

Španić, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:066415>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

GLIKANI
GLYCANS
ZAVRŠNI RAD

FILIP ŠPANIĆ
PREDDIPLOMSKI STUDIJ MOLEKULARNE BIOLOGIJE
UNDERGRADUATE STUDY OF MOLECULAR BIOLOGY
MENTOR: DOC. DR. SC. JASMINA ROKOV PLAVEC

ZAGREB, 2021.

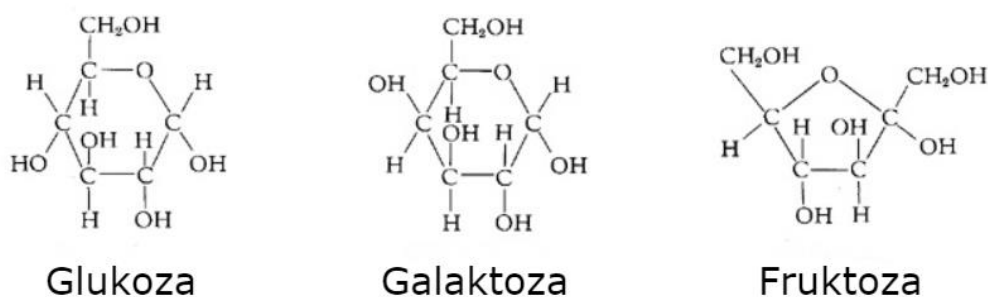
SADRŽAJ:

1. UVOD U GLIKANE.....	3
1.1. Ugljikohidrati kao makromolekule.....	3
1.2. Što su glikani?.....	3
2. VRSTE GLIKOZILACIJA.....	4
2.1. N-glikozilacija.....	4
2.2. O-glikozilacija.....	6
2.3. C-glikozilacija.....	6
2.4. Fosfoglikozilacija.....	7
2.5. Glipijacija.....	8
3. PROTEOGLIKANI.....	8
4. GLIKOPROTEINI.....	9
5. GLIKOLIPIDI.....	10
6. METODE ISTRAŽIVANJA GLIKANA.....	11
7. GLIKANI U FIZIOLOGIJI I MEDICINI.....	14
7.1. Važnost glikana u identifikaciji i liječenju stanica karcinoma.....	14
7.2. Poremećaji u obrascu glikozilacije dovode do pojave različitih bolesti.....	14
8. NAJNOVIJA OTKRIĆA I BUDUĆNOST U PODRUČJU GLIKANA.....	15
8.1. RNA kao novi tip glikoziliranih molekula.....	15
8.2. Budućnost istraživanja glikana.....	16
9. ZAKLJUČAK.....	16
10. LITERATURA.....	16
11. SAŽETAK.....	18

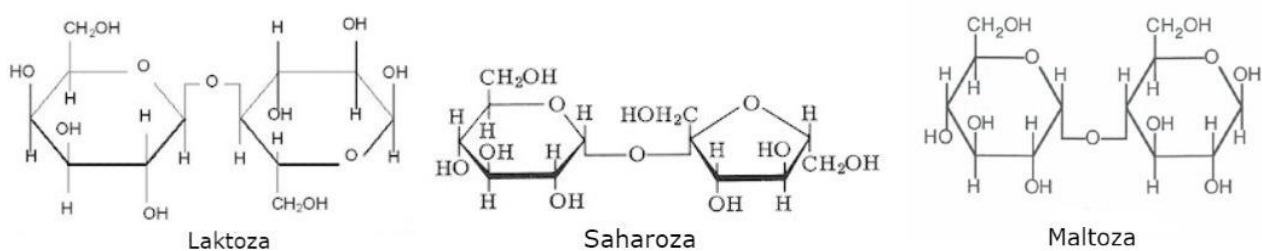
1. UVOD U GLIKANE

1.1. Ugljikohidrati kao makromolekule

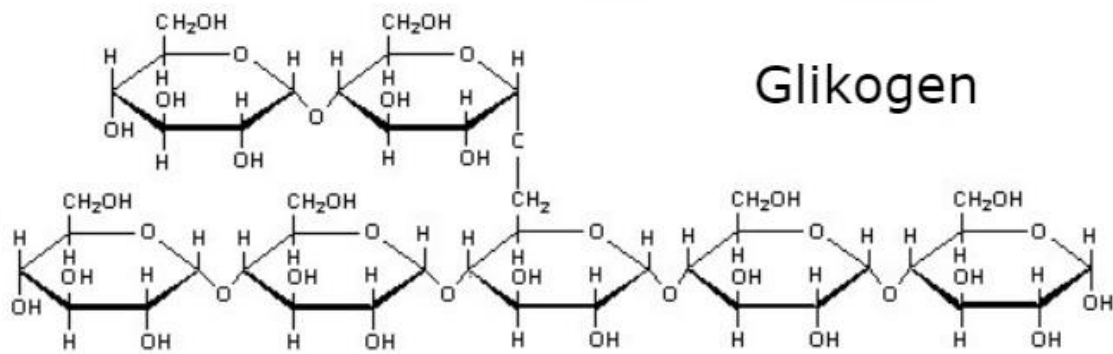
Ugljikohidrati su najbrojnija vrsta makromolekula na Zemlji¹. Zajedno s proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama čine osnovu za građu svih živih organizama. Po kemijskoj strukturi najjednostavniji ugljikohidrati su ketoni ili aldehidi s više hidroksilnih skupina koje zovemo monosaharidi. Pri tome je najmanji monosaharid gliceraldehid koji sadrži tri ugljikova atoma, a broj različitih vrsta monosaharida raste s brojem ugljikovih atoma. Svakako najpoznatiji monosaharidi su oni sa šest ugljikovih atoma, prikazani na Slici 1 - glukoza, fruktoza i galaktoza. Povezivanjem dva monosaharida glikozidnom vezom nastaju disaharidi. Najčešći disaharidi su saharoza, laktoza i maltoza, prikazani na Slici 2. Polisaharidi su najsloženiji ugljikohidrati, nastaju povezivanjem više monosaharida, pri čemu se mogu razlikovati prema broju monosaharida u lancu, ali i njihovoj vrsti. Glikogen (Slika 3), škrob i celuloza su najčešći polisaharidi.



Slika 1: Strukturne formule monosaharida(preuzeto i prilagođeno prema²)



Slika 2: Strukturne formule disaharida (preuzeto i prilagođeno prema²)



Glikogen

Slika 3: Strukturna formula glikogena(preuzeto i prilagođeno prema²)

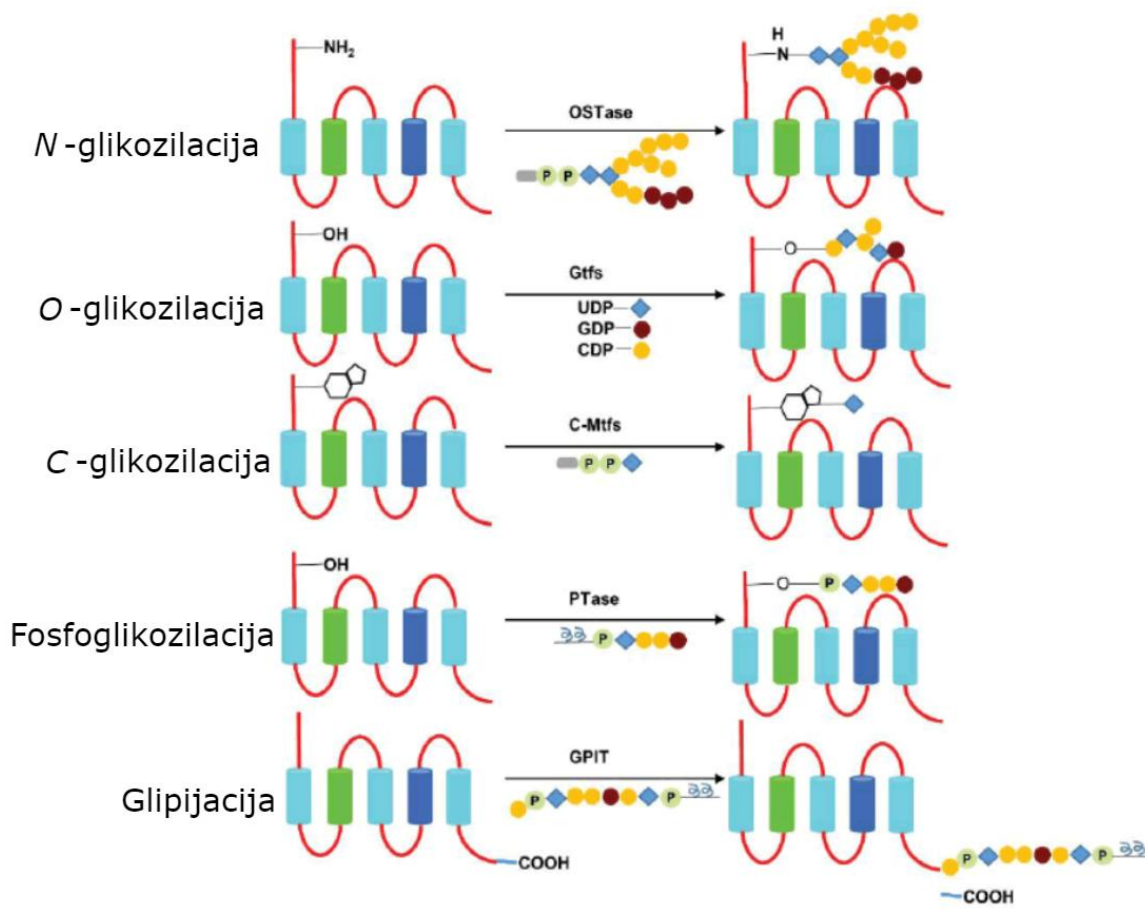
Brojnost ugljikohidrata proporcionalna je njihovoj ulozi u organizmu, pa tako oni sudjeluju u različitim procesima. Oksidacijom ugljikohidrata tijelo dobiva energiju koja omogućava odvijanje mnogih bioloških i kemijskih procesa. Monosaharidi deoksiriboza i riboza čine šećerno-fosfatnu okosnicu u DNA i RNA. Nadalje, već spomenuta celuloza ima strukturnu ulogu u izgradnji staničnih stijenki biljaka, dok glikogen i škrob služe za pohranu energije u animalnim, odnosno biljnim stanicama. Ipak, najzanimljivija i najmanje istražena je uloga ugljikohidrata kao glikana.

1.2. Što su glikani?

Glikan je naziv za skup monosaharida međusobno povezanih glikozidnim vezama čija duljina varira ovisno o vrsti glikozidne veze i organizmu. Mogu biti samostalni ili vezani na protein ili lipid, pri čemu glikan zauzima veći ili manji dio konačne strukture. Sudjeluju u brojnim međustaničnim interakcijama - posreduju u komunikaciji stanica s izvanstaničnim prostorom, označavaju proteine za transport i lokalizaciju u stanici, sudjeluju u procesu apoptoze i drugim procesima. Nalaze se vezani na staničnoj membrani s kojom tvore glikokaliks¹.

Obzirom na makromolekulu na koju je vezan glikan razlikujemo proteoglikane, glikoproteine i glikolipide. Proteoglikani su molekule koje se nalaze na staničnoj površini ili u izvanstaničnom prostoru. Ugljikohidratni dio je glikozaminoglikan, a na njega je vezan membranski ili sekrecijski protein. U glikoproteinima je ugljikohidratni dio također vezan na protein, ali ovdje glikanski dio zauzima puno manji dio nego kod proteoglikana. Kod glikoproteina, proteinski dio je važniji za biološku funkciju, dok je glikanski dio zadužen za usmjeravanje proteina i ostvarivanje interakcija s drugim proteinima. Važno je napomenuti da su glikoproteini puno brojniji i raznolikiji od proteoglikana. Glikolipidi se sastoje od lipida na koji je vezan glikanski oligosaharid. Dije se na sfingolipide u kojima je glikanski dio vezan na sfingozin i galaktolipide gdje su glikani vezani na glicerol.

Proces kojim nastaju glikani naziva se glikozilacija. Smatra se da je glikozilacija najkompleksnija posttranslacijska modifikacija zbog brojnosti enzima koji sudjeluju u procesu⁴. Glikozilacija započinje posttranslacijski u endoplazmatskom retikulumu (ER), a završava u Golgijevom kompleksu. Prema vrsti glikozidne veze koja može nastati postoji pet vrsta glikozilacija koje su prikazane na Slici 4: N-, O-glikozilacija, C-glikozilacija, fosfoglikozilacija i glipijacija.

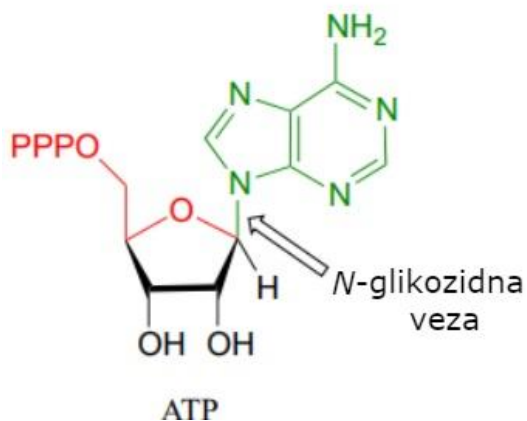


Slika 4: Vrste glikozilacija (preuzeto i prilagođeno prema⁴)

2. VRSTE GLIKOZILACIJA

2.1. N-glikozilacija

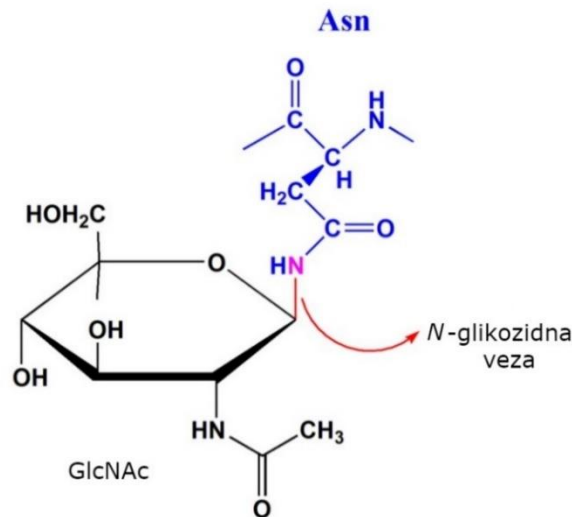
N-glikozidna veza je veza između monosaharida i bilo koje skupine koja sadrži N-atom. Primjerice, N-glikozidna veza je jako česta u nukleinskim kiselinama, gdje je šećer (riboza ili deoksiriboza) povezan na dušičnu bazu upravo ovim tipom veze što je prikazano na Slici 5.



Slika 5: N-glikozidna veza između riboze i dušične baze u adenzin trifosfatu (ATP-u)

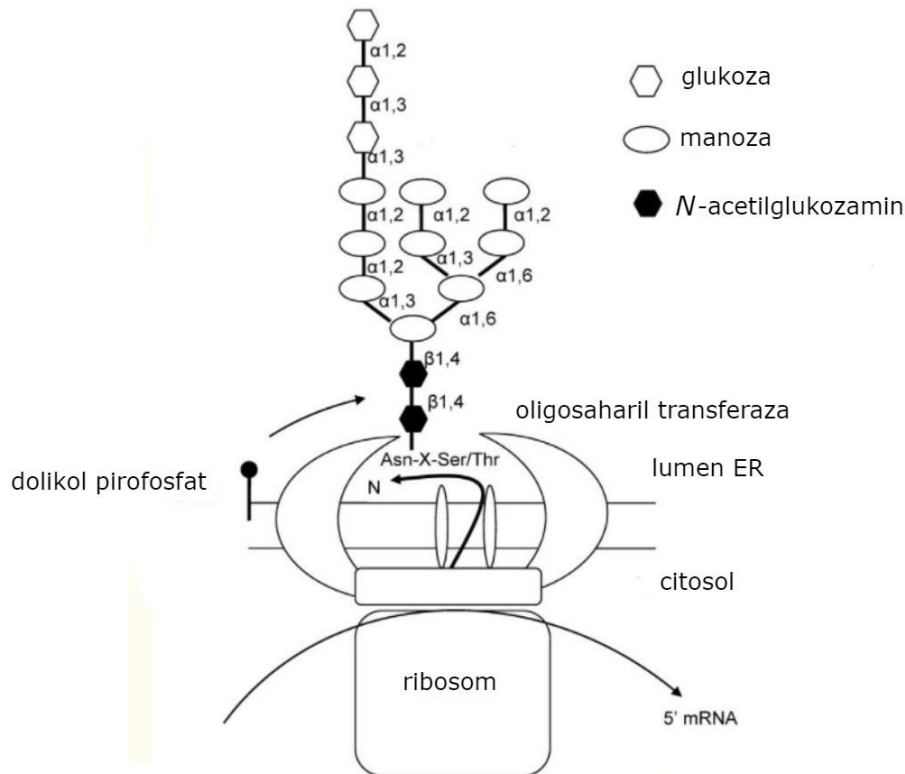
(preuzeto i prilagođeno prema⁵)

U proteinu *N*-glikozilacijom se najčešće povezuju *N*-acetilglukozamin glikana i asparagin kao na Slici 6. Asn se u proteinu uvijek nalazi u aminokiselinskoj sekvenci Asn-X-Ser/Thr, pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina jer on svojom strukturom sterički ometa nastanak glikozidne veze u neposrednoj blizini asparagina. Također, kemijska svojstva aminokiseline X mijenjaju stopu glikozilacije. Aminokiseline s kiselim svojstvima poput Asp i Glu smanjuju stopu glikozilacije, dok ju Phe povećava. Otprilike 70% proteina sadrži ovu aminokiselinsku sekvencu, a 70% tih proteina sadrži *N*-glikozidnu vezu što pokazuje da je *N*-glikozidna veza vrlo česta posttranslacijska modifikacija, ali i da ona ne nastaje u svakoj aminokiselinskoj sekvenci^{6,7,9}.



Slika 6: *N*-glikozidna veza između *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i asparagina (Asn) (preuzeto i prilagođeno prema⁸)

Proces *N*-glikozilacije odvija se u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu u dva dijela. Sintaza glikana započinje u hrapavom ER na lipidnom nosaču dolikol-fosfatu (Dol-PP). Prvi korak je prijenos *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) sa UDP-GlcNAc-a na Dol-PP pomoću enzima fosfotransferaze. Slijedi prijenos drugog GlcNAc-a i pet manoz (Man) sa UDP-a, odnosno GDP-a na Dol-P-P-GlcNAc. Ovaj dio procesa se odvija na citosolnoj strani ER nakon čega slijedi prijenos u lumen aktivnošću enzima flipaze. Poznate su mutacije u ovom enzimu čiji fenotip uključuje brojne neurološke poremećaje, a bolest je poznata pod nazivom kongenitalni poremećaji glikozilacije tip I¹⁰. U lumenu ER se dodaju još četiri Man i tri glukoze (Glc) čime se završava sinteza glikana na lipidnom nosaču. Smatra se da tri glukoza ostataka koja se dodaju zadnja pri sintezi prekursora služe kao signal da je sinteza oligosaharida spremna i da može početi prijenos na protein¹⁰. Enzim oligosaharil-transferaza prenosi oligosaharidnu strukturu sa dolikol-fosfata na već spomenuti Asn u sekvenci Asn-X-Ser/Thr kao što je prikazano na Slici 7.



Slika 7: Reakcija glikoziliranja proteina sa specifičnom aminokiselinskom sekvencom (Asn-X-Thr ili Asn-X-Ser) u ER pomoću enzima oligosaharil-transferaze (preuzeto i prilagođeno prema¹⁰)

Nakon prijenosa na protein dolazi do hidrolitičkih reakcija koje su važne za pravilno smatanje *N*-glikana. Prvo se uklanjaju tri glukoza ostataka djelovanjem dva enzima: α -glukozidaze I i α -glukozidaze II. Prvi enzim cijepa terminalnu Glc dok drugi cijepa preostale dvije. Slijedi smatanje glikoproteina koje uključuje interakciju sa šaperonima ER kalneksinom i kalretikulinom. Tijekom smatanja dolazi do dodavanja Glc. Šaperoni se vežu na protein tijekom hidrolitičkih reakcija glikozidaza, a uklanjaju se nakon što enzim α -manozidaza I ukloni manozni ostatak iz oligosaharida što je zadnji korak procesiranja u ER. U slučaju kada se protein ne može pravilno smotati doći će do njegove degradacije pomoću degradacijskog sustava ER-a (ERAD). Jedan od načina kojim se protein degradira je taj da se izbacuje u citosol i zatim ubikvitira, uslijed čega će doći do degradacije proteina. U slučaju greške u sustavu za degradaciju dolazi do nakupljanja krivo smotanih proteina što dovodi do teških bolesti poput Parkinsonove bolesti.

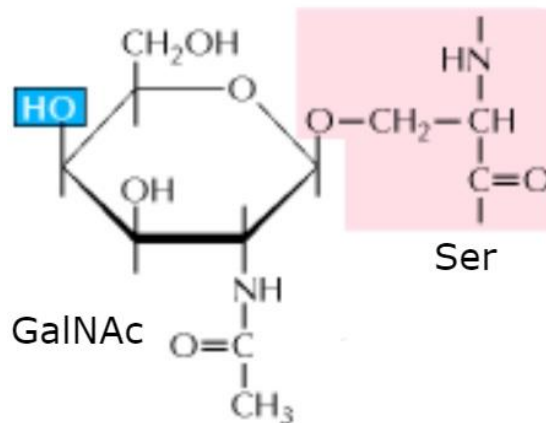
Daljnje procesiranje *N*-glikana se odvija u Golgijevom kompleksu. To je stanični organel podijeljen na tri odjeljka, a svaki je drugačiji prema vrsti enzima koje sadrže. Tako glikoproteini prvo prolaze kroz cis odjeljak u kojem se nalazi enzim manozidaza I pri čemu enzim cijepa tri terminalne manoze. Slijedi prolazak kroz medijalni odjeljak i procesiranje *N*-acetilglukozamintransferazom i dodavanje jednog GlcNAc-a. Potom enzim manozidaza II uklanja dvije Man, poslije čega se dodaje još jedan GlcNAc. Nastali produkt je prekursor svih kompleksnih *N*-glikana. Sljedeće modifikacije koje se događaju su brojne i uzrok su raznolikosti *N*-glikana. U kralježnjaka se dodaje fukoza na terminalni GlcNAc pomoću

enzima fukoziltransferaze. Za usporedbu, kod beskralježnjaka se dodaju dvije fukoze na oba terminalna GlcNAc-a, dok se kod biljaka često dodaju ksiloza i fukoza, što pak nije često kod kralježnjaka. Vrijedi spomenuti da je moguć dodatak i drugih oligosaharida poput sijalinske kiseline, galaktoze, čak i sulfata^{7,9,10}.

2.2. O-glikozilacija

O-glikozilacija je proces povezivanja *N*-acetogalaktozamina (GalNAc) s aminokiselinom koja sadrži hidroksilni bočni ogranak (najčešće serin ili treonin) u proteinu. Donor GalNAc-a je UDP-GalNAc, a reakciju obavlja enzim GalNAc-transferaza. Proces se odvija u Golgijevom aparatu, a nastali O-glikani se razlikuju prema šećeru koji se dodaje na GalNAc. Prema tome postoji:

- α -veza između GalNAc-a i Ser/Thr -najčešća vrsta modifikacije u mucinima (glikoproteini koji su sastavni dijelovi tjelesnih sluzi), gonadotropina, fetuina...prikazana na Slici 8.



Slika 8: O-glikozidna veza između *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc) i serina (Ser)

(preuzeto i prilagođeno prema¹¹)

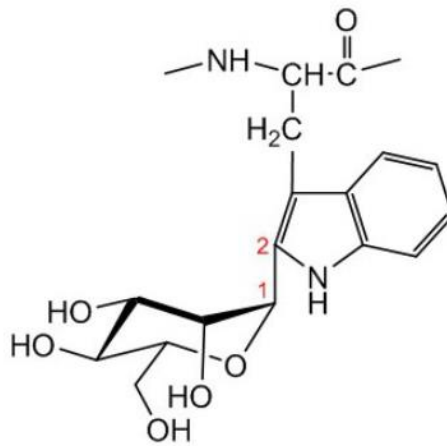
- β -veza između GlcNAc-a i Ser/Thr- jedna od najjednostavnijih modifikacija proteina, široko rasprostranjena među eukariotima. Jednom vezan, *N*-acetilglukozamin se ne supstituira drugim monosaharidima.
- α -veza između galaktoze i Ser/Thr - glikoproteini u kutikuli gliste *Lumbricum terrestris* i u membranama bakterija i arheja
- α -veza između manoze i Ser/Thr- glikozilirani proteini s ovim vezama pronađeni su perifernim živcima i u glikoproteinima i proteoglikanima mozga
- α -veza između fukoze i Ser/Thr i α -veza između glukoze i Ser/Thr- O-glikozidne veze koje su pronađene zajedno u epidermalnom faktoru rasta (EGF)

Pronađene su i druge veze monosaharida i Ser/Thr, ali u manjem broju i puno manje važnosti od navedenih. Važno je spomenuti i veze monosaharida s aminokiselinom tirozinom koji također ima hidroksilni bočni ogranak. Glikogenin, protein kojim započinje sinteza glikogena je glikoziliran na način da glukoza stvara α -glikozidnu vezu s Tyr. O-glikani su najzastupljeniji u mucinima. To su glikoproteini koji su sastavni dijelovi tjelesnih sluzi. Luče ih epitelne stanice s ciljem zaštite od patogena. Biološka uloga O-glikozilacija je povećanje termostabilnosti

proteina i otpornost na proteaze. Također, neki glikoproteini imaju bolju topljivost od svojih neglikoziliranih inačica. U ljudskom organizmu sudjeluju u oplodnji prilikom prepoznavanja jajne stanice i spermija te u imunološkom odgovoru^{9,13}.

2.3. C-glikozilacija

C-glikozilacija ili C-manozilacija je vrsta posttranslacijske modifikacije u kojoj se manaza veže na C2 atom triptofana što je prikazano na Slici 9. Modifikacija se odvija u ER pomoću enzima C-manozil-transferaze. Konsenzusna aminokiselinska sekvenca za ovu modifikaciju je Trp-X-X-Trp u kojoj se prvi Trp manozilira, ali pokazano je da na mjestu +3 Trp može zamijeniti Cys te da se na mjestu +1 favoriziraju male ili polarne aminokiseline (Ser, Thr, Ala, Gly)¹⁴.



Slika 9: C-glikozidna veza između manoze i triptofana (preuzeto i prilagođeno prema¹⁵)

18 % transmembranskih i sekrecijskih proteina sadrži C-glikozidnu vezu. Ciljanom mutagenезom je pokazana važnost C-glikozilacije u navedenim proteinima, pri čemu je svaka mutacija u konsenzusnoj sekvenci smanjivala njihovu stopu sekrecije i dulje ih zadržavala u ER. Ovaj tip glikozilacije je prvi put otkriven u RNazi II, a danas je poznat u više tipova proteina poput interleukina-12, properdina, trombospondina^{13,14}.

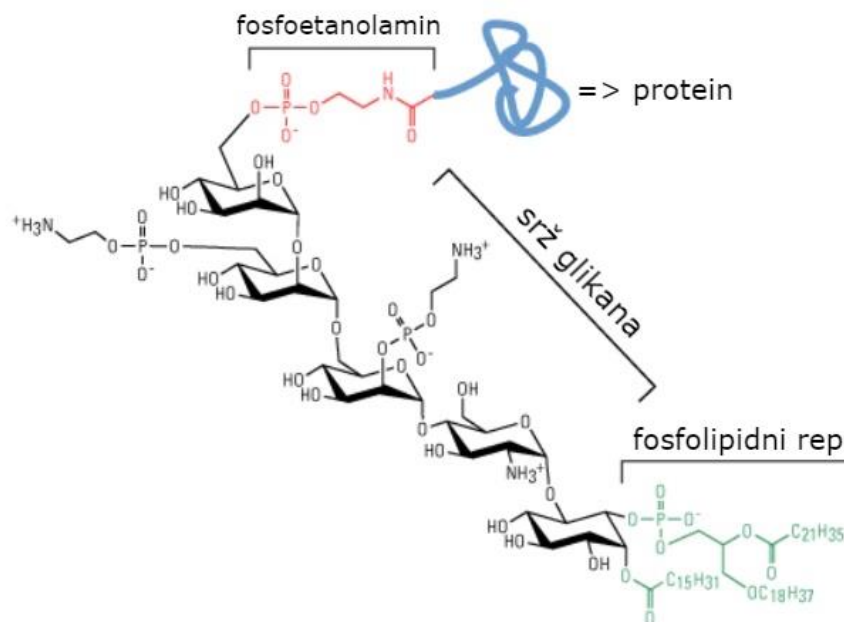
2.4 Fosfoglikozilacija

Kao što joj samo ime govori, ovaj tip glikozidne veze spaja oligosaharid i protein preko fosfata. U ovom tipu veze pronađeni su oligosaharidi GlcNAc, manaza, ksiloza i fukoza, a povezuju se preko fosfata uvijek na Ser. Enzimi koji kataliziraju ove reakcije su specifični za supstrat- npr. UDP-GlcNAc:Ser-protein N-acetilglukozamin-1-fosfotransferaza. Proteini koji sadrže ovu modifikaciju pronađeni su kod roda *Dictyostelium* i vrsta *Leishmania*. Trenutno ne postoji dovoljno točna tehnika za specifičnu karakterizaciju fosfoglikozidnih veza. Kako bi se potvrdio ovaj tip veze u glikoproteinu, potrebno je zadovoljiti nekoliko uvjeta. Prvo, glikani se iz glikoproteina ne smiju dobiti cijepanjem enzimima koji se koriste u izolaciji N- i O-glikana, poput peptid: N-glikozidaze F (PNGaze F). Drugo, potrebno je koristiti uvjete blage hidrolize jer su oligosaharidi povezani fosfoglikozidnom vezom otporni na alkalne uvjete. Na kraju, fosfatna grupa koja preostane nakon hidrolize treba biti nađena na fosfoaminokiselinama. Obzirom na uvjete koje treba ispuniti za uspješnu identifikaciju fosfoglikozidne veze i na njezinu

učestalost u prirodi, još nije prepoznata konkretna funkcija ove modifikacije, iako se povezuje s imunitetom¹⁷.

2.5. Glipijacija

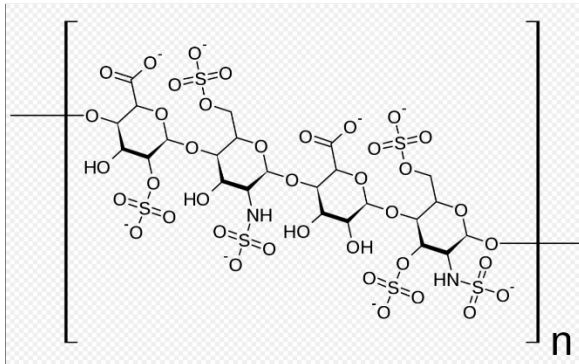
Glipijacija je posttranslacijska modifikacija u kojoj se glikozilfosfatidilinozitol (GPI) veže na protein. Biosinteza GPI započinje na citoplazmatskoj strani ER, a završava u lumenu. Na fosfatidilinozitol se dodaju monosaharidi s različitih donorskih molekula poput šećernih nukleotida i Dol-P-Man. Na kraju reakcije se dodaje 2,3-fosfoetanolamin kako bi se omogućilo vezanje na protein. Konačna struktura proteina nakon glipijacije prikazana je na Slici 10. Postoje i signali koje imaju proteini koji će ući u reakciju glipijacije, a uključuju *N*-terminalni signal za transport u lumen ER-a i *C*-terminalnu sekvencu koju prepoznaje enzim koji katalizira reakciju – glikozilfosfatidilinozitol-transamidaza (GPIT)⁴.



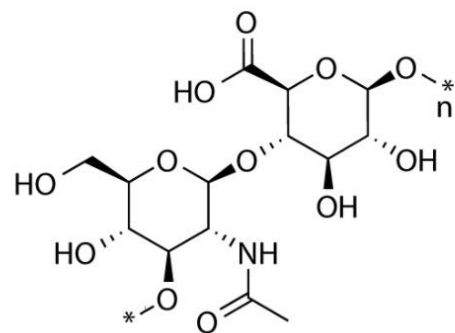
Slika 10: Struktura proteina nakon glipijacije (preuzeto i prilagođeno prema⁴)

3. PROTEOGLIKANI

Molekule koje imaju proteinsku osnovu na koju je dodan jedan ili više glikozaminoglikana (pri čemu oni tvore 95% mase glikokonjugata¹⁸) nazivamo proteoglikanima. Glikozaminoglikani su polisaharidni lanci koje tvore disaharidi: dermatan-sulfat, heparan-sulfat (Slika 11), keratan-sulfat, hijaluronska kiselina (Slika 12)... Mjesto vezanja glikozaminoglikana na protein je Ser u aminokiselinskoj sekvenci Ser-Gly-X-Gly (pri čemu je X bilo koja aminokiselina). Većina proteoglikana nakon sinteze završi vezana u ekstracelularnom matriksu (ECM) dok neki služe kao integralni membranski proteini. Od pet velikih grupa proteoglikana heparan sulfata, tri se nalaze u ECM-u: perlekan, agrin i kolagen tip VIII. Proteoglikani heparan sulfata sindekani i glikipikani su većinu vremena vezani za membranu, ali se mogu otpustiti u ECM.



Slika 11: Strukturna formula heparan-sulfata (preuzeto i prilagođeno prema¹⁹)



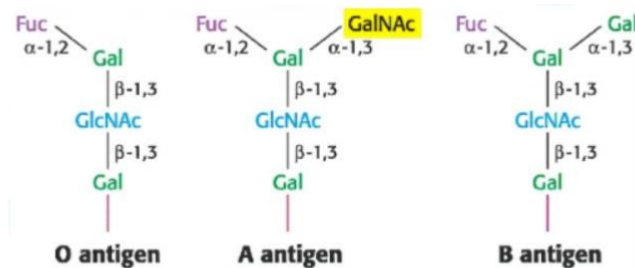
Slika 12: Strukturna formula hijaluronske kiseline (preuzeto i prilagođeno prema²⁰)

Dijelove proteoglikana koji se nalaze izvan stanične membrane uklanjaju cink-ovisne ECM metaloproteinaze. Oni su enzimi koji primarno razgrađuju tvari u ECM-u, ali postoji i skupina koja je asocirana s integralnim membranskim proteinima. Proteaze djeluju na sindekane dok fosfolipaze djeluju na glikipikane, pri čemu se njihovi produkti otpuštaju u ECM. Ovaj proces modifikacije ECM matriksa je izrazito brz i važan. Uključuje brojne fiziološke procese poput morfogeneze, kontrole staničnog rasta, odgovora stanice na ozljedu⁸... Jedan od najpoznatijih proteoglikana je hijaluronska kiselina. Ona nastaje u staničnoj membrani pomoću enzima sintaza hijaluronske kiseline nakon čega se transportira u ECM. Zbog mnogo negativnog naboja u svojoj strukturi, hijaluronska kiselina veže na sebe molekule vode pri čemu formira strukturu gela. Dodatno vezanje kationa na karboksilne skupine (COO-) potiče dodatno vezanje vode, pa se ovakva struktura opire kompresijskoj sili koju uzrokuju kolagenska vlakna. Komercijalno je prisutna u mnogo proizvoda, u obliku krema za lice, kapi za oči, dijetalnih proizvoda... Koristi se za smanjenje znakova starenja, ali i za brže zacjeljivanje rana i za olakšavanje boli u zglobovima²¹. U ljudskom tijelu hijaluronska kiselina okružuje migrirajuće i proliferirajuće stanice u embrijskim tkivima. U zglobovima tvori kompleks s proteoglikanom agrekanom čineći gel koji omogućava zglobovima da bolje podnesu velike težine¹².

4. GLIKOPROTEINI

Glikoproteini su glikokonjugati različiti od proteoglikana po tome što njihovu osnovu čini protein, dok je glikanski dio manji i može varirati od 1-70% u molekularnoj masi. Najčešće veze prisutne u glikoproteinima su već spomenute N- i O- glikozidne veze, dok su ostale veze puno rjeđe. Važnost

glikoproteina je najbolje objasniti brojkama: gotovo polovica proteina sisavaca je glikozilirano, a enzimi koji sudjeluju u procesu su kodirani genima koji čine 1% ukupnog genoma¹. Jedan od primjera važnosti glikoproteina (ali i glikolipida) je pri određivanju krvnih grupa. Krvne grupe ljudi su određene vrstom glikoproteina i glikolipida vezanih na površini eritrocita. Postoji više tipova krvnih grupa, ali najpoznatiji je ABO sustav. Sve krvne grupe sadrže istu oligosaharidnu osnovu koja bez terminalnog šećera daje krvnu grupu 0. Krvne grupe A i B su određene terminalnim monosaharidom koji je dodan na tu osnovu (Slika 13). U slučaju krvne grupe A to je *N*-acetilgalaktozamin, a kod krvne grupe B galaktoza²⁵.

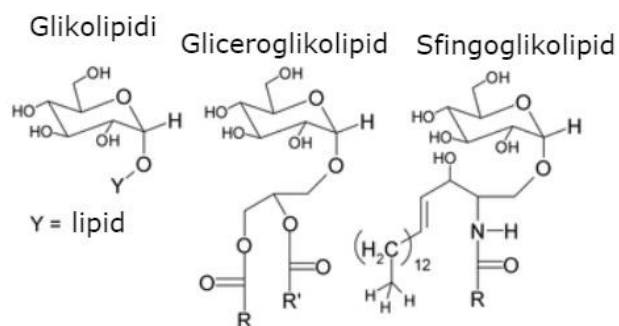


Slika 13: Strukture A,B i O oligosaharidnih antigena(preuzeto i prilagođeno prema²⁴)

Lektini su glikoproteini koji se nalaze na površini stanica svih organizama, a služe za vezanje ugljikohidrata s površine druge stanice. Osim što se vežu na oligosaharide na površini stanica, mogu vezati i slobodno-plutajuće glikane pri čemu ostvaruju slabe interakcije u kojima je konstanta disocijacije u mikromolarnim vrijednostima. Sudjeluju u puno procesa poput staničnog prepoznavanja, interakcija stanica i ECM-a, rastu embrija, diferencijaciji stanica, apoptozi, staničnoj signalizaciji... Postoji više vrsta lektina, ovisno o vrsti uloge koju obavljaju. Selektini su porodica lektina koji djeluju u imunološkom odgovoru organizma na patogene. Mogu direktno uništiti mikroorganizme ili prezentirati antigene makrofazima. Još jedna vrsta lektina su kolektini. Oni sudjeluju u prepoznavanju respiratornih virusa i patogenih bakterija pri čemu se vežu na njihovu površinu. Jedan od poznatih kolektina je manozni receptor. On je eksprimiran na površini makrofaga i dentritičkih stanica i u stanju je prepoznati i vezati širok krug mikroorganizama. Drugu domenu djelovanja ima galektin. On je još jedna vrsta lektina koji sudjeluje u cijepanju mRNA, regulaciji rasta stanice, embriogenezi, apoptozi... Broj lektinskih receptora na površini stanice se može mijenjati. Tako na površini stanice u jednom trenutku možemo naći samo malo lektinskih receptora specifičnih za jedan proces, dok u drugom stanice mogu eksprimirati mnogo receptora što je onda korisno za stvaranje velikih agregata stanica. Govoreći o njihovoj primjeni, vrijedi spomenuti njihovu važnost u izradi lijekova protiv raka. Postoje dva pristupa unosa lijekova pomoću lektina u organizam. Prvi je direktno prepoznavanje glikokonjugata na površini lijeka od strane lektina na površini ciljane stanice, dok u drugom lektini na površini lijeka ciljaju glikokonjugate na površini stanice. Ova metoda izrade lijekova je korisna jer lijekovi protiv karcinoma često imaju citotoksičan učinak na ostale stanice organizma²⁶.

5. GLIKOLIPIDI

Glikolipidi su glikokonjugati koji se sastoje od glikanskog dijela koji je glikozidnom vezom vezan na lipid poput acilglicerola, sfingoida, ceramida (*N*-acilsfingoid) ili prenil fosfata²². Dakle, glikolipidi se mogu podijeliti na dvije velike skupine: glikoglicerolipide i glikosfingolipide pri čemu je njihova struktura prikazana na Slici 14. Glikosfingolipidi se još mogu podijeliti na neutralne i kisele glikosfingolipide. U neutralne spadaju mono, oligo i poliglikozilsfingolipidi i poliglikozilceramidi, a kisele se imenuju prema vrsti skupine koju sadrže: sijalinsku kiselinu - sijaloglikosfingolipidi, uronsku kiselinu - uronoglikosfingolipidi... Glikozilacija glikolipida se odvija u ER ili Golgijevom kompleksu, ovisno o vrsti lipida koji se glikozilira.



Slika 14: Struktura glikolipida(preuzeto i prilagođeno prema²³)

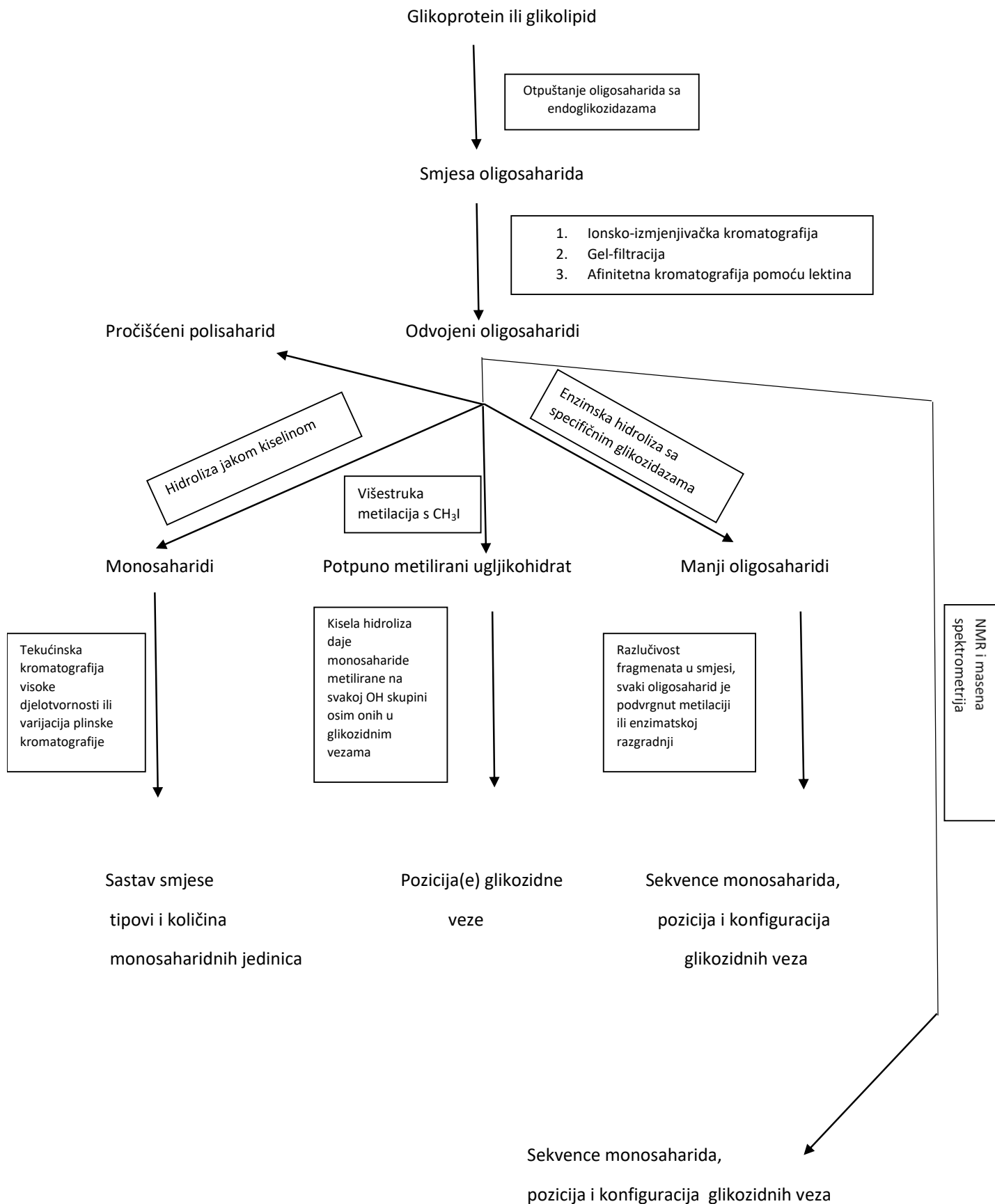
Dvije trećine glikolipida čine membranske sustave organela poput Golgijevog aparata, mitohondrija, lizosoma, jezgrine membrane... Pokazano je da imaju ulogu u provođenju signala, rastu stanica i u provođenju signala putem iona kalcija²³.

6. METODE IZOLACIJE GLIKANA

Već opisana raznolikost glikana ima više razloga. Bilo koja dva monosaharida mogu biti povezana preko bilo koje hidroksilne skupine koju sadrže. Također, veza koja sadrži C1 atom može biti u α - ili β -konfiguraciji, a moguće je i grananje monosaharida u glikanu. Svi ovi razlozi doprinose izrazitoj različitosti glikana, ali i povećavaju broj metoda koji se mogu koristiti za njihovo istraživanje. Metode proučavanja glikana uključuju enzimске reakcije s monosaharidima, metaboličko označavanje (radioaktivno ili fluorescentno) ili direktno prepoznavanje pomoću lektina ili antitijela. Inkubacijom stanica na podlozi s ³H ili ¹⁴C označavaju se monosaharidi u glikanu, nakon čega se tako označeni mogu detektirati tankoslojnom kromatografijom ili SDS-elektroforezom. Moguće je i označavanje glikozaminoglikana u proteoglikanima pomoću ³⁵SO₄ ili ³H-glukozamin i izolacija ionsko-izmjenjivačkom

kromatografijom ili precipitacijom cetilpiridinijevim kloridom/etanolom. Direktno prepoznavanje pomoću antitijela istovjetno je vezanju lektina čije je djelovanje već opisano u 4. poglavlju pa preostaje objasniti enzimske reakcije proučavanja monosaharida u glikanu. Ove reakcije su jako različite i uvelike ovise o svojstvima glikokonjugata koje istražujemo, kao što je prikazano na Slici 15.

Prilikom istraživanja glikoproteina, razgranatost glikana je moguće provjeriti elektroforezom, pri čemu je razgranatost proporcionalna količini linija na gelu. *N*-glikani se mogu izolirati cijepanjem bakterijskim enzimom peptid-*N*-glikozidazom F (PNGaza F). Ovaj enzim uspješno odvaja glikanski dio od peptida osim kada su prisutne dodatne modifikacije glikoproteina kao kod puževa, biljaka, insekata i parazita. Druga varijanta ovog enzima, PNGaza A uklanja sve *N*-glikane. Pročišćavanje *N*-glikana se izvodi ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom, tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti ili afinitetnom kromatografijom (uz korištenje lektina)⁹. *O*-glikanaza je enzim koji cijepa *O*-glikozidnu vezu i služi za istraživanje *O*-glikana. Redoslijed monosaharida u glikanu može se provjeriti i reakcijama sa specifičnim enzimima poput sialidaze ili β -galaktozidaze ukoliko nisu izvršene modifikacije glikanskih hidroksilnih grupa koje mogu onemogućiti ove hidrolitičke reakcije. Glikani vezani *O*-glikozidnim vezama mogu se otpustiti i uz pomoć hidrazina. U svrhu analize dobivenih uzoraka najviše se koriste metode poput masene spektrometrije i NMR spektroskopije. Masena spektrometrija može dati informaciju o masi iona dobivenih cijepanjem endonukleazama dok NMR pak daje informaciju o sekvenci, poziciji glikozidne veze i konfiguraciji anomernog ugljikovog atoma. Proteoglikani se analiziraju korištenjem elektroforeze ili ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom na temelju razlike u naboju koju nose sulfatne skupine^{1,4,9}.



Slika 15: Metode izolacije glikana iz glikoproteina i glikolipida (preuzeto i prilagođeno prema¹)

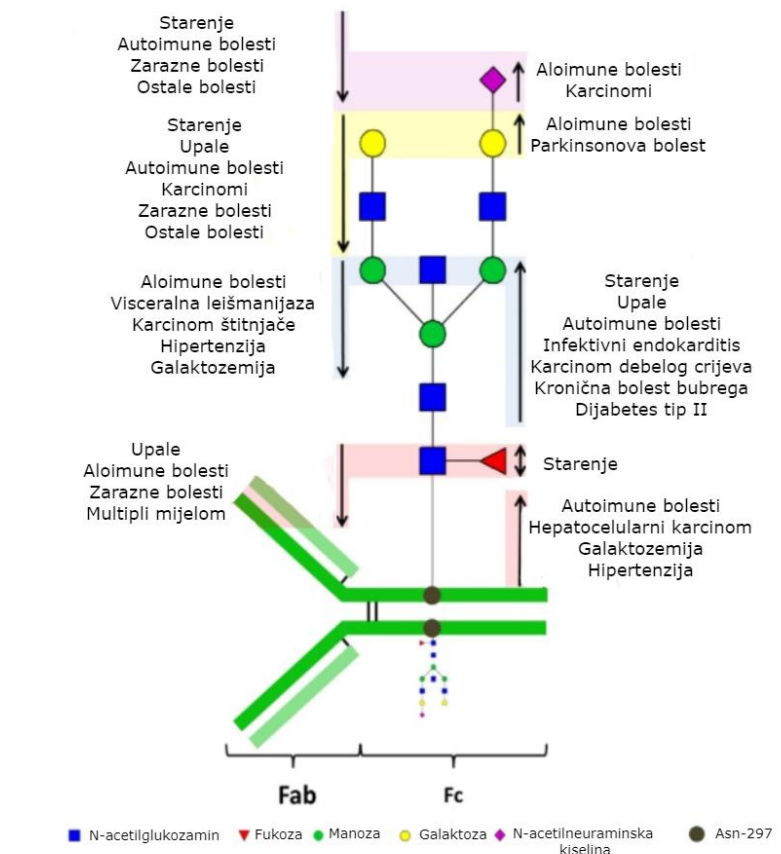
7. GLIKANI U FIZIOLOGIJI I MEDICINI

7.1. Važnost glikana u identifikaciji i liječenju stanica karcinoma

Obzirom da je u procesu glikozilacije prisutno mnogo enzima koji modificiraju makromolekule, ovaj proces je osjetljiv na bilo kakve promjene. Poznata je uloga glikana u procesima proliferacije karcinoma, angiogenezi i metastazi. Posebno je važna razgranatost lanaca glikana koja igra ulogu u kontaktu između stanica i epitelno-mezenhimskoj tranziciji. Modifikacije naginju prema kraćim lancima pri čemu se *N*-glikani zamjenjuju *O*-glikanima. Promjene u *N*-glikanima uključuju povećanu ekspresiju enzima *N*-acetilglukozaminiltransferaze V koja povećava β 1-6 grananje *N*-glikana. Nadalje, povećana je aktivnost enzima fukoziltransferaze 8 pa se pojačava proces fukozilacije na terminalnim krajevima glikana. Kod *O*-glikana dolazi do povećane ekspresije mucina zbog promjene morfologije epitelnih stanica. Mucini zbog toga mogu migrirati u krvotok gdje se, jednom otpušteni ponašaju kao „antiadhezini“ ometaju normalnu funkciju proteina kadherina i integrina i fizički blokiraju interakciju između stanica karcinoma i stanica imunološkog sustava. Morfološki gledano, u ovakvim slučajevima je česta nepotpuna glikozilacija *O*-glikana. Prepoznati su glikoproteinski biomarkeri koji se pojavljuju u nekim vrstama tumora tako da se danas glikani koriste u dijagnostici nekih vrsta karcinoma. To uključuje rak prostate, jajnika, štitnjače, dojke, neuroendokrine tumore... Napredak u boljoj dijagnostici i novim lijekovima protiv raka koči kompleksnost i jedinstvenost glikana. Ipak, predviđa se da će se u budućnosti glikani na površini T-limfocita moći modificirati čime bi se moglo efikasnije djelovati na stanice karcinoma. Potrebno je razviti nove tehnike automatske analize glikana i prikupljanja podataka kako bi se u budućnosti sve bolesti, ne samo karcinomi, mogle liječiti individualno, ovisno o genomu i metabolomu pacijenta^{9,27,28}.

7.2. Poremećaji u obrascu glikozilacije dovode do pojave različitih bolesti

Najbrojnija vrsta antitijela u našem organizmu su imunoglobulini. Među imunoglobulinima najbrojniji je IgG koji čini 75% antitijela u organizmu. IgG sudjeluje u neutralizaciji antigena, opsonizaciji za fagocitozu i staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o antitijelu. Glikani čine 15% mase IgG-a te bilo kakve promjene u njihovoj strukturi dovode do smanjene stabilnosti, poluživota i funkcije IgG-a. Ipak, do promjene obrasca glikozilacije može doći s povećanjem životne dobi, ali načelno se obrasci glikozilacije mijenjaju brzo tijekom narušenja homeostaze. Pri tome može doći do pojave različitih bolesti, ovisno raste li ili pada stupanj glikozilacije kao što je prikazano na Slici 16. Obrazac glikozilacije se mijenja značajno tijekom života, pri čemu se značajno razlikuje između ljudi prema spolu, dobi, životnim navikama... Uočen je utjecaj različitih kliničkih parametara na obrazac glikozilacije IgG-a: razina inzulina, triglicerida, ukupna razina kolesterola, kreatinina, ali i opseg struka, indeks tjelesne mase, pušenje, hipertenzija... Na temelju tih parametara se danas može vrlo točno predvidjeti kronološka, ali i biološka dob pojedinca².



Slika 16: Promjene u glikozilaciji IgG-a tijekom starenja i bolesti. Strelice označavaju porast, odnosno pad glikozilacije kod osoba u ekperimentalnoj skupini u odnosu na osobe u kontrolnoj skupini, pri čemu su sve promjene praćene u odrasloj dobi (preuzeto i prilagođeno prema²).

8. NAJNOVIJA OTKRIĆA I BUDUĆNOST U PODRUČJU GLIKANA

8.1. RNA kao novi tip glikoziliranih molekula

Obećavajuću budućnost u istraživanju glikana potvrdilo je otkriće glikoziliranih molekula RNA nazvanih glikoRNA. Značajnost ovog otkrića je u tome što su glikoRNA nađene na površini stanica u više organizama što je potvrdilo njihovu dotad nepoznatu funkciju u međustaničnim interakcijama. Na terminalnim pozicijama u njihovim *N*-glikanima nađena je sijalinska kiselina koja interagira sa Siglec proteinima koji reguliraju naš imunološki sustav. Moguće je da će ovo otkriće pomoći u boljem shvaćanju i kontroliranju našeg imunološkog sustava čime bismo u budućnosti mogli spriječiti određene autoimune bolesti. Unatoč entuzijazmu, potrebno je odgovoriti na neka važna pitanja poput načina povezivanja RNA i glikana. Postoji i potreba za razvitkom novih metoda za istraživanje glikoRNA jer trenutne metode nisu primjenjive na prethodno izolirane ljudske uzorke^{29,30,31}.

8.2. Budućnost istraživanja glikana

Obzirom da su glikani trenutno još uvijek relativno nepoznati široj znanstvenoj zajednici te su slabo zastupljeni u znanstvenoj literaturi, potrebno je još vremena kako bi se budući znanstvenici detaljnije obrazovali o ovoj temi. Svakako je obećavajuća pojava različitih komercijalnih testova za mjerenje biološke dobi koji su dostupni široj populaciji, kao i pojava različitih kitova za jednostavnije istraživanje glikana. Razvoj metoda za analizu glikana je također u uzlaznoj putanji. Sve je dostupnija metoda visokoprotodne tekućinske kromatografije (HPLC) ali je brzina napretka u glikobiologiji toliko da se i ova metoda već zamjenjuje metodom kapilarne elektroforeze. Različite studije se sve više usmjeravaju i na medicinsku korist poznavanja glikana. U tijeku je razvoj već spomenutih lijekova koji bi ciljali stanice koje odaberemo, bez štetnog učinka na druge stanice. Ipak, proći će još dugo vremena dok ne istražimo cijeli glikom čovjeka i ostvarimo napredak u ovom polju znanosti.

9. ZAKLJUČAK

Glikozilacija je vrsta posttranslacijske modifikacije u kojoj se na makromolekulu dodaje ugljikohidrat kojeg nazivamo glikan. Postoji pet načina nastanka glikozidne veze: *N*-, *O*-, *C*-glikozilacija, fosfoglikozilacija i glipijacija. Prema vrsti makromolekule na koju se glikan dodaje i njegovom udjelu u molekuli razlikujemo proteoglikane, glikoproteine, glikolipide i odnedavno glikoRNA. Glikani se uglavnom nalaze na površini stanica gdje imaju ulogu u komunikaciji između stanica i čine glikokaliks, dok u unutarstaničnom prostoru označavaju makromolekule za transport i lokalizaciju. Pokazano je i da imaju brojne uloge u imunološkom sustavu pa su na temelju proučavanja glikoziliranosti imunoglobulina napravljeni testovi biološke dobi. Najbrojnija vrsta glikana u ljudskom organizmu su *N*-glikani te se oni i najviše istražuju. Za istraživanje se najviše koriste metode kromatografije koje daju visoku točnost odvajanja. Daljnja istraživanja glikana će nam pomoći u boljem shvaćanju velike različitosti u glikozilaciji stanica u organizmu kao i u razvoju lijekova koji će moći djelovati samo na ciljane stanice putem interakcija koje se ostvaruju preko glikana.

10. LITERATURA:

1. D. L. Nelson, M. M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, 7. izdanje
2. <https://sites.google.com/a/wrps.net/cns-ontl/cns-2nd-semester-weblinks/unit-7/biomolecules---carbohydrates>, zadnje pristupljeno 7.9.2021.
3. I. Gudelj, G. Lauc, M. Pezer, 2018: Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases, Cellular Immunology, , 333: 65-79
4. Thermo Fischer Scientific: Protein glycosylation, https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-glycosylation.html?ef_id=CjwKCAjwhYOFBhBkEiwASF3KGdFrkmRXppLkgMTXECZm8IXf44_xURGP0JBI6JGh0FwZYLRjdW1RhoCbBsQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!459073496772!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&gclid=CjwKCAjwhYOFBhBkEiwASF3KGdFrkmRXppLkgMTXECZm8IXf44_xURGP0JBI6JGh0FwZYLRjdW1RhoCbBsQAvD_BwE, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
5. [https://chem.libretexts.org/Courses/Oregon_Institute_of_Technology/OIT%3A_CHE_332_-_Organic_Chemistry_II_\(Lund\)/10%3A_Nucleophilic_Carbonyl_Addition_Reactions/5%3A_N-glycosidic_Bonds](https://chem.libretexts.org/Courses/Oregon_Institute_of_Technology/OIT%3A_CHE_332_-_Organic_Chemistry_II_(Lund)/10%3A_Nucleophilic_Carbonyl_Addition_Reactions/5%3A_N-glycosidic_Bonds), zadnje pristupljeno 9.9.2021.
6. Health Science Journal, <https://www.hsj.gr/medicine/nlinked-glycosylation-and-its-potentialapplication-in-drug-development.php?aid=30911>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.

7. R. Valla, 2018: Posttranslacijske modifikacije proteina, seminarski rad
8. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:N-linked_glycosidic_bond.png, zadnje pristupljeno 9.9.2021.
9. P. Stanley, N. Taniguchi, M. Aebi, 2017: Essentials of Glycobiology ,3. izdanje
10. E. Bieberich , 2014: Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins, *Advance Neurobiology*, 9:47-70
11. <http://www.premierbiosoft.com/glycan/glossary/glycosylation.html>,zadnje pristupljeno 9.9.2021.
12. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K.C. Martin, 2016: Molecular cell biology
13. R. G. Spiro, 2002: Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology*, 12; 4:43–56
14. K. Julenius,2007: NetCGlyc 1.0: prediction of mammalian C-mannosylation sites, *Glycobiology*, 17; 8: 868–876
15. <https://www.physiol.uzh.ch/en/Glycosylation/CMannosylation.html>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
16. A. Furmanek, J. Hofsteenge, 2000: Protein C-mannosylation: Facts and questions, *Acta Biochimica Polonica*, 47:781-789
17. P. A. Haynes, 1998: Phosphoglycosylation: A new structural class of glycosylation?, *Glycobiology*, 8; 1:1–5
18. News Medical Life Sciences,<https://www.news-medical.net/life-sciences/Structure-and-Function-of-Proteoglycans.aspx>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
19. https://en.wikipedia.org/wiki/Heparan_sulfate#/media/File:Heparan_Sulfate.svg, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
20. <https://www.selleckchem.com/products/hyaluronic-acid.html>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
21. Medical News Today, <https://www.medicalnewstoday.com/articles/326385#is-it-effective>), pristupljeno 15.8.2021.
22. International union of pure and applied chemistry and International union of biochemistry and molecular biology,<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iupac/misc/noGreek/glylp.html>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
23. Physics Libre Text, https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD%3A_Biophysics_241_-_Membrane_Biology/01%3A_Lipids/1.04%3A_Glycolipids , zadnje pristupljeno 26.7.2021.
24. <https://slidetodoc.com/biochemistry-3070-carbohydrates-1-carbohydrates-french-scientists-coined/>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
25. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, 2013: Biokemija, 6.izdanje
26. H. Ghazarian, B. Itoni, S. B. Oppenheimer, 2010: A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics, 113; 3:236-247
27. A. Peixoto, M. Relvas-Santos, R. Azevedo, L. L. Santos, J.A. Ferreira, 2019: Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks, *Frontiers in oncology*
28. G. Lauc, M. Pezer, I. Rudan, H. Campbell, 2015: Mechanisms of disease: The human N-glycome, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860, 1574-1582
29. Stanford News,<https://news.stanford.edu/2021/05/17/stanford-study-reveals-new-biomolecule/>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.
30. Boston Children's Hospital, <https://answers.childrenshospital.org/glycornal/>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.

31. The Scientist, <https://www.the-scientist.com/news-opinion/newly-discovered-glycosylated-rna-is-all-over-cells-study-68773>, zadnje pristupljeno 15.8.2021.

11. SAŽETAK

Glikan je naziv za skup monosaharida međusobno povezanih glikozidnim vezama čija duljina varira ovisno o vrsti glikozidne veze i organizmu. Naziv se češće koristi za skupinu monosaharida povezanih glikozidnim vezama koji mogu biti samostalni ili vezani na protein ili lipid, pri čemu glikan zauzima veći ili manji dio konačne strukture. Glikani mogu biti vezani na različite makromolekule: proteine, lipide, čak i RNA. Prema tome razlikujemo proteoglikane, glikoproteine i glikolipide. Oni nastaju procesom glikozilacije, a sami proces ima pet varijanti: *N*-, *O*-, *C*- glikozilacija, fosfoglikozilacija i glikopijacija. Jasno je da je proces glikozilacije izuzetno važna posttranslacijska modifikacija zbog niza uloga koje glikani obavljaju u stanici, a daljnja istraživanja će donijeti napredak u mnogim granama znanosti.

Glycan is a name for a set of oligosaccharides connected with glycosidic bonds which varies in length depending on a type of glycosidic bond and organism. Name is more commonly used for group of monosaccharides connected with glycosidic bonds which can be independent or connected to a protein or a lipid, where glycan occupies bigger or smaller part of final structure. Glycans can be connected to different macromolecules: proteins, lipides, even RNA. According to that we recognize proteoglycans, glycoproteins and glycolipids. They are made by glycosylation, and the process has five variants: *N*- , *O*-, *C*-glycosylation, phosphoglycosylation and glypiation. It is clear that the glycosylation is very important posttranslational modification by many roles that glycans do in a cell, and further research will bring new advances in many branches of science.