187] J.K. Snell-Bergeon, N.A. West, E.J. Mayer-Davis, A.D. Liese, S.M. Marcovina, R.B. D’Agostino, R.F. Hamman, D. Dabelea, Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: The SEARCH case-control study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2010) 2868. <https://doi.org/10.1210/JC.2009-1993>.
- [188] A. Roos, L.H. Bouwman, D.J. van Gijlswijk-Janssen, M.C. Faber-Krol, G.L. Stahl, M.R. Daha, Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway, *J. Immunol.* 167 (2001) 2861–2868. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.5.2861>.

## **8. PRILOZI**



**Prilog 1.** Deskriptivna statistika *N*-glikanskih svojstava ukupnih serumskih proteina ispitivane populacije.

<b><i>N</i>-glikansko svojstvo</b>	<b>Q1 (zdravi)</b>	<b>Q1 (ŠBT1)</b>	<b>Medijan (zdravi)</b>	<b>Median (ŠBT1)</b>	<b>Q3 (zdravi)</b>	<b>Q3 (ŠBT1)</b>
<b>GP1</b>	2,56	2,35	3,62	3,24	4,92	4,46
<b>GP2</b>	1,66	1,75	1,96	2,06	2,34	2,39
<b>GP3</b>	0,06	0,06	0,08	0,08	0,10	0,11
<b>GP4</b>	2,67	2,22	3,59	3,19	4,35	4,03
<b>GP5</b>	1,29	0,99	1,92	1,42	2,42	2,08
<b>GP6</b>	1,02	0,96	1,24	1,26	1,49	1,45
<b>GP7</b>	0,82	0,63	1,04	0,88	1,18	1,10
<b>GP8</b>	1,44	1,54	1,62	1,75	1,82	2,02
<b>GP9</b>	0,10	0,10	0,12	0,12	0,14	0,15
<b>GP10</b>	3,06	2,68	3,77	3,55	4,71	4,73
<b>GP11</b>	0,71	0,69	0,88	0,86	1,08	1,07
<b>GP12</b>	1,24	1,39	1,33	1,53	1,44	1,66
<b>GP13</b>	0,42	0,35	0,53	0,44	0,67	0,60
<b>GP14</b>	12,46	12,98	13,46	13,89	14,52	15,09
<b>GP15</b>	0,39	0,39	0,43	0,43	0,48	0,48
<b>GP16</b>	4,68	4,71	5,34	5,47	6,00	6,32
<b>GP17</b>	1,55	1,55	1,85	1,94	2,31	2,34
<b>GP18</b>	3,18	3,43	3,56	3,90	4,05	4,46
<b>GP19</b>	0,98	0,99	1,10	1,11	1,21	1,21
<b>GP20</b>	23,29	22,96	25,62	25,71	28,85	28,27
<b>GP21</b>	0,64	0,66	0,70	0,74	0,78	0,81
<b>GP22</b>	3,32	3,64	3,80	4,12	4,28	4,68
<b>GP23</b>	1,49	1,52	1,74	1,82	2,09	2,28
<b>GP24</b>	1,86	1,75	2,24	2,08	2,49	2,40
<b>GP25</b>	0,18	0,20	0,20	0,23	0,24	0,28
<b>GP26</b>	1,79	1,64	2,03	1,83	2,22	2,09
<b>GP27</b>	0,84	1,07	1,09	1,27	1,35	1,49
<b>GP28</b>	0,59	0,59	0,70	0,67	0,81	0,80
<b>GP29</b>	0,14	0,16	0,17	0,19	0,20	0,23
<b>GP30</b>	4,10	3,70	4,80	4,23	5,52	5,07
<b>GP31</b>	0,37	0,38	0,45	0,46	0,53	0,56

**Prilog 1 – nastavak.**

<b>N-glikansko svojstvo</b>	<b>Q1 (zdravi)</b>	<b>Q1 (ŠBT1)</b>	<b>Medijan (zdravi)</b>	<b>Median (ŠBT1)</b>	<b>Q3 (zdravi)</b>	<b>Q3 (ŠBT1)</b>
<b>GP32</b>	1,15	1,00	1,40	1,19	1,63	1,45
<b>GP33</b>	1,98	2,29	2,51	2,93	3,25	3,57
<b>GP34</b>	0,32	0,31	0,35	0,35	0,40	0,40
<b>GP35</b>	0,26	0,33	0,34	0,41	0,43	0,50
<b>GP36</b>	0,49	0,50	0,55	0,55	0,64	0,63
<b>GP37</b>	0,34	0,35	0,41	0,41	0,50	0,48
<b>GP38</b>	0,76	0,76	0,88	0,89	1,03	1,03
<b>GP39</b>	0,59	0,66	0,75	0,81	0,95	0,99
<b>LB</b>	76,22	76,63	78,05	78,24	79,75	79,87
<b>HB</b>	17,44	17,13	19,15	19,17	20,95	20,76
<b>G0</b>	4,37	4,15	5,75	5,42	7,23	6,82
<b>G1</b>	5,54	4,73	7,49	6,51	8,98	8,19
<b>G2</b>	61,54	63,33	64,35	65,91	67,44	68,62
<b>G3</b>	15,10	14,53	16,35	16,25	18,00	17,94
<b>G4</b>	2,23	2,30	2,62	2,66	3,05	3,12
<b>S0</b>	15,48	14,03	19,59	18,11	22,94	22,19
<b>S1</b>	21,32	21,89	22,48	23,43	23,85	24,61
<b>S2</b>	38,05	38,55	40,99	41,83	44,75	45,75
<b>S3</b>	10,32	9,97	11,41	11,52	12,80	12,70
<b>S4</b>	1,73	1,80	2,06	2,12	2,42	2,48
<b>B</b>	7,44	7,60	8,53	8,70	9,70	9,98
<b>AF</b>	3,68	4,44	4,66	5,38	5,91	6,54
<b>CF</b>	27,69	27,06	32,44	31,35	36,32	36,45
<b>HM</b>	2,59	2,51	2,79	2,73	3,01	2,94

## **9. ŽIVOTOPIS**

Matej Nemčić rođen je 11. siječnja 1996. godine u Zagrebu gdje je pohađao osnovnu i srednju školu. Godine 2014. upisao je preddiplomski, a 2017. diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U sklopu programa suradnje Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i Sveučilišta u Orleansu završio je dislocirani diplomski studij bioindustrijskih tehnika čime je 2019. godine na Sveučilištu u Zagrebu stekao zvanje magistra molekularne biologije, a na Sveučilištu u Orleansu magistra biokemije i biotehnologije. Dobitnik je Erasmus+ stipendije za stručnu praksu u Francuskoj gdje je izradio svoj diplomski rad u Centru za molekularnu biofiziku, CNRS, Orleans, pod mentorstvom dr. sc. Martine Cadene.

U prosincu 2019. godine zaposlen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao asistent na projektu „Centar kompetencija u molekularnoj dijagnostici“ (CEKOM). Za vrijeme trajanja doktorskog studija sudjelovao je u izvođenju laboratorijskih vježbi iz kolegija Analitička biokemija, Biološka kemija i Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom na diplomskim studijima farmacije i medicinske biokemije. Dobitnik je stipendije Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju mladim znanstvenicima za sudjelovanje na kongresu HDBMB22: *From Science to Knowledge* te stipendije FEBS-a (*Federation of European Biochemical Societies*) za mlade znanstvenike za sudjelovanje na kongresu YSF2023 (*Young Scientists' Forum*) i kongresu FEBS2023. Aktivno govori engleski i njemački jezik.

Koautor je tri znanstvena rada objavljena u časopisima s međunarodnom recenzijom. Sudjelovao je na pet znanstvenih skupova s posterskim priopćenjima te je od 2021. godine član Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.