

Glikozilacija plazmatskih proteina u dijabetesu uzrokovanom mutacijama gena HNF1A

Pavić, Tamara

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:181685>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Tamara Pavić

**GLIKOZILACIJA PLAZMATSKIH
PROTEINA U DIJABETESU
UZROKOVANOM MUTACIJAMA
GENA *HNF1A***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Tamara Pavić

GLYCOSYLATION OF PLASMA PROTEINS IN HNF1A–MATURITY ONSET DIABETES OF THE YOUNG

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Tamara Pavić

**GLIKOZILACIJA PLAZMATSKIH
PROTEINA U DIJABETESU
UZROKOVANOM MUTACIJAMA
GENA *HNF1A***

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Olga Gornik

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Tamara Pavić

GLYCOSYLATION OF PLASMA PROTEINS IN HNF1A–MATURITY ONSET DIABETES OF THE YOUNG

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Olga Gornik, PhD, Associate Professor

Zagreb, 2017.

Zahvale

Istraživanje prikazano u ovoj disertaciji plod je višegodišnjeg rada i truda mnogih ljudi, koji su bilo izravno bilo neizravno doprinijeli njenoj izradi. Stoga, veliko hvala:

Mojoj mentorici Olgi na neizmjernoj pomoći pri izradi ovog rada, vođenju, motivaciji, strpljenju i uloženom trudu, no prije svega što mi je bila prava prijateljica i „životni trener“.

Profesoru Gordanu Laucu što me podržavao na mom znanstvenom putu i što mi je dao priliku da radim s tako divnim ljudima.

Suradnicima iz Centra za dijabetes, endokrinologiju i metabolizam Sveučilišta u Oxfordu, a posebice Agati Juszcak i prof. Katharine Owen na dobrodošlici, nesebičnom dijeljenju znanja i svojoj pomoći u provođenju eksperimenata.

Svim djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju na pruženim savjetima i ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala Irmi koja me uvela u svijet glikobiologije i koja je u mnogome zaslužna za to gdje danas jesam.

Mom lab cimeru Tomi na pomoći u rješavanju mnogih znanstvenih i još više neznastvenih dilema, na salvama smijeha i njegovoj zaštitnoj uzrečici – Pomalo! Hvala Najdi na dobrom društvu.

Svim članovima Genos ekipe, a posebno Frani, na ogromnoj pomoći sa statistikom i uvijek zanimljivom doživljaju svijeta, te Ivanu, u čijem je društvu doktorski studij protekao mnogo zabavnije.

Mojoj obitelji koja me oduvijek nesebično podupire u svemu što radim. Ništa od ovog ne bi bilo moguće bez vas.

Mojim prijateljicama – uvijek su mi bile izvor radosti i smijeha te suputnice u mnogim pustolovinama.

Mom Ekiju... ti znaš koliko mi značiš...

Sadržaj

SAŽETAK.....	XV
ABSTRACT	XVII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Svrha i cilj rada.....	3
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Općenito o glikozilaciji proteina	5
2.2. N-glikozilacija proteina	6
2.2.1. Biosinteza N-glikana i kontrola kvalitete smatanja proteina.....	6
2.2.2. Uklanjanje pogrešno smotanih proteina iz endoplazmatskog retikuluma	9
2.2.3. Dorada N-glikana u Golgijevom aparatu.....	11
2.3. Funkcije N-glikana.....	15
2.3.1. Fiziološke uloge N-glikana	15
2.3.2. N-glikani kao biljezi	15
2.4. Analiza N-glikana.....	17
2.4.1. HILIC profiliranje fluorescentno obilježenih N-glikana.....	19
2.4.2. Spektrometrija masa u analitici N-glikana	20
2.5. Cjelogenomske studije povezanosti	22
2.6. Gen <i>HNFI A</i>	23
2.7. Dijabetes mladih koji se javlja u odrasloj dobi (MODY).....	25
2.7.1. <i>HNFI A</i> -MODY.....	28
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	30
3.1. Ispitanici.....	30
3.2. Materijali	31
3.2.1. Standardne kemikalije.....	31
3.2.2. Enzimi	31
3.2.3. Nukleinske kiseline i nukleotidi.....	31
3.2.4. Komercijalni kompleti.....	32
3.2.5. Pločice za pripremu i pročišćavanje uzoraka	32
3.2.6. Kromatografske kolone i pločice za nanošenje uzoraka.....	32
3.3. Metode.....	32

3.3.1. Metode umnažanja i sekvenciranja DNA.....	32
3.3.1.1. Izolacija genomske DNA	32
3.3.1.2. Određivanje koncentracije DNA	33
3.3.1.3. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze	33
3.3.1.4. Agarozna gel-elektroforeza i vizualizacija gelova	33
3.3.1.5. Pročišćavanje PCR produkta	34
3.3.1.6. Sekvenciranje gena od interesa	34
3.3.1.7. Procjena patogenosti pronađenih rijetkih varijanti gena <i>HNF1A</i>	34
3.3.2. Metode analize N-glikana ukupnih proteina plazme.....	35
3.3.2.1. Denaturacija i deglikozilacija ukupnih proteina plazme	35
3.3.2.2. Fluorescentno obilježavanje i pročišćavanje otpuštenih N-glikana.....	35
3.3.2.3. Razgradnja N-glikana sijalidazom	37
3.3.2.4. Analiza N-glikana tekućinskom kromatografijom	37
3.3.2.5. Izračun deriviranih parametara fukozilacije ukupnih proteina plazme	42
3.3.2.6. Sekvenciranje glikana enzimskim reakcijama egzoglikozidaza.....	43
3.3.2.7. Spektrometrija masa otpuštenih i obilježenih N-glikana.....	46
3.4. Statistička obrada podataka	47
§ 4. REZULTATI.....	49
4.1. Karakteristike ispitanika.....	49
4.2. Varijante gena <i>HNF1A</i> identificirane u istraživanju.....	50
4.2.1. Sekvenciranje gena <i>HNF1A</i> i detekcija mutacija.....	50
4.2.2. Pronađene rijetke varijante gena <i>HNF1A</i>	52
4.2.3. Prevalencija <i>HNF1A</i> -MODY-a u Hrvatskoj	55
4.3. N-glikanski obrasci plazmatskih proteina u <i>HNF1A</i> -MODY-u	57
4.3.1. Netretirani N-glikani u <i>HNF1A</i> -MODY-u	57
4.3.2. Desijalinizirani N-glikani u <i>HNF1A</i> -MODY-u	60
4.3.3. Derivirani parametri fukozilacije u <i>HNF1A</i> -MODY-u.....	68
4.3.4. Razlikovanje <i>HNF1A</i> -MODY-a od dijabetesa tipa 2 korištenjem glikanskih parametara	70
4.3.4.1. Klasifikacija dijabetesa pomoću N-glikana ukupnih plazmatskih proteina	70
4.3.4.2. Klasifikacija dijabetesa pomoću desijaliniziranih N-glikana plazmatskih proteina.....	72
4.3.4.3. Klasifikacija dijabetesa pomoću deriviranih parametara fukozilacije	73
4.3.5. Klinički potencijal glikanskih biljega.....	76
4.3.6. Glikani kao biljezi funkcije rijetkih varijanti gena <i>HNF1A</i>	78
4.4. Identifikacija i strukturna karakterizacija glikanskih struktura.....	79
4.4.1. Potvrđivanje struktura prisutnih u značajnim pikovima netretiranih N-glikana.....	80
4.4.2. Određivanje glikanskih struktura desijaliniziranog N-glikoma plazmatskih proteina	84
§ 5. RASPRAVA	88
5.1. Glikanski obrasci u <i>HNF1A</i> -MODY-u.....	88
5.2. Prevalencija <i>HNF1A</i> -MODY-a u Hrvatskoj	93
5.3. Dijagnostički protokol za <i>HNF1A</i> -MODY	95
§ 6. ZAKLJUČAK	98

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	100
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	104
§ 9. ŽIVOTOPIS	XIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

GLIKOZILACIJA PLAZMATSKIH PROTEINA U DIJABETESU UZROKOVANOM MUTACIJAMA GENA *HNF1A*

Tamara Pavić

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kovačićeve 1, 10 000 Zagreb

Dijabetes mladih koji se javlja u odrasloj dobi (MODY, engl. *maturity onset diabetes of the young*) monogeniski je tip dijabetesa, najčešće uzrokovan mutacijama u genu *HNF1A*. Vrlo se često pogrešno dijagnosticira kao dijabetes tipa 1 ili 2, međutim, pravilna dijagnoza od izrazite je važnosti, budući da je kod ovih pacijenata moguće dugo održavati normoglikemiju oralnom primjenom derivata sulfonilureje. Definitivna dijagnoza bolesti postavlja se sekvenciranjem gena *HNF1A*, ali i tada postoji problem određivanja patogenosti pronađenih varijanti. Kako se protein HNF1 α pokazao ključnim regulatorom fukozilacije proteina, plazmatski je *N*-glikom značajno promijenjen kod oboljelih od HNF1A-MODY-a. Dobiveni rezultati pokazuju da mnogi glikanski parametri mogu uspješno raspoznati pacijente s rijetkim varijantama gena *HNF1A*, od pacijenata bez *HNF1A* varijanti. Glikani pokazuju vrijednost i u određivanju utjecaja pronađenih rijetkih *HNF1A* varijanti na funkciju, točnije, mogu se upotrijebiti kao biljeg patogenih varijanti. Zaključno, uključivanjem glikanskog biljega u dijagnostički protokol za HNF1A-MODY značajno bi se povećala dijagnostička osjetljivost.

(112 + XXI stranica, 41 slika, 15 tablica, 112 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: HILIC-UPLC/ *HNF1A*/ monogeniski dijabetes/ *N*-glikozilacija/ prevalencija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Olga Gornik

Rad prihvaćen: 3. svibnja 2017.

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
prof. dr. sc. Gordan Lauc
doc. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

GLYCOSYLATION OF PLASMA PROTEINS IN HNF1A–MATURITY ONSET DIABETES OF THE YOUNG

Tamara Pavić

Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Kovačićeve 1, 10 000 Zagreb

Maturity onset diabetes of the young (MODY) is a monogenic form of diabetes most commonly caused by *HNF1A* mutations. It is frequently misdiagnosed as type 1 or type 2 diabetes, but correct diagnosis of MODY patients is of utmost importance, since their hyperglycemia is usually very sensitive to oral treatment with sulphonylurea agents. HNF1A-MODY is definitively diagnosed by gene sequencing, but even then, a confirmation that *HNF1A* variants are pathogenic remains an issue. Since HNF1 α showed to be a master regulator of protein fucosylation, plasma *N*-glycome is significantly altered in HNF1A-MODY patients. Results presented in this thesis show that many glycan traits can successfully discriminate patients with rare *HNF1A* variants from patients without the variant. Glycans also show value in assessing the effect of identified allele variants on gene function, i.e., they can be used as biomarkers of pathogenic variants. In conclusion, incorporating glycans in diagnostic protocol for HNF1A-MODY would significantly increase diagnostic sensitivity.

(112 + XIX pages, 41 figures, 15 tables, 112 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: HILIC-UPLC/ *HNF1A*/ monogenic diabetes/ *N*-glycosylation/ prevalence

Supervisor: Dr. Olga Gornik, Associate Professor

Thesis accepted: May 3rd 2017

Reviewers: Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. Gordan Lauc, Professor
Dr. Sandra Šupraha Goreta, Assistant Professor

§ 1. UVOD

Glikozilacija proteina je ubikvitarna posttranslacijska modifikacija, prisutna u svim domenama života. Karakterizirani značajnom kompleksnošću u animalnim sustavima, glikani su nositelji ključnih bioloških i fizioloških uloga, od sudjelovanja u pravilnom smatanju proteina i kontroli kvalitete, do uključenosti u veliki broj procesa biološkog raspoznavanja.¹ Kako vezanje različitih glikanskih struktura na proteine ima značajan utjecaj na njihovu fiziološku funkciju, tako su i mnogi patološki procesi povezani s različitim tipovima glikanskih promjena.² Poremećaji regulacije glikozilacije povezani su, dakle, sa širokim spektrom bolesti, uključujući rak³, dijabetes⁴, kardiovaskularne⁵, kongenitalne⁶, imunološke⁷ i infektivne⁸ poremećaje.

Glikozilacija je visokoregulirani, složeni proces u kojem sudjeluje mnoštvo gena i njihovih produkata, uključujući stotine glikoziltransferaza i glikozidaza, a procjenjuje se da je u glikozilaciju proteina uključeno barem 5-10 % humanog genoma, što sam proces čini najkompleksnijim biosintetskim putem stanice.⁹ Geni određuju strukturu proteina koji sudjeluju u procesima sinteze glikana, međutim, polimorfizmi uključenih gena, regulacija genske ekspresije, posttranslacijske modifikacije i aktivnost odgovarajućih proteina djeluju zajednički kako bi oblikovali konačnu strukturu glikana. Dodatno, mehanizmi poput izmijenjene unutarstanične lokalizacije i varijabilne dostupnosti monosaharidnih donora također utječu na konačnu strukturu glikana.¹⁰ Smatra se da će cjelogenomske studije povezanosti (GWAS, engl. *genome-wide association study*) pomoći u razjašnjavanju i mapiranju regulacijske mreže gena koji sudjeluju u glikozilaciji proteina.

Primjerice, nedavno se kombiniranjem pristupa cjelogenomskih studija povezanosti i visokoprotočne analize *N*-glikozilacije ukupnih proteina plazme pokazalo da određene varijante gena *HNF1A* (engl. *hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A*), čija biološka povezanost s glikozilacijom nije bila ranije poznata, snažno utječu na razine *N*-glikana u plazmi.¹¹ Gen *HNF1A* kodira protein HNF1 α , s aktivnošću transkripcijskog faktora i ključnom ulogom u autoregulacijskoj transkripcijskoj mreži tijekom embrionalnog razvoja gušterače, kao i u zreloj gušterači.^{12,13} HNF1 α građen je od 631 aminokiseline. Osim u gušterači pokazuje aktivnost i u jetri, crijevnom epitelu i bubrezima. U zrelim Langerhansonovim otočićima HNF1 α regulira ekspresiju velikog broja gena β -stanica, poput gena za inzulin, glukozni transporter Glut2 i piruvat-kinazu, te je esencijalan za održavanje funkcije zrele gušterače.¹³ Spomenuta studija¹¹

također je pokazala da genski produkt HNF1 α regulira ekspresiju ključnih gena uključenih u biosintezu fukoze i fukoziltransferaznu aktivnost, čime se HNF1 α pokazao ključnim transkripcijskim regulatorom procesa fukozilacije proteina.

Kod odrasle populacije heterozigotne mutacije *HNF1A* gena najčešći su uzrok dijabetesa mladih koji se javlja u odrasloj dobi (MODY, engl. *maturity onset diabetes of the young*).^{14,15} MODY je monogenski tip dijabetesa, karakteriziran autosomno-dominantnim nasljeđivanjem, ranim nastupom bolesti (često prije 25. godine života) te progresivnim propadanjem funkcije β -stanica gušterače, što je posljedica nemogućnosti prikladnog povećanja inzulinske sekrecije u odgovoru na hiperglikemiju.¹⁶

HNF1A-MODY se vrlo često pogrešno dijagnosticira kao dijabetes tipa 1 ili 2. Međutim, ispravna dijagnoza od velike je važnosti, budući da se normoglikemija kod značajnog broja takvih pacijenata može postići primjenom oralnih antidijabetika iz skupine sulfonilureja^{17,18}, što za određene pacijente omogućava prekid (dugogodišnje) terapije inzulinom. Nadalje, budući da se radi o monogenskom tipu dijabetesa s dominantnim načinom nasljeđivanja, točna dijagnoza omogućava pravilnu i pravovremenu terapijsku intervenciju kod ostalih zahvaćenih članova obitelji. Dijagnoza bolesti se postavlja molekularnom dijagnostikom, odnosno sekvenciranjem gena *HNF1A*, međutim, takav pristup je trenutno preskup za široku i neselektivnu primjenu.

S ciljem poboljšanja dijagnostike monogenskog dijabetesa, ispitano je više različitih serumskih i plazmatskih biljega. Potencijalno najboljim se pokazao visoko osjetljivi C-reaktivni protein (hsCRP, engl. *high-sensitivity C-reactive protein*).^{19,20} Ekspresija CRP-a također je regulirana transkripcijskim faktorom HNF1 α , što kod pacijenata s haploinsuficijencijom gena *HNF1A* dovodi do snižavanja njegove serumske koncentracije, što nije slučaj kod ostalih tipova dijabetesa. hsCRP se pokazao uspješnim u razlikovanju HNF1A-MODY-a i dijabetesa tipa 2, vjerojatno iz razloga što pretilost i inzulinska rezistencija kod tipa 2 dovode do kroničnog povišenja njegove razine. Međutim, glavni nedostatak hsCRP-a kao biljega jest nedovoljna moć razlikovanja HNF1A-MODY-a i dijabetesa tipa 1, kao i činjenica da se razina hsCRP-a prolazno poveća kod upalnog odgovora.

Budući da se HNF1 α pokazao ključnim regulatorom fukozilacije proteina plazme¹¹, daljnje studije pokazale su da mutacije gena *HNF1A* koje rezultiraju gubitkom funkcije, a samim time su i kauzalne za MODY, dovode do promijenjene fukozilacije proteina plazme.^{21,22} Naime, razina antenarne fukoze kod pacijenata s HNF1A-MODY dijabetesom statistički je značajno

niža u usporedbi s ostalim tipovima dijabetesa i zdravim kontrolama. Spomenuta studija²¹ je rezultirala izračunom deriviranog glikanskog (fukozilacijskog) indeksa, koji predstavlja omjer fukoziliranih i nefukoziliranih triantenarnih glikana, pokazujući osjetljivost i specifičnost od približno 90 % u razlikovanju HNF1A-MODY od ostalih tipova dijabetesa, te time predstavlja potencijalno uspješan biljeg HNF1A-MODY dijabetesa.

Međutim, kako bi se procijenio potencijal glikanskog indeksa kao biljega za HNF1A-MODY, potrebno je ispitati njegovu uspješnost u stvarnim kliničkim uvjetima, među neprobranom skupinom pacijenata s nastupom dijabetesa u mlađoj odrasloj dobi, što predstavlja situaciju s kojom se dijabetolozi svakodnevno susreću.

1.1. Svrha i cilj rada

Istraživanje provedeno u okviru ovog doktorskog rada usmjereno je na pronalazak i procjenu kliničke vrijednosti novog biljega za monogeni tip dijabetesa uzrokovan mutacijama u genu *HNF1A* (HNF1A-MODY). Kako uspostavljanje točne dijagnoze ima izravan utjecaj na terapijski tretman oboljelih te omogućuje pravovremeno otkrivanje bolesti i kod ostalih zahvaćenih članova obitelji, razvoj takvog biljega od izuzetne je važnosti. Trenutno se definitivna dijagnoza bolesti postavlja sekvenciranjem gena *HNF1A*, no i tada postoji problem procjene patogenosti pronađenih mutacija. Kako se antenarna fukozilacija plazmatskih proteina, odnosno derivirani fukozilacijski indeks pokazao obećavajućim alatom u razlikovanju HNF1A-MODY-a od ostalih oblika dijabetesa, ovim istraživanjem pokušat će se procijeniti njegova klinička vrijednost. Naime, prethodna studija²¹ provedena je korištenjem dobro definiranih skupina pacijenata s HNF1A-MODY-em te dijabetesom tipa 1 i 2, kojima je dijagnoza postavljena na temelju kliničkih, biokemijskih i molekularnih ispitivanja. Međutim, ovaj doktorski rad ispituje dijagnostičku vrijednost glikanskog testa u stvarnim kliničkim uvjetima, među neprobranom skupinom pacijenata s nastupom dijabetesa u mlađoj odrasloj dobi. Budući da je fukozilacija podložna promjenama uzrokovanim patogenim varijantama gena *HNF1A*, očekuje se da će razina fukoziliranih glikana ukupnih proteina plazme biti snižena kod pacijenata s HNF1A-MODY dijabetesom te imati vrijednost u procjeni patogenosti novootkrivenih *HNF1A* varijanti.

Krajnji je cilj ovog istraživanja razvoj racionalnog dijagnostičkog protokola, koji će uključivati glikanski biljeg, a u svrhu probira ispitanika za genetičko testiranje te postavljanje konačne dijagnoze. Navedeni dijagnostički protokol moći će se uključiti u postojeće kliničke smjernice u zemljama s rutinskom molekularnom dijagnostikom monogenetskog dijabetesa. Naprotiv, u zemljama u kojima molekularna dijagnostika MODY dijabetesa još uvijek nije dostupna, poput Hrvatske, ovo će istraživanje podignuti svjesnost o postojanju i važnosti ispravnog dijagnosticiranja HNF1A-MODY dijabetesa te predložiti protokol za njegovu rutinsku dijagnostiku.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Općenito o glikozilaciji proteina

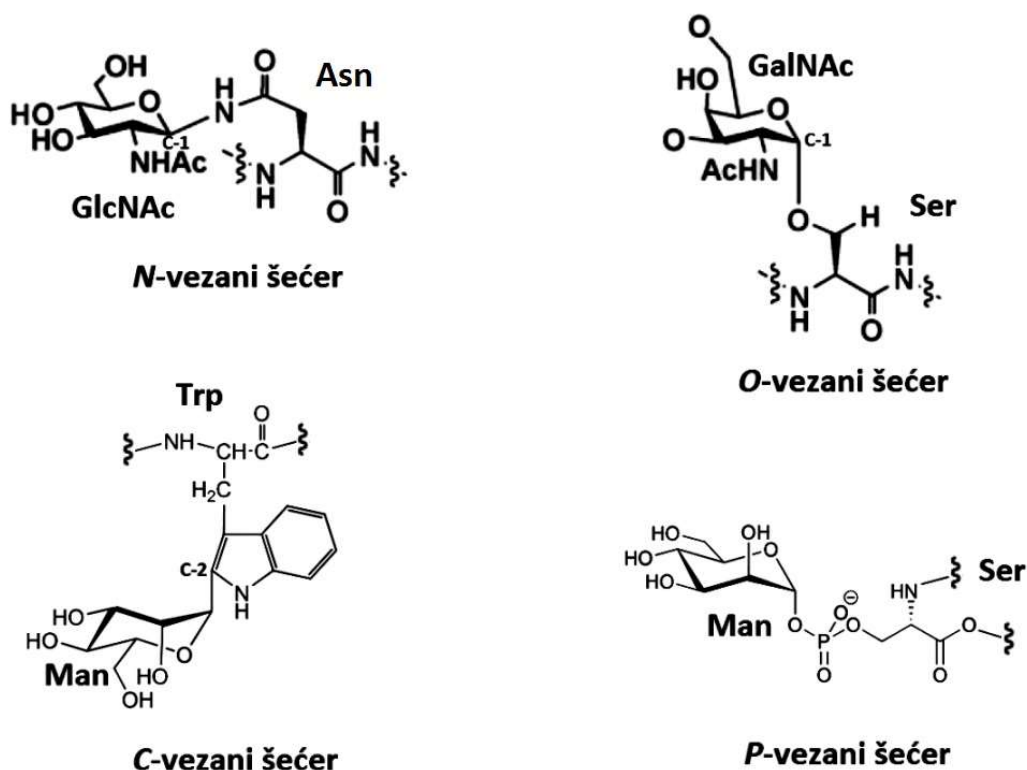
Glikozilacija je najčešća, najvažnija i najkompleksnija kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina. Prema Swiss-Prot bazi podataka, više od 50 % eukariotskih proteina,²³ kao i trećina odobrenih biofarmaceutika,²⁴ upotpunjeno je kovalentno vezanim složenim ugljikohidratima. Tipičan glikan je kompleksna molekula koja sadrži deset do 15 monosaharidnih jedinica povezanih na složeni način. Na prosječan je glikoprotein vezano dva do pet glikana, što rezultira neizmjereno kompleksnim glikoproteomom, za koji se procjenjuje da je za nekoliko redova veličine kompleksniji od samog proteoma.²⁵

Oligosaharidne strukture se na protein mogu vezati na različite načine (slika 1), stoga se definiraju sljedeće vrste glikozilacije:

- ✓ *N*-glikozilacija – *N*-acetilglukozamin na reducirajućem kraju oligosaharidnog lanca povezan je preko ugljika na položaju C-1 s aminokiselinom asparaginom unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr proteina (pri čemu je X bilo koja aminokiselina, osim prolina)²⁶
- ✓ *O*-glikozilacija – glikozidna veza nastaje između C-1 položaja reducirajućeg kraja oligosaharida i hidroksiaminokiseline, poput serina, treonina, hidroksiprolina ili hidroksilizina (na reducirajućem kraju je često *N*-acetilgalaktozamin)²⁶
- ✓ *C*-glikozilacija – naziva se još i *C*-manozilacija, a uključuje kovalentno vezanje α -manopiranoze putem C-C veze na ugljik u položaju C-2 indolnog prstena prvog triptofana unutar aminokiselinskog slijeda Trp-X-X-Trp (gdje je X bilo koja aminokiselina)²⁷
- ✓ *P*-glikozilacija – naziva se još i fosfoglikozilacijom, a karakterizirana je vezanjem oligosaharida fosfodieterskom vezom na aminokiselinu serin²⁸

Do glikozilacije proteina obično dolazi u sekrecijskom putu stanice (hrapavi endoplazmatski retikulum – Golgijev aparat – sekrecijske vezikule – izlazak iz stanice). Sekrecijski put nije ograničen samo na proteine namijenjene izlučivanju iz stanice, već dijelove toga puta koriste i proteini namijenjeni drugim staničnim odjeljcima, koji putuju kroz početne dijelove sekrecijskog puta, ali su tu zadržani.²⁹ Glikoproteini se uglavnom izlučuju ili su smješteni na staničnoj površini, premda su mnogi jezgreni i citosolni proteini također glikozilirani.

Budući da je *N*-glikozilacija proteina ljudske plazme područje interesa provedenog istraživanja, u daljnjem tekstu bit će riječi samo o toj modifikaciji.



Slika 1 Strukturni prikaz mogućih načina vezanja šećernih struktura na proteinsku okosnicu

2.2. *N*-glikozilacija proteina

2.2.1. Biosinteza *N*-glikana i kontrola kvalitete smatanja proteina

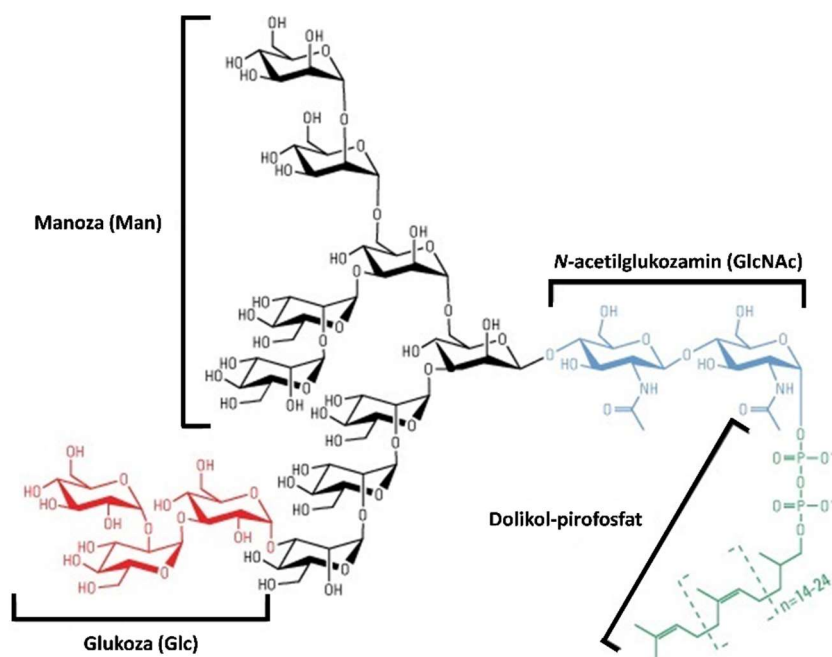
U eukariota *N*-glikozilacija započinje u endoplazmatskom retikulumu (ER), dok translacija proteina još uvijek traje. *N*-glikani se sintetiziraju iz oligosaharidnih preteča vezanih na lipidni nosač i taj je proces ključan za normalan razvoj stanice.^{26,30} Početni korak u njihovoj biosintezi uključuje uzastopno dodavanje šećernih jedinica na endoplazmatski lipid dolikol.³⁰ Dolikol je poliiizoprenoidni lipid koji sadrži dvadesetak izoprenoidnih jedinica, a sintetizira se uzastopnim dodavanjem izopentenil-difosfatnih podjedinica na farnezil-difosfat. Kako bi monosaharidi mogli poslužiti kao prekursori u sintezi glikana, moraju biti aktivirani. Najvažniji nukleotidni šećeri za sintezu oligosaharidnih preteča su UDP-glukoza i GDP-manoza, dok se svi drugi

nukleotidni šećeri, korišteni u procesu biosinteze glikana, dobivaju njihovom pretvorbom.³¹ Uz nukleotidne šećere, za sintezu preteča, koriste se i dolikol-monosaharidi. Sve glikoziltransferaze lumena endoplazmatskog retikuluma, izuzev jedne, koriste dolikol-monosaharide kao donore šećera.³²

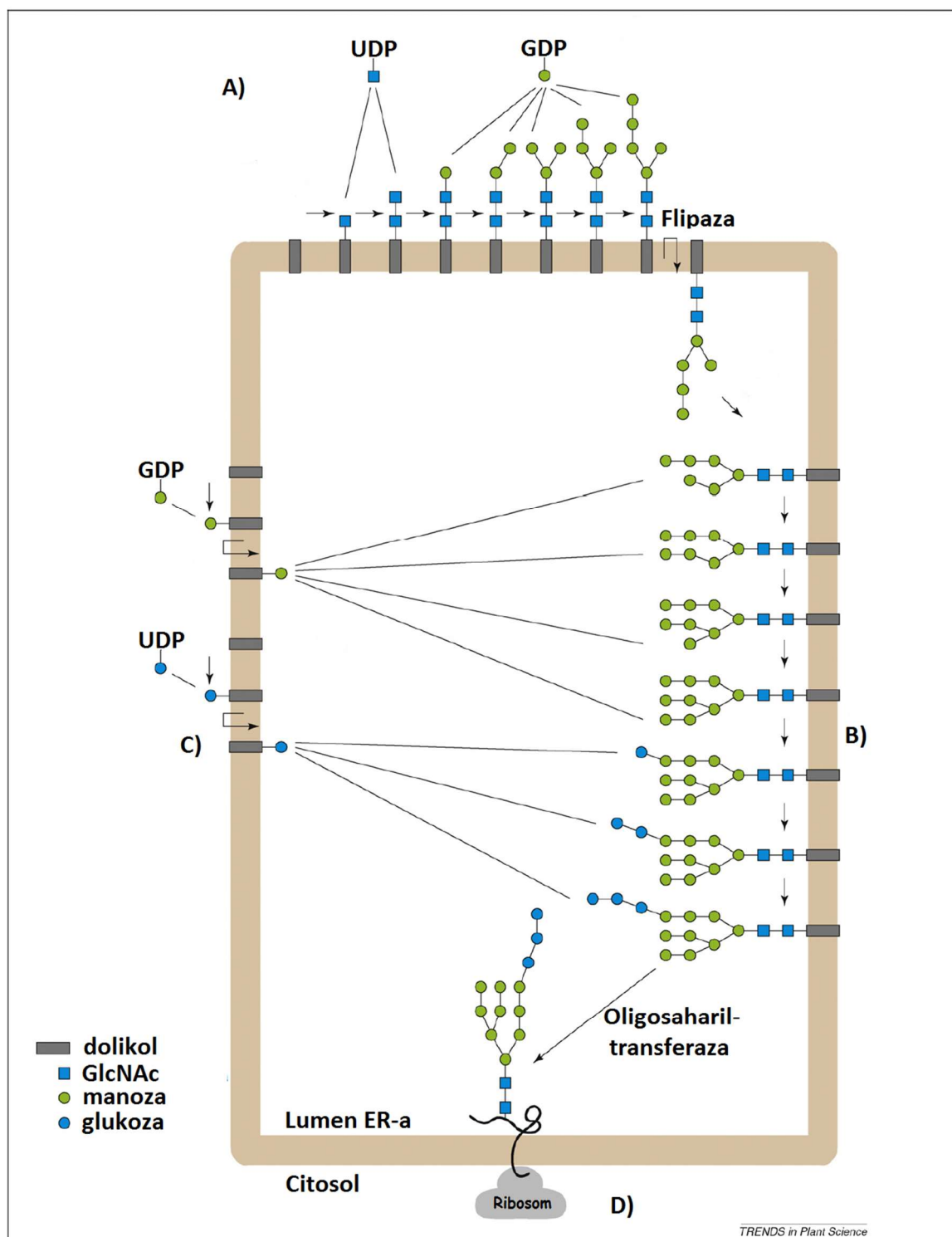
Biosintetski put *N*-glikana započinje vezanjem dva *N*-acetilglukozaminska (GlcNAc) i pet manoznih (Man) ostataka na dolikol na citoplazmatskoj strani membrane ER-a. Dobiveni sedmeročlani prekursor se prebacuje, odnosno smješta s luminalne strane ER-a pomoću enzima ATP-neovisne flipaze, gdje se vežu dodatna četiri manozna i tri glukozna (Glc) ostatka. Time se dobiva $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (slike 2 i 3), zajednički prekursor svih *N*-vezanih glikana.^{26,33}

Po završetku sinteze zajedničkog prekursora, enzim oligosaharil-transferaza (OST) prenosi nastali oligosaharid s lipidnog nosača na intaktnu jedinicu akceptorskog asparagina unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr. Potrebno je naglasiti da iako je prisutnost Asn-X-Ser/Thr slijeda nužna za *N*-glikozilaciju, prijenos *N*-glikana na ovaj slijed neće se uvijek dogoditi, zbog konformacijskih ili drugih ograničenja tijekom smatanja proteina.²⁶

Nakon vezanja prekursornog glikana $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ na proteinsku okosnicu, novonastali glikoprotein ulazi u kalneksin-kalretikulinski (CNX-CRT) ciklus (slika 4).^{26,30,33}



Slika 2 Struktura prekursora svih *N*-vezanih glikana – $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ ³⁴

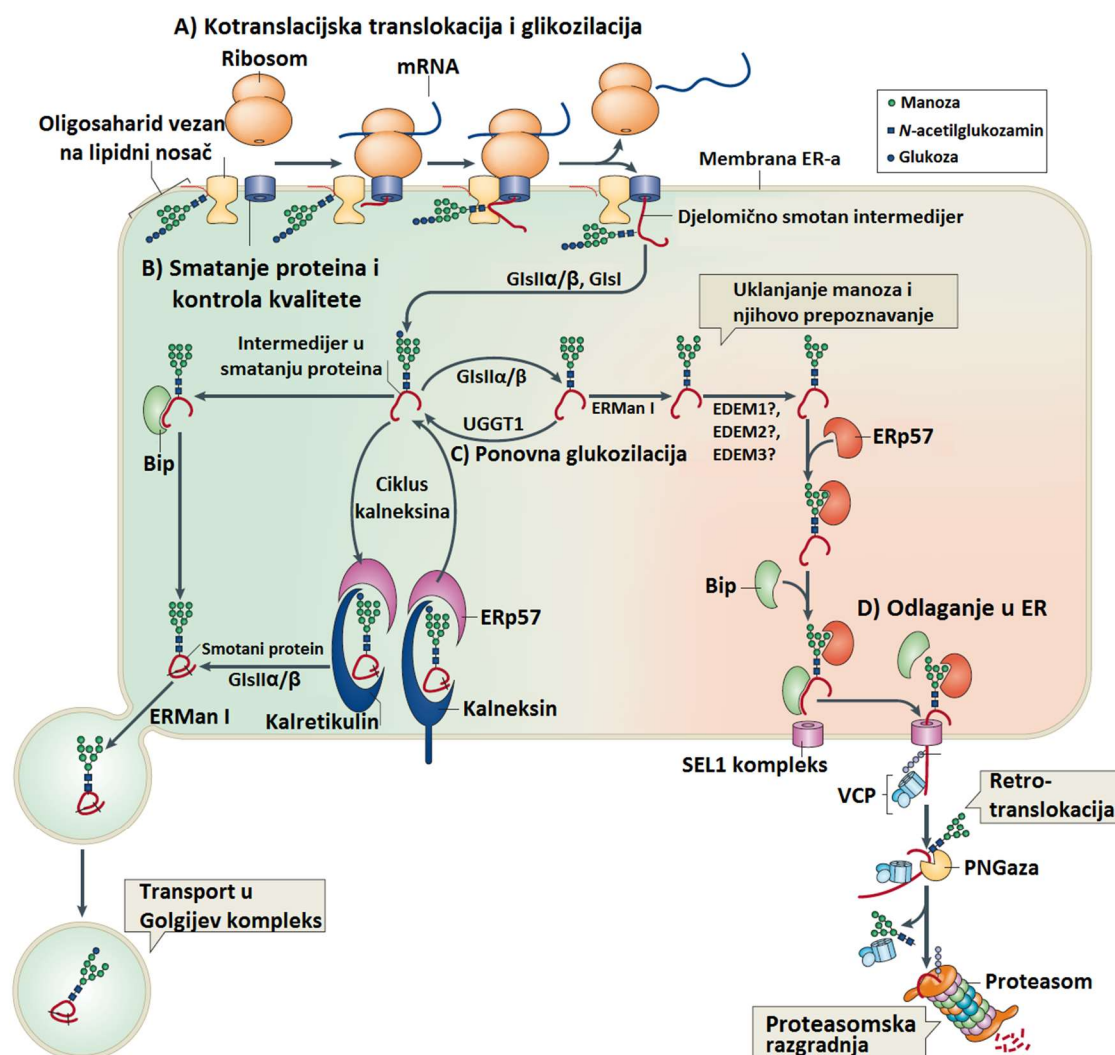


Slika 3 Sinteza i prijenos oligosaharidnog prekursora u ER-u. A) Sinteza prekursora započinje vezanjem dva *N*-acetilglukozaminska i pet manoznih ostataka na dolikol na citoplazmatskoj strani ER-a. U ovim se reakcijama kao donori koriste nukleotidni šećeri. B) Oligosaharidni prekursor se tada prebacuje preko membrane endoplazmatskog retikuluma enzimom ATP-neovisnom flipazom, te se na njega s luminalne strane dalje vežu četiri manozna i tri glukozna ostatka. C) Ove reakcije koriste dolikol-monosaharide kao donore šećera. D) Potpuni četrnaesteročlani oligosaharidni prekursor se tada prenosi na akceptorske proteine enzimom oligosaharil-transferazom. Preuzeto i prilagođeno iz Pattison i Amtmann, 2008.³³

Prvi koraci CNX-CRT ciklusa uključuju uklanjanje dva terminalna glukozna ostatka, koje kataliziraju enzimi α -glukozidaza I i II. Dobivena struktura GlcMan₉GlcNAc₂ djeluje kao ligand za membranske ili solubilne lektinske šaperone, kalneksin i kalretikulin. Lektinski su šaperoni vezani na ERp57 (protein disulfid-izomeraza A3 (PDIA3)), te štite novonastale glikoproteine od hidrofobne agregacije i neželjenog stvaranja disulfidnih veza tijekom njihovog smatanja. Iterativni ciklusi uklanjanja posljednje glukoze enzimom glukozidazom II te njenog ponovnog vezanja enzimom UDP-Glc:glikoprotein-glukoziltransferazom (UGGT1), što iznova omogućava vezanje lektinskih šaperona, potpomaže učinkovito smatanje novosintetiziranih glikoproteina u lumenu ER-a. Enzim glukozidaza II se sastoji od α -(katalitičke) i β -(lektinske) podjedinice koja omogućava interakciju sa supstratom. Međutim, ni podjedinice glukozidaze, kao ni lektini kalneksin i kalretikulin, ne prepoznaju polipeptidnu okosnicu intermedijera u procesu smatanja. Nadalje, UGGT1 specifično prepoznaje glikanske strukture u blizini nepravilno ili nepotpuno smotanih polipeptidnih struktura, te djeluje kao senzor smatanja, koji dovodi do ponovnog ulaska u kalneksin-kalretikulinski ciklus, ukoliko je protein pogrešno smotan.³⁰ Kada protein konačno poprimi ispravnu konformaciju, enzim glukozidaza II uklanja terminalni glukozni ostatak s *N*-glikana, a lektini kalneksin i kalretikulin više nisu vezani za novonastali glikoprotein, te se on sada može transportirati u Golgijev aparat (GA) na daljnju doradu.

2.2.2. Uklanjanje pogrešno smotanih proteina iz endoplazmatskog retikuluma

Osim što su odgovorne za regrutiranje šaperona prilikom smatanja proteina, glikanske strukture također definiraju i vrijeme zadržavanja novonastalog glikoproteina u endoplazmatskom retikulumu. Glikoproteini sa sporom kinetikom smatanja, uzrokovanom mutacijama ili nepotpunim sklapanjem oligomernih podjedinica, postaju mete degradacije koja je posredovana manozidazama.³⁰ Naime, endoplazmatske manozidaze uklanjaju manozne ostatke s luminalnih ili membranskih glikoproteina, čime smanjuju afinitet kalneksina i kalretikulina. U daljnjim nizvodnim procesima dolazi do premještanja terminalno pogrešno smotanih proteina u citosol te usmjeravanja njihove razgradnje putem proteasoma.³³ Opisani se proces naziva ER-povezana degradacija proteina (ERAD, engl. *ER-associated degradation*) (slika 4.D).



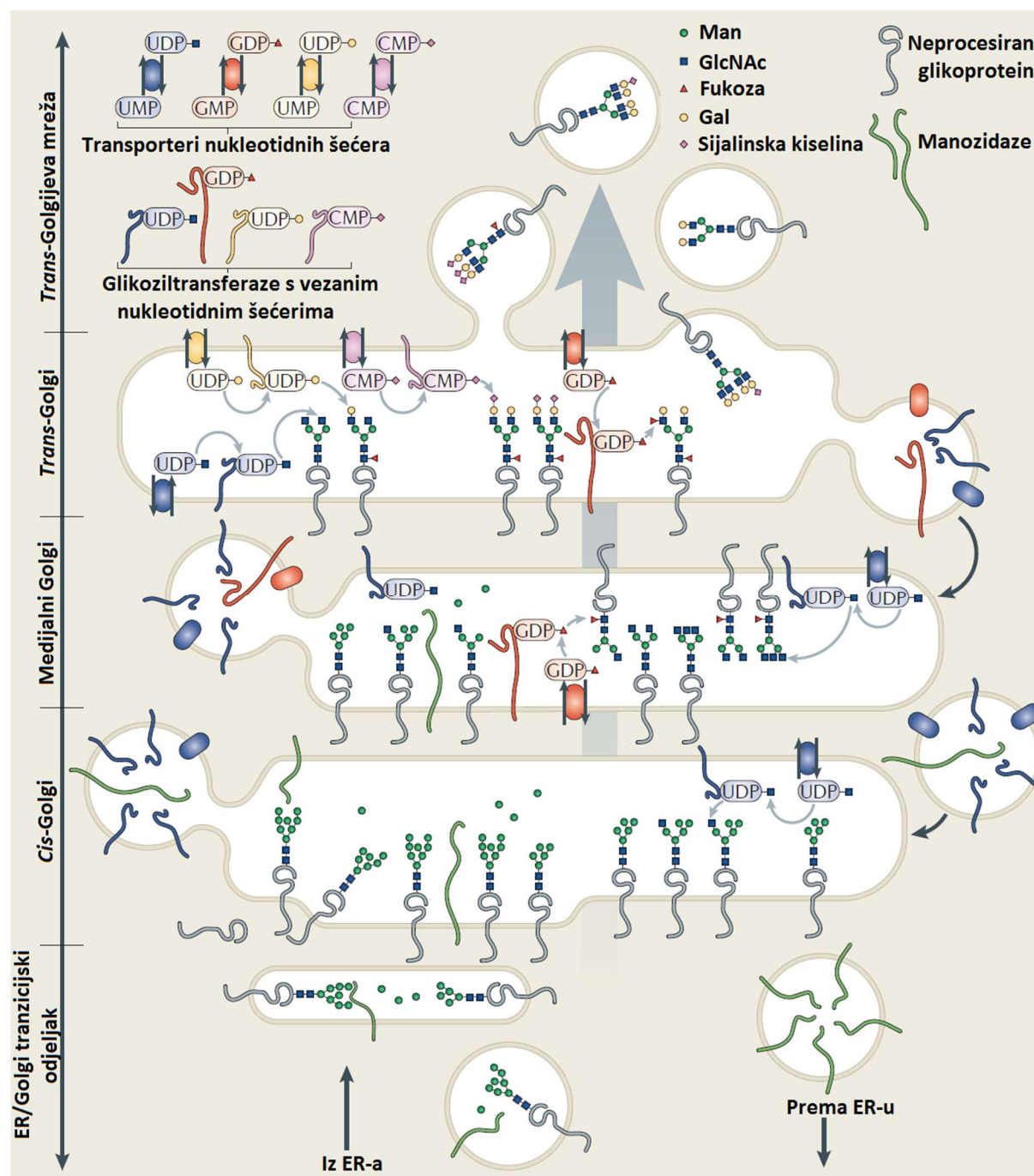
Slika 4 N-glikozilacija proteina i kontrola kvalitete smatanja proteina. A) Tijekom biosinteze glikoproteina, translaciju nascentnog polipeptidnog lanca slijedi njegova translokacija kroz poru SEC61 i istovremeni prijenos glikana s lipidnog nosača na peptidnu akceptorsku sekvencu enzimom oligosaharil-transferazom (OST). B) Skraćivanje glikana uklanjanjem terminalnih glukoznih ostataka događa se odmah nakon njihovog prijenosa, pomoću α -glukozidaze I (GIsI) i α -glukozidaze II α - β heterodimera (GIsII α / β). Intermedijeri u smatanju proteina koji sadrže strukturu Glc₁Man₉GlcNAc₂ postaju ligandi lektinskih šaperona kalneksina i kalretikulina, koji djeluju u kompleksu s disulfid-izomerazom ERp57. Disocijaciju glikoproteina i lektina slijedi daljnje uklanjanje glukoze s N-vezanog glikana. Ispravno smotani glikoproteini transportiraju se u Golgi na daljnje procesiranje. C) Nepotpuno smotane glikoproteine prepoznaje UDP-Glc:glikoprotein-glikoziltransferaza (UGGT1), koja ih ponovno glukozilira, što omogućava njihov ponovni ulazak u kalneksin-kalretikulinski ciklus. D) Terminalno pogrešno smotani glikoproteini podliježu degradaciji u ER-u putem uklanjanja manoznih ostataka enzimom ER α -manozidazom I (ERManI). Glikoproteini sa smanjenim brojem manoznih ostataka premještaju se u citosol putem kompleksa derlina 1 (DER1), potom ih deglikozilira citosolna peptid-N-glikozidaza (PNGaza), nakon čega slijedi razgradnja u proteasomu. Preuzeto i prilagođeno iz Moremen i sur., 2012.³⁰

2.2.3. Dorada *N*-glikana u Golgijevom aparatu

Dok je biosinteza *N*-glikana u endoplazmatskom retikulumu eukariota dobro očuvan proces, procesiranje *N*-glikana u Golgijevom aparatu je specifično i rezultira različitim strukturama oligosaharida vezanih za glikoproteine različitih vrsta.³⁵

Nakon napuštanja endoplazmatskog retikuluma, glikoproteini prolaze kroz Golgi, a njihovi glikani postaju predmet daljnjeg procesiranja. Općenito, samo nekoliko tipova oligomanoznih glikana bude ispoljeno na površini u potpunosti diferenciranih stanica³⁶, dok su gotovo svi ostali glikani podložni modifikacijama (uklanjanje i dodavanje šećernih ostataka) kako glikoprotein putuje kroz Golgi. Lokalizacijske studije pokazuju da su enzimi koji procesiraju glikane smješteni kroz Golgijev aparat u *cis-trans* smjeru, u skladu s uzastopnim koracima sazrijevanja glikana prilikom vertikalnog kretanja glikoproteina kroz organel (slika 5).^{37,38}

Dakle, *N*-glikane oligomanoznog tipa najprije modificira enzim α -manozidaza I (ManI), koja uklanja jedan do četiri α -1,2-manozna ostatka pretvarajući $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ u $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.²⁶ Tada započinje biosinteza kompleksnih *N*-glikana dodatkom prvog *N*-acetilglukozaminskog ostatka α -1,3-manoznoj grani $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Ovaj korak kataliziran je enzimom *N*-acetilglukozaminil-transferazom I (GlcNAcT-I), pri čemu nastaje $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. Nadalje, dva dodatna manozna ostatka se uklanjaju s $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ strukture enzimom α -manozidazom II (ManII), nakon čega slijedi prijenos vanjskog *N*-acetilglukozamina na α -1,6-manoznu granu. Ovu reakciju katalizira enzim *N*-acetilglukozaminil-transferaza II (GlcNAcT-II), pri čemu nastaje prekursor svih kompleksnih *N*-glikana.²⁶ Razgranate kompleksne strukture (triantenari i tetraantenari) dobivaju se vezanjem GlcNAc-a na α -1,3-vezanu sržnu manozu enzimom GlcNAcT-IV, te vezanjem GlcNAc-a na α -1,6-vezanu sržnu manozu enzimom GlcNAcT-V. Kompleksni *N*-glikani s račvajućim (eng. *bisecting*) GlcNAc-om dobivaju se djelovanjem enzima GlcNAcT-III, pri čemu se on veže za β -1,4-vezanu sržnu manozu.²⁶ Nadalje, kompleksni se glikani mogu i dalje dodatno modificirati dodavanjem različitih monosaharidnih jedinica.²⁶ Primjerice, vrlo je česta modifikacija vezanje α -1,6-fukoze na proksimalni GlcNAc (sržna fukoza), dok se kod nekih vrsta (primjerice kod biljaka i beskralježnjaka) fukoza može vezati i α -1,3-glikozidnom vezom. Druga česta modifikacija vezanje je monosaharidnih jedinica na terminalne *N*-acetilglukozamine, od kojih je to najčešće β -1,4-galaktoza. Na ovu se galaktozu mogu dalje uzastopno vezati GlcNAc i galaktoza, pri čemu nastaje polilaktozaminski slijed $(-3\text{-Gal-}\beta\text{-1,4-GlcNAc-}\beta\text{-1-})_n$. Također, terminalni glukozamini mogu se modificirati i dodatkom terminalnih fukoznih i galaktoznih ostataka,



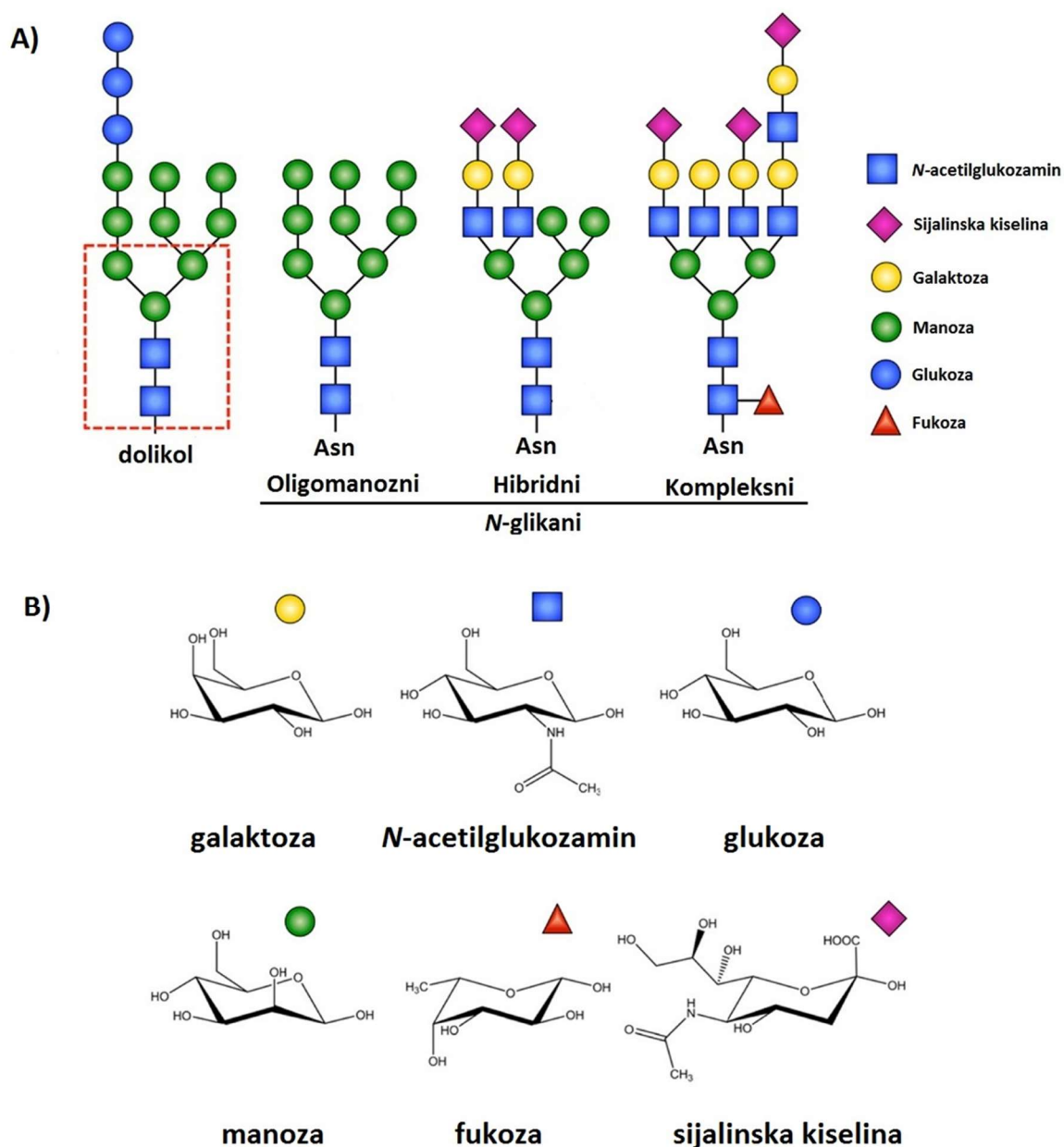
Slika 5 Razmještaj enzima koji procesiraju glikane kroz GA. Prijelazni dio ER-a te *cis* Golgi odjeljci sadržavaju manozidaze za skraćivanje oligomanoznih *N*-glikana. Medijalni odjeljci sadržavaju enzime koji započinju stvaranje kompleksnih *N*-glikana, te su odgovorni za grananje i sržnu fukozilaciju. *Trans* odjeljci sadrže enzime koji dovode do dodatnog grananja te završnih (engl. *capping*) reakcija, poput galaktozilacije, sijalinizacije, te fukozilacije na antenama kompleksnih *N*-glikana. Završne reakcije se također odvijaju i u *trans*-Golgijskoj mreži, tubulovezikularnom odjeljku koji organizira sekreciju glikoproteina te ih usmjerava na površinu specifičnih stanica. Zaključno, da bi došlo do maturacije *N*-glikana, potrebno je da se unutar iste funkcionalne podjedinice Golgijskog aparata zajedno nađu glikoproteini s vezanom odgovarajućom glikanskom strukturom, glikoziltransferaze s odgovarajućom enzimskom aktivnošću te transporter nukleotidnih šećera s odgovarajućom specifičnošću. Preuzeto i prilagođeno iz Moremen i sur., 2012.³⁰

pri čemu nastaju jedna ili dvije Gal- β -1,3-(Fuc- α -1,4)-GlcNAc antene.³⁵ Ovaj slijed poznat je pod nazivom Lewisov a antigen (Le^a epitop) i obično se nalazi na glikokonjugatima površine stanica sisavaca, gdje je uključen u procese međustaničnog prepoznavanja i adhezije. Završno dodavanje šećernih ostataka (engl. *capping*) uključuje još i vezanje *N*-acetil- ili *N*-glikolil-neuraminske kiseline (sijalinske kiseline), *N*-acetilgalaktozamina te sulfata. Ove se jedinice uglavnom vežu α -glikozidnom vezom, što omogućava njihovu interakciju s različitim medijatorima imunološkog sustava, poput protutijela i lektina.²⁶ Neki se kompleksni *N*-glikani nakon sazrijevanja u ER-u i GA-u mogu i dodatno modificirati tijekom prijenosa glikoproteina do njihovih konačnih odredišta. Primjerice, mnogi biljni vakuolarni glikoproteini i skladišni glikoproteini sjemenki glikozilirani su na sličan način – *N*-glikanima koji sadrže fukozu i/ili ksilozu, ali ne i terminalni Le^a epitop ili GlcNAc na nereducirajućem kraju.³⁵ Ovakvi tipični vakuolarni oligosaharidi nazivaju se paucimanoznim tipovima *N*-glikana, a rezultat su *post*-Golgi uklanjanja terminalnog *N*-acetilglukozaminskog ostatka s *N*-glikana kompleksnog tipa.³⁹

Međutim, važno je naglasiti da je konformacija proteina ipak najvažnija determinanta koja određuje opseg modifikacija oligosaharidnih lanaca koji su vezani na njega.⁴⁰

Zaključno, kod sisavaca se razlikuju tri glavne skupine *N*-glikana (slika 6):²⁶

- ✓ Oligomanozni *N*-glikani strukture Man₅GlcNAc₂ – Man₉GlcNAc₂; rezultat su ograničenog uklanjanja manoze i glukoze s oligosaharidnog prekursora Glc₃Man₉GlcNAc₂. Pretežno su nađeni na različitim izvanstaničnim glikoproteinima.
- ✓ Hibridni *N*-glikani: rezultat su procesiranja samo α -1,3-manozne grane oligosaharidnog intermedijera Man₅GlcNAc₂, što dovodi do nastanka oligosaharida s isključivo manoznim ostacima na α -1,6-Man ruci te jednom ili dvije antene na α -1,3-Man ruci.
- ✓ Kompleksni *N*-glikani: karakterizirani su prisutnošću α -1,3-fukoze, β -1,4-galaktoze te sijalinskih kiselina. Rezultat su procesiranja oligomanoznih glikana u GA. Uglavnom su prisutni na različitim sekrecijskim i membranskim glikoproteinima.



Slika 6 A) Reprezentativni primjeri *N*-glikanskih struktura, poredani prema složenosti s lijeva na desno. Krajnje lijevo nalazi se prekursor svih *N*-vezanih glikana, građen od 14 monosaharidnih jedinica ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$), s očuvanom sržnom strukturom (označeno crvenim isprekidanim linijama). Prekursorna struktura se kao takva prenosi s dolikola na akceptorski asparagin (Asn), kako bi se dalje modificirala u druge *N*-glikanske strukture. Povećano grananje i složenost strukture omogućuje dodatak GlcNAc-a na sržnu strukturu. B) Strukture monosaharida koji se najčešće nalaze u sastavu *N*-vezanih glikana. Preuzeto i prilagođeno iz Lyons i sur., 2015.⁴¹

2.3. Funkcije *N*-glikana

2.3.1. Fiziološke uloge *N*-glikana

Općenito, u eukariotskim stanicama *N*-glikani su izvršitelji brojnih fizioloških funkcija. Njihove uloge mogu varirati od jednostavnih strukturnih, sve do pomoći konformaciji i stabilnosti proteina, pružanja ciljnih struktura na koje se mogu vezati mikroorganizmi, toksini i protutijela, maskiranja tih istih ciljnih struktura, kontrole poluživota proteina i stanica, modulacije proteinskih funkcija te snabdijevanja liganada za specifična vezanja koja posreduju usmjeravanje proteina, interakciju stanice s matriksom te međusobne interakcije stanica.¹

Primjerice, „prekrivanje“ glikanskim strukturama mnoge glikoproteine štiti od prepoznavanja njihovog polipeptidnog dijela od strane proteaza ili protutijela. Oligosaharidne strukture također igraju važnu ulogu u inicijaciji ispravnog smatanja novonastalog glikoproteina, kao i kasnije u održavanju njegove topljivosti i stečene konformacije. *N*-glikani također mogu usmjeravati proteine prilikom njihovog razvrstavanja⁴², ili su izravno uključeni u njihovo prepoznavanje i u procese međustanične adhezije. Naime, glikoproteini su molekule koje imaju sposobnost stupanja u visokospecifične međumolekularne interakcije, kao što su fertilizacija, diferencijacija stanica i tkiva, formiranje organa te imunološke reakcije. Također mogu poslužiti i kao antigeni u imunološkim reakcijama, ili pak prikrivati neko antigensko mjesto na polipeptidnom lancu, te na taj način spriječiti imunološki odgovor. Nadalje, glikani mogu djelovati kao receptori za viruse, bakterije, parazite i različite toksine, ili, suprotno, mogu prikrivati ciljna mjesta vezanja mikroorganizama i na taj način spriječiti infekciju.¹

Kako vezanje različitih glikanskih struktura na proteine utječe na njihovu fiziološku funkciju, tako su i mnogi patološki procesi povezani s različitim tipovima glikanskih promjena.² Poremećaji regulacije glikozilacije povezani su sa širokim spektrom bolesti, uključujući rak^{3,43}, dijabetes⁴, kardiovaskularne⁵, kongenitalne⁶, imunološke⁷ i infektivne⁸ poremećaje.

2.3.2. *N*-glikani kao biljezi

Sveprisutnost glikozilacije i fundamentalna važnost *N*-glikana u gotovo svakom biološkom procesu daje im visoki potencijal kao biljezima. Gotovo 70 % plazmatskog proteoma je glikozilirano, kao i većina membranskih i sekrecijskih proteina. Kao što je već spomenuto, *N*-glikani igraju važnu ulogu u svim važnijim biološkim procesima, poput međustaničnih

interakcija te interakcija stanice s matriksom, smatanja proteina, vezanja za receptore i eliminacije proteina.²⁶

Činjenica da se glikozilacija proteina mijenja u odgovoru na različita patofiziološka stanja, primjerice tijekom progresije tumora, iskorištena je za otkrivanje glikanskih biljega. Više je studija pokazalo da fibroza jetre, ciroza i hepatocelularni karcinom mogu biti karakterizirani promijenjenom glikozilacijom proteina, od kojih je najupečatljivija promjena glikozilacije α -fetoproteina kod hepatocelularnog karcinoma.⁴⁴ Nadalje, promijenjena fukozilacija haptoglobina uočena je i kod karcinoma gušterače⁴⁵, dok je promjena glikozilacije prostata-specifičnog antigena i ukupnih serumskih glikoproteina otkrivena kod karcinoma prostate.⁴⁶

Glikani kao biljezi različitih bolesti imaju nekoliko prednosti u usporedbi s ostalim biomolekulama, poglavito proteinima:⁴⁷

- ✓ Biosinteza glikana osjetljivija je na stanja bolesti nego biosinteza proteina. Glikani su u svojoj suštini metabolički produkti koji reflektiraju i amplificiraju čak i male promjene ekspresije s njima povezanih proteina (primjerice glikoziltransferaza).
- ✓ Budući da se glikani u stanici sintetiziraju na dva mjesta, potencijalno bi svaki glikoprotein proizveden u oboljeloj stanici mogao imati abnormalnu glikozilaciju. S druge strane, abnormalni glikani ne moraju nužno potjecati iz oboljelih stanica, budući da se promjene glikozilacije mogu dogoditi i kao odgovor na bolest.⁴⁵
- ✓ S obzirom na trenutno dostupnu tehnologiju, jednostavnije je kvantificirati ekspresiju oligosaharida nego ekspresiju proteina. Oligosaharidi imaju slična kromoforna svojstva te ih je relativno jednostavno kromatografski profilirati.

Unatoč navedenim prednostima, glikom se tek nedavno počeo koristiti kao izvor biljega različitih bolesti. Napredak ovog područja bio je otežan kompleksnošću glikana i nedostatkom analitičkih metoda za razrješavanje njihovih struktura. Međutim, u današnje vrijeme dolazi do brzih promjena. Naime, zadnjih je godina uložen veliki trud u razvoj metoda baziranih na tekućinskoj kromatografiji i spektrometriji masa kao središnjim metodama za analizu glikana, pri čemu MS omogućava i strukturnu karakterizaciju glikana. S napredovanjem metodologije za profiliranje sastava i strukture glikana, potraga za novim biljezima se intenzivira.⁴⁷ Uz razvoj novih metodologija usavršavale su se i metode koje omogućuju visokoprotoknu analizu glikana.⁴⁸

Glikozilacija proteina ima značajan utjecaj na patofiziologiju brojnih bolesti, a njene specifične promjene mogu omogućiti uvid u stanje i progresiju bolesti. Nadalje, glikani su rasprostranjeni u mnogim biološkim tekućinama, uključujući serum, plazmu, slinu i suze, što omogućava razvoj neinvazivnih glikanskih biljega. Potencijalni glikanski biljeg mogao bi se jednostavno bazirati na glikanskom profilu, na razini sastava glikana, ili pak detaljnije, na analizi specifičnog glikozilacijskog mjesta proteina. Moguće je da će se u budućnosti na temelju glikanskog profila moći ne samo dijagnosticirati bolest, već i pratiti njena progresija i prognozirati ishod liječenja.^{47,49}

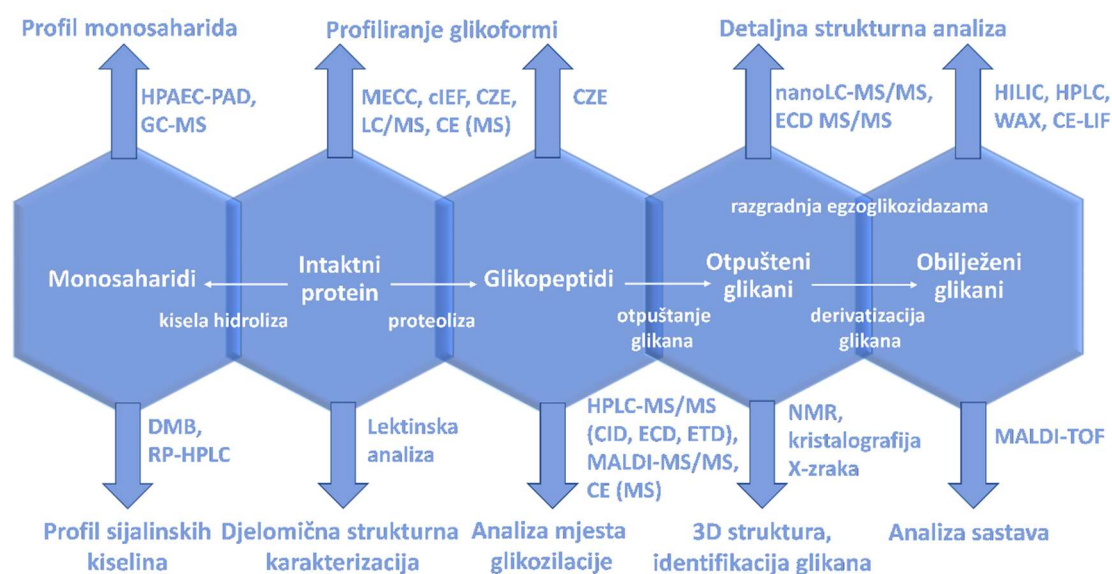
2.4. Analiza N-glikana

Otkrivanje povezanosti glikanskih struktura s njihovom funkcijom, praćenje glikozilacije u dijagnostici i prognozi bolesti, te razrješavanje molekularnih mehanizama razvoja bolesti važna su istraživačka područja. Kod provođenja takvih istraživanja od esencijalne je važnosti razvoj preciznih, osjetljivih i robustnih metoda za analizu glikana. Analitika glikana poprilično je zahtjevna, što je posljedica raznolikosti monosaharidnih struktura, sekvenci i veza, te njihovog povezivanja s drugim biomolekulama, poput peptida ili lipida.⁵⁰ Iz navedenih razloga ne postoji univerzalna metoda za brzu i pouzdanu identifikaciju glikanskih struktura, već se željene informacije mogu dobiti dobrim odabirom metode ili njihovim kombiniranjem, ovisno o postavljenom znanstvenom pitanju.

Općenito, postoje tri različita pristupa analitici glikana:⁵⁰

- ✓ Karakterizacija glikana na intaktnim glikoproteinima
- ✓ Karakterizacija glikopeptida
- ✓ Strukturna analiza kemijski ili enzimski otpuštenih glikana

Različite analitičke tehnike dostupne pri korištenju određenog pristupa shematski su prikazane na slici 7 te detaljnije opisane u tablici 1.



Slika 7 Glavni načini karakterizacije glikoproteina, glikopeptida i glikana. HPAEC-PAD – kromatografija anionske izmjene visoke djelotvornosti s pulsnom amperometrijskom detekcijom; MECC – micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija; cIEF – kapilarno izoelektično fokusiranje; CZE – kapilarna zonska elektroforeza; MALDI-MS – spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom; CE-LIF – kapilarna elektroforeza s fluorescencijom induciranom svjetlošću; HILIC – tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama; WAX – slaba anionska izmjena; RP – reverzna faza; ESI-MS/MS – tandemna spektrometrija masa s ionizacijom elektroraspršivanjem; MALDI-TOF – spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom i detektorom vremena leta; CID – disocijacija izazvana sudarom; ETD – disocijacija prijenosom elektrona; ECD – disocijacija zahvatom elektrona.

Za potrebe analize, *N*-glikani se najčešće otpuštaju s glikoproteina od interesa. Intaktni *N*-glikani se mogu otpustiti kemijski ili češće, enzimski, pomoću amidaze (peptid *N*-glikozidaza F, PNGaza F). PNGaza F cijepa vezu između sržnog GlcNAc-a i asparagina polipeptidnog lanca svih tipova *N*-glikana, osim onih koji sadrže α -1,3-fukozu vezanu za spomenuti GlcNAc (učestalo kod glikana biljaka i insekata).⁵¹ Međutim, *N*-glikani s α -1,3-vezanom sržnom fukozom mogu se otpustiti djelovanjem PNGaze A iz badema.⁵² Postoje još dva enzima koja se mogu koristiti za otpuštanje *N*-glikana s glikoproteina – endoglikozidaza D (endo D) i H (endo H). Oba enzima kidaju vezu između dva sržna GlcNAc-a, međutim, endo D ima sposobnost otpuštanja svih tipova *N*-glikana, dok endo H otpušta samo oligomanozne i hibridne *N*-glikane. Prije tretmana amidazama preporuča se provesti i denaturaciju (katkada i tripsinizaciju) glikoproteina, kako bi se povećala dostupnost *N*-glikana enzimu.

Nakon otpuštanja *N*-glikana s proteina, obično se provodi inicijalna analiza njihovog sastava, a u svrhu odlučivanja o strategiji njihove strukturne karakterizacije. Strukturna karakterizacija

glikana ne odnosi se samo na utvrđivanje sastava monosaharida i njihove sekvence, već uključuje i određivanje stereokemije svake glikozidne veze i stupnja grananja. Neke od najčešće korištenih visokoprotčnih metoda za detaljniju analizu *N*-glikana uključuju tekućinsku kromatografiju temeljenu na hidrofilnim interakcijama (HILIC, engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*) te spektrometriju masa (MS).

2.4.1. HILIC profiliranje fluorescentno obilježenih *N*-glikana

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama često je korištena metoda za razdvajanje glikana. Obično se u tu svrhu koristi kromatografija obrnutih faza⁵³ ili anionske izmjene⁵⁴ s detekcijom fluorescencije, međutim, najčešće je korištena tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama koja omogućava poboljšano razdvajanje analita.⁴⁸ Kod HILIC analize molekule se zadržavaju na koloni temeljem njihovog hidrofilnog potencijala, na osnovi razlika u svojstvima koje ovise o veličini, naboju, sastavu, strukturi, glikozidnim vezama i stupnju granjanju glikana. Glavna je prednost ove tehnike mogućnost razdvajanja strukturnih izomera, što je teško postići ostalim metodologijama.⁵⁰ S obzirom da većina glikana nema UV-apsorbirajuće ili fluoroforme skupine, potrebno ih je derivatizirati za osjetljivu detekciju. Najčešće se obilježavaju fluorescentnom oznakom, poput 2-aminobenzamida (2-AB), prokainamida, 2-aminobenzojeve kiseline (2-AA) ili 2-aminopiridina (2-AP), koji omogućavaju detekciju femtomolarnih količina glikana.^{55,56}

Od svih navedenih fluoroforma, najčešće se koristi 2-AB, budući da je kompatibilan sa značajnim brojem glikoanalitičkih metoda, poput spektrometrije masa. Prilikom obilježavanja glikana 2-AB-om, reakcija se odvija u stehiometrijskom omjeru 1:1, pri čemu se obilježavaju svi (s proteina) otpušteni glikani sa slobodnim reducirajućim krajem. Navedeno omogućava kvantitativno mjerenje relativnih količina individualnih glikana prilikom HILIC analize, kao i istovremeno odvajanje neutralnih i nabijenih glikana.⁵⁰

Glikani se mogu analizirati tekućinskom kromatografijom i nakon digestije enzimima egzoglikozidazama, koje se mogu koristiti individualno ili u nizu. Egzoglikozidaze specifično cijepaju glikozidne veze pojedinačnih monosaharidnih jedinica, krećući od terminalnog monosaharidnog ostatka.⁵² Glikanski UPLC profili, dobiveni nakon digestije egzoglikozidazama, pokazuju reproducibilne i predvidljive pomake retencijskih vremena, što omogućava detaljno razjašnjavanje glikanskih struktura.⁵³

2.4.2. Spektrometrija masa u analitici N-glikana

Spektrometrija masa se često koristi u analitici glikana, jer pruža informacije o masi i sastavu glikana. Prilikom MS analize glikani se obično trebaju derivatizirati, budući da je učinkovitost njihove ionizacije (a poglavito sijaliniziranih vrsta) niska. Stoga se glikani obično derivatiziraju redukcijom te obilježavanjem, permetilacijom ili etilesterifikacijom sijalinskih kiselina.^{57,58}

Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI) i ionizacija elektroraspršivanjem (ESI) dvije su glavne ionizacijske tehnike korištene za analizu glikana. Za brzo profiliranje glikana koristi se MALDI-MS, obično s detektorom vremena leta (TOF, engl. *time of flight*), a u svrhu dobivanja profila smjese glikana te za detekciju produkata digestije egzoglikozidazama, na način analogan UPLC analizi.⁵⁰ MALDI-TOF-MS je često prvo korištena tehnika u analizi glikana, budući da predstavlja jednostavan eksperiment s malim utroškom uzorka, a može poslužiti za procjenu raznolikosti glikana prisutnih u uzorku. Neutralni glikani se mogu bolje detektirati u pozitivnom ionizacijskom modu, obično kao $[M+Na^+]$ adukti. Budući da sijalinizirani glikani postaju nestablini prilikom ionizacije, takvi se uzorci analiziraju u negativnom ionizacijskom modu, te se obično desijaliniziraju ili derivatiziraju prije analize.⁵⁰

Ukoliko je svrha analize sekvenciranja glikana, cilj je dobiti fragmentne ione koji će upućivati na strukturu roditeljskog iona. U tu se svrhu obično koristi ESI-MS, disocijacija izazvana sudarom (CID, engl. *collision-induced dissociation*) i MS/MS. Rezultat disocijacije izazvane sudarom je kidanje glikozidnih veza, a u svrhu generiranja iona, koji će dati informacije o strukturi glikana – razlika u masi (gubitak mase) upućuje na dio glikanske strukture koji je izgubljen (disociran). ESI ionizacija može se kombinirati s velikim brojem analizatora masa, omogućavajući različite tipove glikanskih analiza. Kao i MALDI, i ESI se može koristiti u pozitivnom i negativnom ionizacijskom modu.⁵⁰

Glavni su nedostaci spektrometrije masa njena osjetljivost na prisutnost soli u analiziranom uzorku, potreba za dobivanjem dijagnostičkog fragmentacijskog spektra za izomerne i izobarne spojeve, te, u nekim slučajevima, manja osjetljivost od HILIC metode. Naposljetku, odaziv bilo kojeg analita ovisi o učinkovitosti njegove ionizacije. Ukoliko je ionizacija smanjena, to može otežati kvantifikaciju. Povezivanje spektrometrije masa s nekom separacijskom tehnikom, poput tekućinske kromatografije, značajno poboljšava njenu osjetljivost.⁵⁰

Zaključno, analiza glikana je višedimenzijski zadatak – nijedna metodologija zasebno korištena ne daje sve tražene informacije, već je potrebna primjena spregnutih tehnika za potpunu strukturnu analizu glikana.

Tablica 1 Najčešće korištene metode u analitici glikana²⁶

Naziv	Tehnika	Opis	Primjena
HPAEC-PAD	kromatografija anionske izmjene visoke djelotvornosti s pulsnom amperometrijskom detekcijom	tekućinska kromatografija ionske izmjene koja se izvodi pri visokom pH	razdvajanje, identifikacija, kvantifikacija mono- i oligo-saharida bez derivatizacije
HPLC UPLC	tekućinska kromatografija (ultra)visoke djelotvornosti	kromatografska tehnika za analitička i preparativna razdvajanja	razdvajanje svih skupina glikana, može se spregnuti s MS-om
GC	plinska kromatografija	kromatografska tehnika plinovite faze za razdvajanje hlapljivo derivatiziranih uzoraka	sastav monosaharida, analiza glikozidnih veza; obično spregnuta s MS-om
HPCE	kapilarna elektroforeza visoke djelotvornosti	kromatografska tehnika za razdvajanje nabijenih molekula	razdvajanje, identifikacija, kvantifikacija nabijenih glikana; može se spregnuti s MS-om
FACE	elektroforeza ugljikohidrata potpomognuta fluoroformom	kromatografska tehnika temeljena na gel elektroforezi za razdvajanje glikana derivatiziranih anionskim fluoroformom	razdvajanje, identifikacija, kvantifikacija obilježenih mono- i oligo-saharida
MS	spektrometrija masa	tehnika za mjerenje mase iona u plinovitoj fazi	primarna strukturna analiza biopolimera
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom	MS ionizacijska tehnika	mapiranje mase glikana i glikokonjugata; važna za glikomiku
ESI	ionizacija elektroraspršivanjem	MS ionizacijska tehnika	analiza molekularne mase i sekvence glikana; glikoproteomika
CAD-MS/MS	disocijacija izazvana sudarom spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa	tandemna MS tehnika kod koje se ioni fragmenata generiraju iz odabranog roditeljskog iona u sudaru s inertnim plinom	analiza sekvence glikana i glikokonjugata
NMR	nuklearna magnetska rezonancija	1D NMR spektroskopija	broj i anomerna konfiguracija monosaharida u glikanu

2.5. Cjelogenomske studije povezanosti

Cjelogenomske studije povezanosti (GWAS, engl. *genome-wide association studies*) genetske su studije koje određuju i analiziraju DNA sekvence ljudskog genoma s ciljem identifikacije uobičajenih genskih varijanti koje doprinose riziku razvoja određene bolesti.⁵⁹ Središnji je cilj humane genetike identifikacija genskih rizičnih faktora uobičajenih kompleksnih bolesti, poput astme, raka, dijabetesa tipa 2, bolesti krvožilnog sustava ili shizofrenije, te rijetkih monogeničkih bolesti, poput cistične fibroze ili anemije srpastih stanica. Za identifikaciju genskih rizičnih faktora koriste se mnoge različite tehnike i analitičke alatke, kojima pripada i GWAS. Krajnji je cilj GWAS-a korištenje genskih rizičnih faktora za utvrđivanje rizičnih skupina i biološke podloge podložnosti određenoj bolesti, a u svrhu razvoja preventivnih i terapijskih strategija.

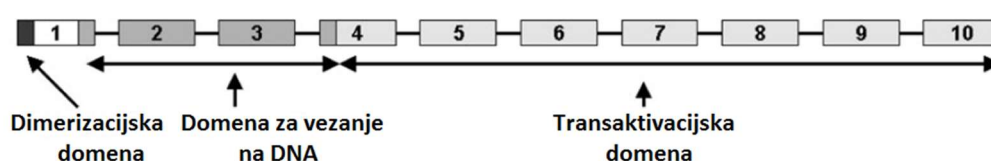
Kod provođenja cjelogenomskih studija povezanosti obično se uspoređuju dvije skupine ispitanika – osobe s određenom bolešću i usklađena kontrolna skupina zdravih ispitanika, koji se zatim genotipiziraju na većinu uobičajenih jednonukleotidnih polimorfizama (SNP, engl. *single-nucleotide polymorphism*). Točan broj SNP-ova ovisi o upotrijebljenoj tehnologiji genotipiziranja, no obično se radi o broju od milijun SNP-ova i više.⁵⁹ Zatim se za svaki identificirani SNP utvrđuje je li alelna frekvencija značajno promijenjena kod bolesnih u odnosu na zdrave ispitanike.⁶⁰ Ukoliko se utvrdi da je alelna frekvencija određenog SNP-a značajno veća kod oboljelih, ta se genska varijanta definira kao „povezana s bolešću“, što ne znači nužno da je i uzrok te iste bolesti. Katkada se genske varijante identificirane kao povezane s bolešću jednostavno nasljeđuju zajedno s kauzalnim varijantama.

Nedavno se kombiniranjem GWAS studije s visokoprotlačnom analizom glikana izvela opsežna analiza uobičajenih genskih polimorfizama koji utječu na glikozilaciju proteina.¹¹ Poznato je da je više od polovice svih proteina glikozilirano²³, međutim, zbog ograničenja u analitici glikana i nepostojanja predloška tijekom njihove biosinteze, malo se zna o kompleksnom procesu regulacije biosinteze glikana. Opisana je studija po prvi put kombinirala podatke dobivene GWAS-om i glikomskim podatke, a pokazala je da određene varijante gena *HNFLA*, čija biološka povezanost s procesom glikozilacije nije bila do tada poznata, snažno utječu na razine *N*-glikana proteina plazme. Navedeno je otkriće postavilo temelje i za istraživanje provedeno u okviru ovog doktorskog rada.

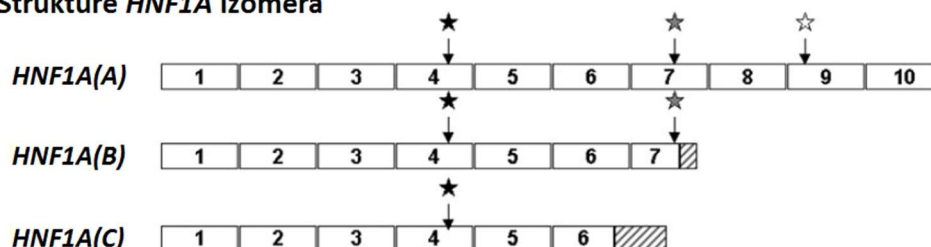
2.6. Gen *HNF1A*

Gen hepatocitni nuklearni faktor-alfa (*HNF1A*) smješten je na 12q kromosomu⁶¹, a njegov produkt pokazuje aktivnost transkripcijskog faktora (HNF1 α) i ključan je član autoregulacijske transkripcijske mreže tijekom razvoja kao i u zreloj gušterači.¹² Gen *HNF1A* sastoji se od deset eksona i kodira homeoprotein od 631 aminokiseline, koji se sastoji od dimerizacijske domene (aminokiseline 1 – 33), dvodjelne domene za vezanje DNA (homeo domena – aminokiseline 100 – 184, POU domena – aminokiseline 198 – 281) te transaktivacijske domene (aminokiseline 282 – 631).⁶² Gen *HNF1A* generira tri različita izomerna transkripta (A, B i C), koji su rezultat alternativnog prekrajavanja i poliadenilacije.⁶³ Svi su transkripti identični na 5' kraju, međutim, *HNF1A(B)* je skraćen unutar eksona 7, dok *HNF1A(C)* završava eksonom 6 (slika 8). Transaktivacijske studije pokazuju da sve tri izoforme zadržavaju aktivnost, međutim aktivnost izoformi *HNF1A(B)* i *HNF1A(C)* približno je pet puta veća od aktivnosti *HNF1A(A)*.¹² Navedene izoforme pokazuju i preokret u relativnoj ekspresiji tijekom razvoja gušterače. Naime, *HNF1A(A)* je dominantna fetalna izoforma, dok *HNF1A(B)* prevladava u gušterači odraslog čovjeka.¹² Nadalje, HNF1 α dominantno regulira funkcije diferenciranih stanica, a ne njihove razvojne procese, pa je tako odgovoran za regulaciju ekspresije brojnih gena β -stanica Langerhansovih otočića, poput gena za inzulin, piruvat-kinazu i glukozni transporter Glut2, te je važan za održavanje funkcije zrele gušterače.^{12,13} Izuzev gušterače, ekspresija gena *HNF1A* zapažena je i u crijevu, jetri i bubrezima.⁶⁴

Struktura gena *HNF1A*



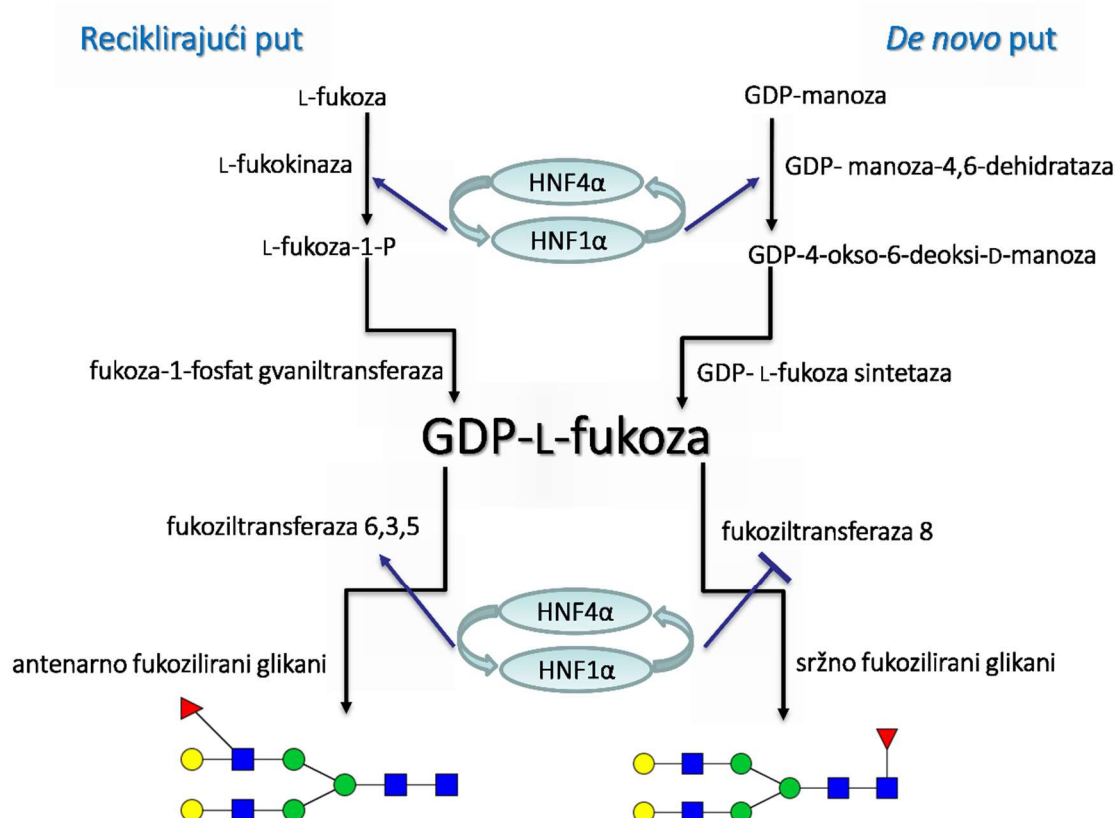
Strukture *HNF1A* izomera



Slika 8 Predviđena struktura gena *HNF1A* i njegova tri izomera. Eksoni prisutni u mRNA transkriptu označeni su bijelim pravokutnicima, a ugrađeni dijelovi introna isprekidanim pravokutnicima. Česta mjesta mutacija unutar eksona označena su zvjezdicama.

Osim spomenutih funkcija transkripcijskog faktora HNF1 α , cjelogenomska studija povezanosti pokazala je da je uključen i u procese glikozilacije plazmatskih proteina, što ranije nije bilo poznato.¹¹ Naime, pokazano je da HNF1 α uzvodno regulira nekoliko ključnih gena uključenih u različite stadije fukozilacijskog puta (slika 9). Dakle, HNF1 α regulira ekspresiju gena za fukokinazu i GDP-manoza-4,6-dehidratazu (GMDS). Ova dva enzima uključena su u reciklirajući i *de novo* biosintetski put L-fukoze, supstrata koji koriste i sržne i antenarne fukoziltransferaze.⁶⁵ Sinteza fukoze korak je koji određuje brzinu fukozilacije kod eukariota i prokariota⁶⁶, stoga HNF1 α povećanjem njene produkcije, povećava i njenu dostupnost glikozilacijskoj mašineriji. Uz navedeno, HNF1 α direktno regulira ekspresiju i nekoliko fukoziltransferaznih (FUT) gena – naime, aktivira fukoziltransferaze uključene u antenarnu fukozilaciju, dok suprimira fukoziltransferazu VIII, odgovornu za sržnu fukozilaciju. Na ovaj način HNF1 α smanjuje utrošak GDP-fukoze za sržnu fukozilaciju i dodatno povećava njenu dostupnost antenarnim fukoziltransferazama. Zaključno, postulirano je da je uloga HNF1 α i njegovog transkripcijskog kofaktora HNF4 α esencijalan dio akutnog odgovora na infekciju kod ljudi, budući da je antenarna fukozilacija nužna za vezanje E-, L- i P-selektina na njihove glikoproteinske ligande na ciljnim stanicama te posljedičnu inicijaciju upale.

Kod ljudi, heterozigotne mutacije gena *HNF1A* najčešći su uzrok dijabetesa mladih koji se javlja u odrasloj dobi (MODY). Funkcionalne mutacije gena *HNF1A* vrlo su penetrativne; 63 % nositelja razvije dijabetes do 25. godine života, 93,6 % do 50., a 98,7 % do 75. godine.⁶⁷ Do 2013. godine zabilježeno je ukupno 414 različitih mutacija gena *HNF1A* unutar 1247 obitelji. Najčešće su *missense* mutacije (54,7 %), a zatim slijede mutacije pomaka okvira čitanja (21,7 %), *nonsense* (9,4 %), mutacije mjesta prekrajanja primarnog transkripta (8,7 %), mutacije u promotorskoj regiji (1,9 %), delecije, insercije i duplikacije aminokiselina (2,4 %) te parcijalne ili delecije cijelog gena (1,2 %).¹⁴ Navedene mutacije locirane su po cijelom *HNF1A* genu, međutim, najčešće se pronalaze u eksonima 2 i 4 (0,33 odnosno 0,28 mutacija po nukleotidu), a najrjeđe u eksonima 5 i 10 (0,11 i 0,07 mutacija po nukleotidu). Nadalje, do 2013. godine pronađeno je ukupno 114 polimorfizama i varijanti nepoznatog značaja (VUS, engl. *variant of unknown significance*). Ova brojka uključuje i 21 nesinonimnu supstituciju aminokiseline, koje nisu patogene mutacije kauzalne za MODY, međutim, barem je petero njih povezano s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2.¹⁴ Nadalje, često se prilikom dijagnostičkog genskog testiranja identificiraju nove heterozigotne varijante nepoznate patogenosti, koje je potrebno okarakterizirati, pa na taj način broj *HNF1A* varijanti kontinuirano raste.



Slika 9 HNF1 α je u središtu regulacije fukozilacije proteina. Shematski prikaz regulacije puteva uključenih u biosintezu fukoze putem HNF1 α i HNF4 α . Preuzeto i prilagođeno iz Lauc i sur., 2010.¹¹

2.7. Dijabetes mladih koji se javlja u odrasloj dobi (MODY)

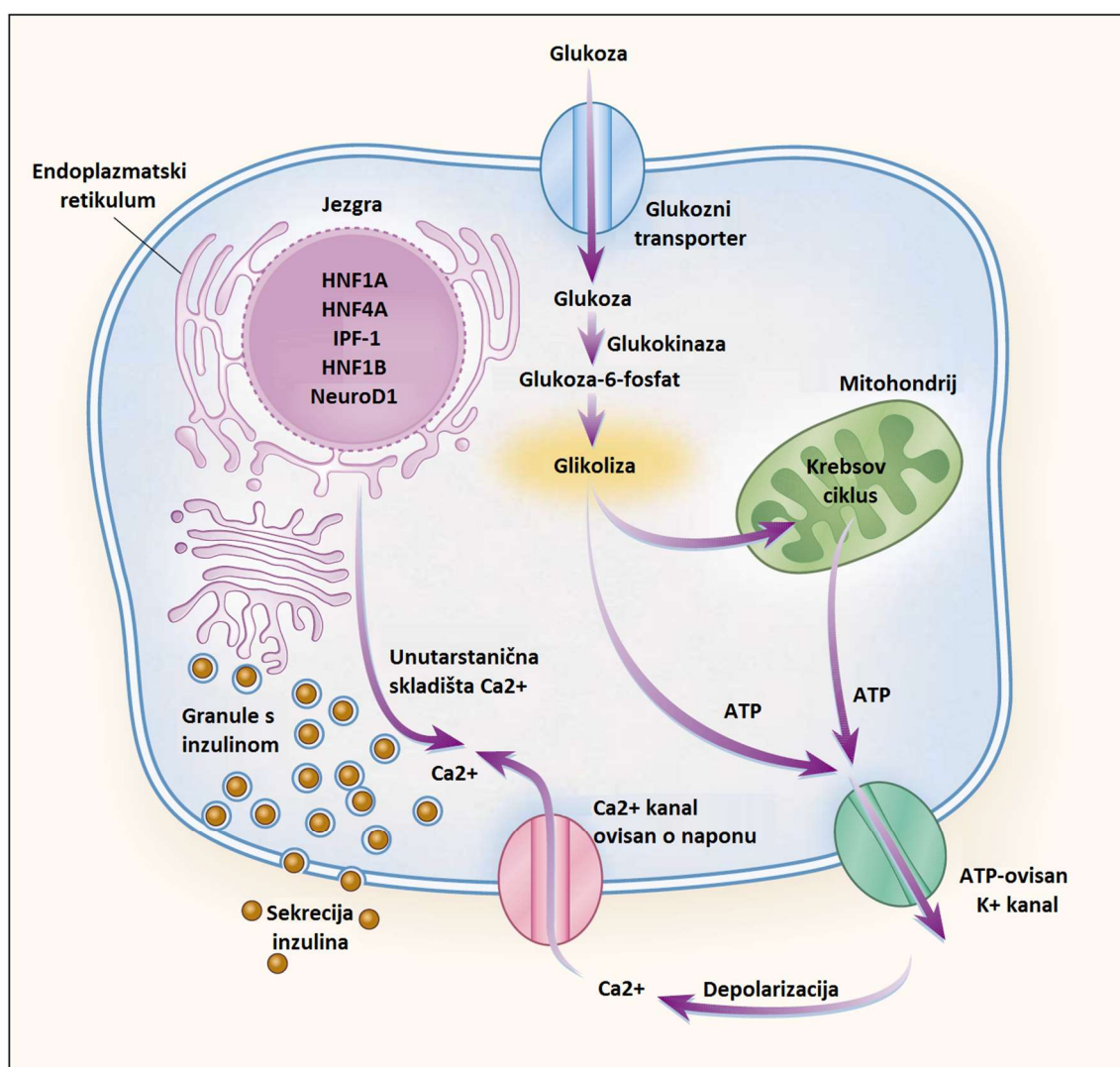
MODY (engl. *maturity onset diabetes of the young*) heterogena je skupina monogenetskog dijabetesa, uzrokovanog disfunkcijom β -stanica gušterače. Općenito je karakteriziran ranim nastupom bolesti (10. – 45. godina života), autosomno-dominantnim nasljeđivanjem, kontinuiranom endogenom produkcijom inzulina, odsutnošću autoimunosti na β -stanice, odsutnošću znakova inzulinske rezistencije te progresivnim propadanjem funkcije β -stanica, što je posljedica nemogućnosti prikladnog povećanja inzulinske sekrecije u odgovoru na hiperglikemiju.^{12,67} Dosada je identificirano 13 različitih gena odgovornih za MODY fenotip (tablica 2), međutim, neki od njih se u kliničkoj praksi sreću vrlo rijetko.⁶⁸

Tablica 2 Kliničke i molekularne karakteristike podtipova MODY-a. Preuzeto iz Kim, 2015.⁶⁸

MODY gen*	Kromosomska lokacija	Učestalost (% MODY-a)	Patofiziologija	Druge karakteristike
<i>HNF4A</i>	20q13	5-10	Disfunkcija β -stanica	Neonatalna hiperinzulinemija, niska razina triglicerida
<i>GCK</i>	7p13	30-50	Disfunkcija β -stanica (osjetljivost na Glc)	Hiperglikemija od rođenja
<i>HNF1A</i>	12q24	30-70	Disfunkcija β -stanica	Glukozurija
<i>PDX1/IPF1</i>	13q12	<1	Disfunkcija β -stanica	Homozigoti: ageneza gušterače
<i>HNF1B</i>	17q12	5-10	Disfunkcija β -stanica	Anomalije bubrega i genitalija, hipoplazija gušterače
<i>NEUROD1</i>	2q31	<1	Disfunkcija β -stanica	Nastup dijabetesa u odrasloj dobi
<i>KLF11</i>	2p25	<1	Disfunkcija β -stanica	Sličan dijabetesu tipa 2
<i>CEL</i>	9q34	<1	Endo- i egzokrini defekt gušterače	Egzokrina insuficijencija, lipomatoza
<i>PAX4</i>	7q32	<1	Disfunkcija β -stanica	Moguća ketoacidoza
<i>INS</i>	11p15	<1	Mutacija gena za inzulin	Moguć stalni neonatalni dijabetes (ND)
<i>BLK</i>	8p23	<1	Defekt sekrecije inzulina	Prekomjerna težina, defekt sekrecije inzulina
<i>ABCC8</i>	11p15	<1	Disfunkcija K^+ kanala ovisnog o ATP-u	Homozigoti: stalni ND; heterozigoti: prolazni ND
<i>KCNJ11</i>	11p15d	<1	Disfunkcija K^+ kanala ovisnog o ATP-u	Homozigoti: ND

*HNF4A – hepatocitni nuklearni faktor 4 α ; GCK – glukokinaza; PDX1 – pankreasni i duodenalni *homeobox* 1; IPF1 – inzulin promotor faktor 1; NEUROD1 – neurogena diferencijacija 1; KLF11 – *Kruppel-like* faktor 11; CEL – karboksiester lipaza; PAX4 – *paired-box-containing* gen 4; INS – inzulin; BLK – B-limfocitna kinaza; ABCC8 – ATP-vezujuća kazeta, porodica C (CFTR/MRP), član 8; KCNJ11 – kalijev kanal, porodica J, član 11.

Svi geni navedeni u tablici 2 eksprimirani su u β -stanicama, a mutacija bilo kojeg od njih dovodi do disfunkcije β -stanica i razvoja dijabetesa (slika 10). Navedeni geni također su eksprimirani i u drugim tkivima pa se neke abnormalnosti mogu uočiti, primjerice, i u funkciji jetre i bubrega (samo kod nekih oblika MODY-a).⁶⁹ Faktori koji utječu na inzulinsku osjetljivost, poput infekcija, puberteta, trudnoće ili pretilosti, mogu okinuti nastup dijabetesa i povećati težinu hiperglikemije u pacijenata s MODY-em, međutim, negenski čimbenici obično nemaju važnu ulogu u razvoju ove bolesti. Prema procjenama, 2 – 5 % svih pacijenata s dijabetesom boluje od monogenetskog oblika dijabetesa.⁷⁰



Slika 10 Model β -stanice gušterače te patofiziološki mehanizmi defekata β -stanice koji dovode do monogenetskog dijabetesa. Zahvaćeni mogu biti različiti fiziološki procesi unutar β -stanice, počevši od ulaska glukoze putem Glut2 transportera, fosforilacije glukoze enzimom glukokinazom ili glikoliza. Disfunkcija K^+_{ATP} kanala interferira sa sekrecijom inzulina, dok insuficijencija transkripcijskih faktora smještenih u jezgri dovodi do nukleopatija. Preuzeto i prilagođeno iz Fajans i sur., 2001.⁶⁹

2.7.1. *HNF1A-MODY*

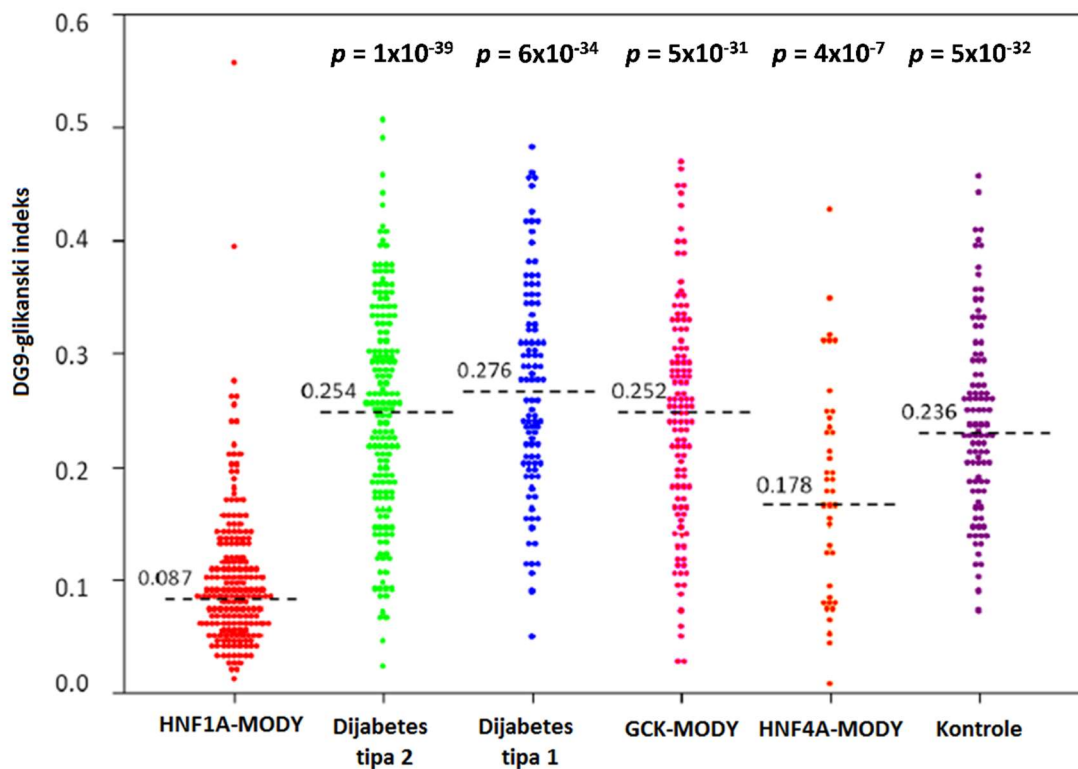
Najčešći oblik MODY-a kod odraslih pacijenata posljedica je mutacija u genu *HNF1A*, čija je biološka uloga objašnjena u poglavlju 2.6. Pacijente oboljele od HNF1A-MODY-a karakteriziraju prethodno opisani simptomi monogenetskog dijabetesa, a uz to imaju i smanjeni renalni prag za glukozu (što je posljedica smanjene ekspresije glukoznog transportera SGLT2 u proksimalnim tubulima).^{67,71} Većina pacijenata također ne pokazuje znakove inzulinske rezistencije i njihov je BMI u normalnom rasponu.

HNF1A-MODY se u 80 % slučajeva pogrešno dijagnosticira kao dijabetes tipa 1 ili tipa 2⁷², zbog neuklapanja kliničke slike pacijenata u trenutno korištene dijagnostičke kriterije, slabe osviještenosti liječnika u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (o postojanju monogenetskog oblika dijabetesa), nedostatka općeprihvaćenih dijagnostičkih protokola ili nedostupnosti genskog testiranja.^{67,73} Definitivna dijagnoza postavlja se sekvenciranjem gena *HNF1A*, međutim i dalje ostaje izazov utvrđivanja patogenosti pronađenih alelnih varijanti. Također, takav je pristup trenutno preskup za široku i neselektivnu primjenu.

Kakogod, točnost dijagnoze od izuzetne je važnosti, budući da pacijenti s HNF1A-MODY-em dobro reagiraju na terapiju oralnim antidijabeticima iz skupine sulfonilureja, što za neke znači i prekid dotadašnje terapije inzulinom, te porast kvalitete života.^{18,74} Lijekovi iz skupine glinida također pokazuju sličan mehanizam djelovanja, te se mogu koristiti kao alternativna terapija.⁷⁵ Nadalje, uspostavljanje točne dijagnoze donosi i dodatne prednosti, primjerice, brzu i pravovremenu identifikaciju ostalih zahvaćenih članova obitelji, omogućavajući na taj način bolje praćenje nastupa, a potom i tretmana bolesti.

S ciljem poboljšanja dijagnostike HNF1A-MODY-a dosad je ispitano više serumskih biljega.^{20,76} Nadalje, otkriveno je da rijetke varijante gena *HNF1A*, koje rezultiraju gubitkom funkcije (patogene varijante), dovode, između ostalog, i do značajnih promjena *N*-glikoma proteina plazme.²¹ Predloženi glikanski indeks, koji predstavlja omjer antenarno fukoziliranih i nefukoziliranih triantenara, uspješno razlikuje pacijente s HNF1A-MODY-em od ostalih oblika dijabetesa i zdravih kontrola, što ga čini potencijalno uspješnim dijagnostičkim biljekom (slika 11). Međutim, opisana studija koristila je dobro definirane skupine pacijenata, poznatih dijagnoza, temeljenim na kliničkim, biokemijskim i molekularnim ispitivanjima, što gotovo nikad nije slučaj u stvarnim kliničkim uvjetima. Kako bi se procijenila stvarna klinička vrijednost glikanskog biljega, potrebno je ispitati njegovu učinkovitost klasifikacije na neselektiranoj populaciji pacijenata s nastupom dijabetesa u ranoj odrasloj dobi i dokazanom

endogenom produkcijom inzulina te s odsutnošću znakova autoimunosti na β -stanice, što je i glavni cilj ovog doktorskog rada.



Slika 11 Točkasti histogram koji prikazuje uspješnost DG9-glikanskog indeksa u razlikovanju različitih oblika dijabetesa i zdravih kontrola. Preuzeto i prilagođeno iz Thanabalasingham i sur., 2013.²¹

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Ispitanici

Ispitanici koji su sudjelovali u ovom istraživanju uključeni su putem projekta „Fukozilacija proteina u dijagnostici dijabetesa mladih koji se javlja u odrasloj dobi“, financiranog od Europske zaklade za istraživanje dijabetesa. Uključivanje pacijenata provedeno je u Hrvatskoj i u Velikoj Britaniji. Hrvatski pacijenti uključivali su se putem Nacionalnog registra osoba sa šećernom bolešću (CroDiab) u prostorima Sveučilišne klinike za dijabetes, endokrinologiju i metaboličke bolesti Vuk Vrhovac u Zagrebu. CroDiab predstavlja registar oboljelih od dijabetesa uspostavljen kako bi se poboljšala zdravstvena skrb, utvrdila prevalencija i incidencija dijabetesa i njegovih komplikacija, te kako bi se pratio morbiditet i mortalitet na nacionalnoj razini.⁷⁷ U istraživanje je uključeno 477 hrvatskih pacijenata. Engleski pacijenti uključivani su putem studije „Dijabetes mladih u Oxfordu“, koja okuplja sedam lokalnih bolničkih centara za dijabetes i više centara primarne zdravstvene zaštite okruga Thames Valley. U ovu je studiju uključeno 553 engleskih pacijenata, što rezultira brojkom od ukupno 1 030 uključenih ispitanika u vremenskom razdoblju od lipnja 2013. do lipnja 2015. godine.

Uključni kriteriji za sudjelovanje u studiji bili su sljedeći: dob iznad 18 godina, nastup dijabetesa prije 45. godine života, dokazana endogena produkcija inzulina (C-peptid $\geq 0,2$ nmol L⁻¹), te odsutnost znakova β -stanične autoimunosti (negativna ICA (engl. *islet cell antibody*) i GAD (engl. *glutamic acid decarboxylase*) protutijela). Svakom pacijentu uzeti su uzorci plazme i pune krvi, zabilježeni su klinički podatci (dob, nastup dijabetesa, obiteljska anamneza, trenutna terapija) i provedeni bazični biokemijski testovi (HbA1c, glukoza natašte, markeri renalne funkcije, lipidogram). Svim pacijentima s C-peptid pozitivnim i neautoimunim dijabetesom izmjeren je hsCRP, analiziran N-glikanski profil te sekvenciran gen *HNF1A*. Kod pacijenata s pronađenim mutacijama u studiju su uključeni i dostupni članovi obitelji, a u svrhu praćenja kosegregacije identificirane mutacije s dijabetesom.

Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, a studiju su odobrila Etička povjerenstva Kliničke bolnice Merkur, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Sveučilišne bolnice u Oxfordu. Studija je provedena u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

3.2. Materijali

3.2.1. Standardne kemikalije

2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-propanol (Merck), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (DHB) (Sigma-Aldrich), acetonitril (Sigma-Aldrich), agaroza (Sigma-Aldrich), borna kiselina (Sigma-Aldrich), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), etidijev bromid (Boehringer Mannheim), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma-Aldrich), formijatna kiselina (HCOOH) (Merck), igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), kloridna kiselina (HCl) (Merck), magnezijev klorid (MgCl_2) (Sigma-Aldrich), natrijev dodecil-sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Acros Organics), natrijev hidroksid (NaOH) (Merck), natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba), octena kiselina (CH_3COOH) (Merck), otopina amonijaka (Merck), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (Sigma-Aldrich).

3.2.2. Enzimi

α -1-2,3,4,6-fukozidaza iz goveđih bubrega (BKF) (Prozyme), α -1-2,3,6-manozidaza iz graha (JBM) (Prozyme), α -1-3,4-fukozidaza iz badema (AMF) (New England Biolabs), β -1-3,4-galaktozidaza iz goveđih testisa (BTG) (Prozyme), β -N-acetilheksozaminidaza, rekombinantna iz *Streptococcus pneumoniae* (GUH) (Prozyme), DNA-polimeraza *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems), DNA-polimeraza iz komercijalnog kompleta *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), egzonukleaza I (New England Biolabs), peptid-N-glikozidaza F (PNGaza F) (Promega), proteaza (Qiagen), sijalidaza A, rekombinantna iz *Arthrobacter ureafaciens* (ABS) (Prozyme), termosenzitivna alkalna fosfataza (TSAP) (Promega).

3.2.3. Nukleinske kiseline i nukleotidi

DNA standard (engl. *DNA ladder*) (New England Biolabs), dNTP (smjesa dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Applied Biosystems), ddNTP (smjesa fluorescentno obilježanih ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) (Applied Biosystems), početnice gena *HNFLA* za lančanu reakciju polimeraze (Eurofins MWG Operon), M13 početnice za dvosmjerno sekvenciranje gena *HNFLA* (Eurofins MWG Operon).

3.2.4. Komercijalni kompleti

QIAamp DNA Mini Kit za izolaciju i pročišćavanje genomske DNA iz pune krvi (Qiagen), *Big Dye Terminator Sequencing Mix v1.1* za bidirekionalno sekvenciranje (Applied Biosystems).

3.2.5. Pločice za pripremu i pročišćavanje uzoraka

ABgene PCR pločice s 96 jažica (Thermo Scientific), *GHP Acroprep* 0,20 µm filter pločica s polipropilenskom membranom (Pall), *GHP Acroprep* 0,45 µm filter pločica s polipropilenskom membranom (Pall), *Omega 10k MWCO Acroprep* filter pločica s polietersulfonskom membranom (Pall), *Performa DTR* gel filtracijska pločica (Edge Biosystems), pločice s 96 jažica za sakupljanje uzoraka (Waters).

3.2.6. Kromatografske kolone i pločice za nanošenje uzoraka

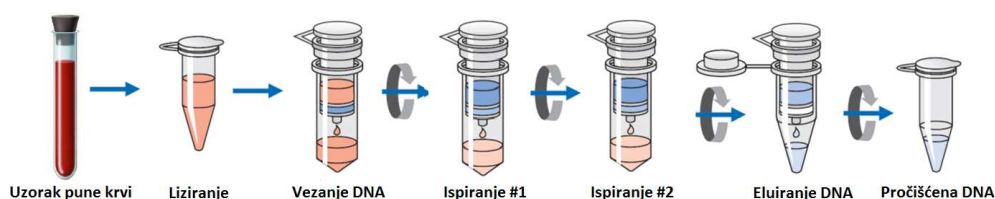
Acquity UPLC Glycan BEH amidna kolona, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm (Waters), *Inertsil Amide EX-Nano* kapilarna kolona, 100 Å, 3 µm, 0,1 mm x 150 mm (GL Sciences), *MTP AnchorChip 384 T F* MALDI pločica za nanošenje uzoraka (Bruker Daltonik).

3.3. Metode

3.3.1. Metode umnažanja i sekvenciranja DNA

3.3.1.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz uzoraka pune krvi korištenjem *QIAamp DNA Mini Blood* kompleta, prema proizvođačevom protokolu (slika 12).⁷⁸ Ukratko, za izolaciju DNA koriste se kolone sa silikatnom membranom koja selektivno veže DNA, dok se ostala prateća onečišćenja uklanjaju uzastopnim ispiranjem kolone. Pročišćena DNA se potom eluira pomoću vode ili pufera s niskom koncentracijom soli ($c(\text{Tris}) = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{EDTA}) = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$). Uzroci pročišćene DNA čuvani su na -20°C do daljnjeg korištenja.



Slika 12 Shematski prikaz izolacije i pročišćavanja genomske DNA iz uzorka pune krvi.⁷⁸

3.3.1.2. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija izolirane i pročišćene genomske DNA određena je mjerenjem apsorancije pomoću uređaja *Nanodrop ND-8000* (Thermo Scientific). Prilikom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije DNA, korišten je volumen od 2 μL uzorka, a apsorancija je mjerena na valnoj duljini od 260 nm. Konačna koncentracija DNA izračunata je iz dobivenog apsorpcijskog spektra i odnosa pri kojem 50 μg čiste DNA ima $A_{260} = 1$.

Nadalje, iz dobivenog apsorpcijskog spektra procijenjena je i čistoća uzorka DNA, pomoću omjera apsorancija A_{260}/A_{280} , gdje se omjer od $\sim 1,8$ smatra zadovoljavajućim. Ukoliko je dobiveni omjer znatno niži, to upućuje na prisutnost onečišćenja u uzorku, kao što su proteini ili fenol.

3.3.1.3. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze

Genomska DNA umnožena je lančanom reakcijom polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) korištenjem *forward* i *reverse* početnica za svih 10 eksona gena *HNFI1A*. Sve PCR reakcije izvedene su u visokoprotlačnom formatu, odnosno u pločici s 96 jažica. Reakcijska smjesa ukupnog volumena od 12,5 μL sadržavala je 2,5 μL DNA ($\gamma = 15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), 0,04 μL DNA polimeraze *AmpliTaQ Gold* (5 U μL^{-1}) i 1 μL pripadajućeg pufera, 1 μL smjese dNTP-ova, 0,04 μL *forward* i *reverse* početnica za odgovarajući ekson *HNFI1A* gena te 0,6 μL MgCl_2 ($c = 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ za eksone 1, 3, 4 i 10, odnosno $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$ za eksone 2, 5, 6, 7 i 8). Reakcija se provodila u uređaju *PTC-225 Peltier Thermal Cycler* (MJ Research) kroz 35 ciklusa (jedino za ekson 9 kroz 45 ciklusa) denaturacije, sparivanja početnica i produljivanja DNA lanca. PCR produkt skladišten je na -20°C do daljnjeg korištenja.

3.3.1.4. Agarozna gel-elektroforeza i vizualizacija gelova

Kako bi se potvrdilo odgovarajuće umnažanje DNA od interesa, provedena je agarozna gel-elektroforeza za svaki amplikon. Agarozni gel ($\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$) pripremljen je otapanjem 5 g agaroze u 250 mL 1 x TBE pufera (c (Tris) = 89 mmol L^{-1} , c (EDTA) = 2 mmol L^{-1} , c (borna kiselina) = 89 mmol L^{-1} , titrirano kloridnom kiselinom do $\text{pH} = 8,3$), zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Nakon otapanja agaroze, otopina je ohlađena na $\sim 60^\circ\text{C}$ te je u nju dodano 5 μL etidijevog bromida. Otopina je prenesena u kadicu za izvođenje elektroforeze s tri češlja od 32 zubaca. Uzorak svakog PCR produkta volumena od 5 μL pomiješan je s 5 μL Orange G pufera za nanošenje uzorka (Sigma-Aldrich) i nanešen na gel. U sve tri početne jažice nanešeno je 5 μL DNA standarda (razlike po 100 bp). Elektroforeza je provedena u puferu za

elektroforezu (1 x TBE), u vremenu od 30 min pri 110 V. Gel je vizualiziran na uređaju *Chemi-Doc MP* (Bio-Rad Laboratories) korištenjem programa *Image Lab* (Bio-Rad Laboratories).

3.3.1.5. Pročišćavanje PCR produkta

Kako bi se uklonile neugrađene početnice i dNTP-ovi, dobiveni PCR produkti tretirani su egz nukleazom I ($20\,000\text{ U mL}^{-1}$) i termosenzitivnom alkalnom fosfatazom ($100\text{ U }\mu\text{L}^{-1}$) u volumnom omjeru 1:1. Volumen od $2\text{ }\mu\text{L}$ PCR produkta pomiješan je s $1\text{ }\mu\text{L}$ smjese enzima, te je reakcija provedena na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vremenu od 30 min, a potom je izvršena deaktivacija oba enzima zagrijavanjem uzorka na $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u periodu od 15 min.

3.3.1.6. Sekvenciranje gena od interesa

Sekvenciranje svih umnoženih eksona gena *HNF1A* provedeno je Sangerovom metodom sekvenciranja DNA u Laboratorijima za istraživanje dijabetesa Sveučilišta u Oxfordu. Ova se tehnika temelji na selektivnoj ugradnji fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida (ddNTP) enzimom DNA-polimerazom tijekom *in vitro* replikacije DNA.⁷⁹ Reakcija sekvenciranja provedena je korištenjem smjese *Big Dye Terminator Sequencing Mix v1.1*, koja se sastoji od fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida, neobilježenih deoksinukleotida i DNA-polimeraze. Reakcijska smjesa ukupnog volumena od $10\text{ }\mu\text{L}$ sadržavala je $3\text{ }\mu\text{L}$ pročišćenog PCR produkta, $0,25\text{ }\mu\text{L}$ *Big Dye Terminator Sequencing* smjese, $1,875\text{ }\mu\text{L}$ *Big Dye* pripadajućeg pufera, $2\text{ }\mu\text{L}$ M13 *forward* i *reverse* početnica za bidirekionalno sekvenciranje i $2,875\text{ }\mu\text{L}$ ultračiste vode. Reakcija sekvenciranja provedena je u uređaju *PTC-225 Peltier Thermal Cycler* (MJ Research) kroz 25 ciklusa denaturacije, sparivanja početnica i produljivanja DNA lanca. Dobiveni produkti sekvenciranja razrijeđeni su s $5\text{ }\mu\text{L}$ ultračiste vode, te su prenešeni na *Performa DTR* gel-filtracijsku pločicu, a u svrhu pročišćavanja DNA od pratećih onečišćenja, poput neugrađenih početnica, dNTP-ova i soli. Pločica je centrifugirana 5 min na 850 g , a eluat skupljen u čistu PCR pločicu, ukoncentriran sušenjem na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ u periodu od 90 min, te u konačnici resuspendiran u $10\text{ }\mu\text{L}$ ultračiste vode. Konačno čitanje DNA sekvence izvedeno je na *ABI 3730* DNA analizatoru (Applied Biosystems) s 48 kapilara, a dobiveni elektroferogrami analizirani su programom *Mutation Surveyor v5.1* (Soft Genetics).

3.3.1.7. Procjena patogenosti pronađenih rijetkih varijanti gena *HNF1A*

Potencijal za uzrokovanje bolesti pronađenih varijanti procijenjen je uzimajući u obzir kliničke karakteristike pacijenata, kosegregaciju dijabetesa i pronađene varijante kod zahvaćenih

članova obitelji, te *in silico* analizom nesinonimnih varijanti koristeći programe *SIFT* (*Sorting Intolerant from Tolerant*), *PPH2* (*Polyphen 2*) i *Provean* za predviđanje njihove tolerancije. Učinak na prekrajanje procijenjen je korištenjem programa *Human Splicing Finder* i *MaxEntScan*. Procijenjena je i učestalost identificiranih rijetkih varijanti gena *HNF1A* u javno dostupnim bazama podataka o 60 706 eksoma iz *Exome Sequencing Aggregation Consortium* (ExAC, Broad Institute; <http://exac.broadinstitute.org>) i *T2D-GENES* studije (<http://www.type2diabetesgenetics.org/projects/t2dGenes>), čiji su ispitanici pacijenti s dijabetesom tipa 2 i zdrave kontrole. Općenito, ukoliko je pronađena varijanta prisutna u općoj populaciji neke od navedenih baza, to upućuje da nije kauzalna za MODY, premda nije nemoguće da je i neki pacijent s HNF1A-MODY-em bio uključen u navedene studije. Za varijante nepoznate patogenosti pretraženi su literaturni podatci te su ispitane funkcionalnim studijama.

3.3.2. Metode analize N-glikana ukupnih proteina plazme

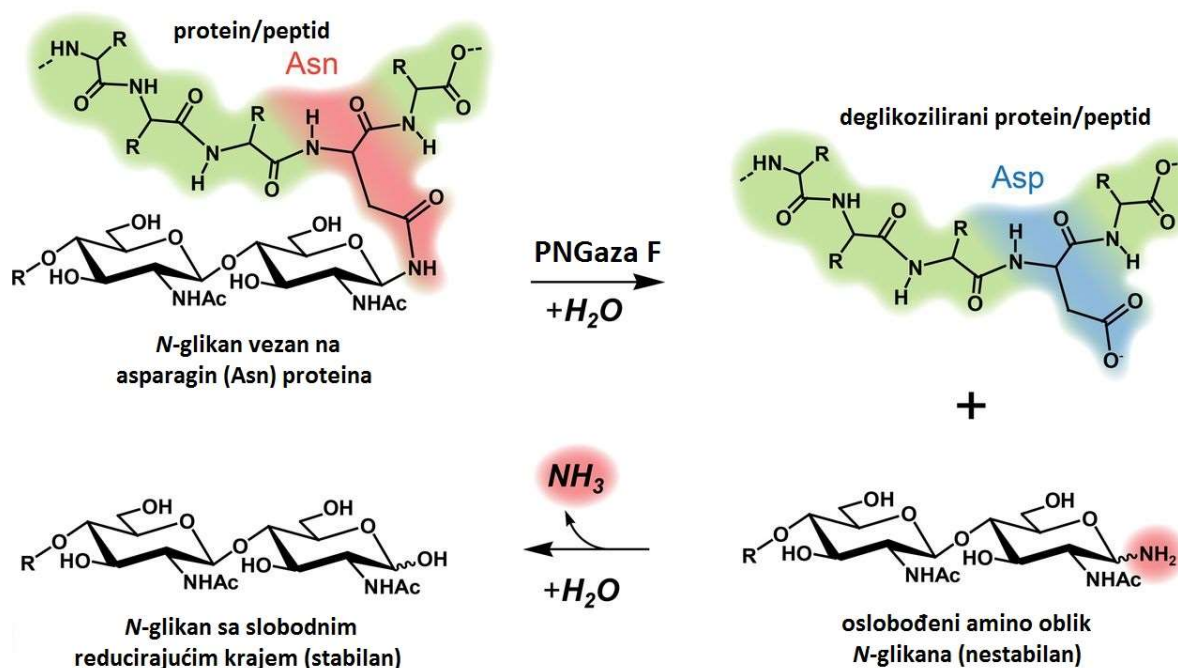
3.3.2.1. Denaturacija i deglikozilacija ukupnih proteina plazme

Postupak je izveden u visokoprotlačnom formatu, korištenjem pločica s 96 jažica, prema utvrđenom protokolu.⁸⁰ Uzorak plazme svakog ispitanika ($V = 10 \mu\text{L}$) denaturiran je dodatkom $20 \mu\text{L}$ SDS-a ($\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$) i povišenom temperaturom (inkubacija od 10 min pri 65°C). Uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min te je svakom od njih dodano $10 \mu\text{L}$ detergenta igepala CA-630 ($\varphi = 4 \%$), kako bi se deaktivirao suvišak SDS-a, a pločica je uz protresanje inkubirana na sobnoj temperaturi u periodu od 15 min. Ukupni proteini plazme deglikozilirani su dodatkom $1,2 \text{ U PNGase F}$ u $10 \mu\text{L}$ $5 \times \text{PBS-a}$ ($c(\text{NaCl}) = 685 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{KCl}) = 13,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 9 \text{ mmol L}^{-1}$, titriran s NaOH do $\text{pH} = 7,4$). PNGaza F cijepa N-glikozidnu vezu proksimalnog GlcNAc-a glikana i asparagina proteinske okosnice mehanizmom prikazanim na slici 13. Reakcija otpuštanja N-glikana provedena je preko noći na temperaturi od 37°C .

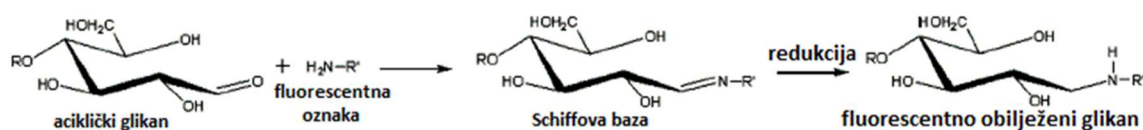
3.3.2.2. Fluorescentno obilježavanje i pročišćavanje otpuštenih N-glikana

Otpušteni N-glikani derivatizirani su fluorescentnom bojom 2-aminobenzamidom (2-AB), reakcijom reduktivne aminacije (slika 14). Smjesa za obilježavanje sastojala se od 2-AB-a ($\gamma = 19,3 \text{ g L}^{-1}$) i reducensa 2-pikolin borana (2-PB) ($\gamma = 44,8 \text{ g L}^{-1}$) otopljenih u smjesi ledene octene kiseline i DMSO-a ($\psi = 70 : 30$). Svakom uzorku dodano je po $25 \mu\text{L}$ smjese za obilježavanje,

nakon čega je slijedila inkubacija od 2 h na 65 °C, kako bi se provela reakcija obilježavanja. Po završetku inkubacije uzorke je potrebno pročistiti od pratećih onečišćenja, poput proteina, suviška fluorescentne boje, reducensa i ostalih reagensa. U tu se svrhu koristi tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama uz ekstrakciju na čvrstoj fazi (HILIC-SPE, engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography – solid phase extraction*). Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi (~ 30 min), svakom uzorku dodano je 700 µL acetonitrila (ACN) (konačni udio $\varphi = 96 \%$) te su uzorci aplicirani na *GHP Acroprep* 0,20 µm filter pločicu. Prethodno se filter pločica pripremila ispiranjem s 200 µL etanola ($\varphi = 70 \%$) i 200 µL ultračiste vode (po jažici), a zatim se u posljednjem koraku uravnotežila dodatkom 200 µL ACN-a ($\varphi = 96 \%$). U svakom se od ovih koraka otapalo uklonilo primjenom vakuuma na uređaju *Vacuum Manifold* (Pall). Nakon nanošenja na filter pločicu, svaki uzorak ispran je pet puta s 200 µL ACN-a ($\varphi = 96 \%$). U završnom koraku slijedila je elucija glikana s membrane filter pločice. Elucija glikana provela se u dva istovjetna koraka; u svaku jažicu dodano je po 100 µL vode, pločica je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi uz protresanje, a eluat je prikupljen centrifugiranjem kroz 5 min pri 164 g u *Eppendorf 5840* centrifugi (Eppendorf) u pločicu za skupljanje uzoraka. Dobiveni pročišćeni *N*-glikani skladišteni su na – 20 °C do daljnje upotrebe.



Slika 13 Shematski prikaz enzimske otpuštanja *N*-glikana peptid-*N*-glikozidazom F. Preuzeto i prilagođeno iz Wang i sur., 2014.⁸¹



Slika 14 Mehanizam obilježavanja glikana fluorescentnom oznakom u reakciji reduktivne aminacije

3.3.2.3. Razgradnja *N*-glikana sijalidazom

Razgradnja *N*-glikana sijalidazom provedena je kako bi se uklonila interferencija sijalinskih kiselina na kromatografsko razdvajanje *N*-glikana i povećala preciznost mjerenja. Enzim sijalidaza A uklanja terminalnu α -2–3,6,8,9-vezanu *N*-acetilneuraminsku kiselinu. Od svakog uzorka pročišćenih i fluorescentno obilješanih *N*-glikana dobivenih u prethodnom koraku uzet je alikvot od 100 μL i ukoncentriran sušenjem u vakuum koncentratoru *SpeedVac SC210* (Thermo Scientific). Potom je svaki osušeni uzorak resuspendiran u 7 μL vode te mu je dodan 1 μL sijalidaze A (5 U mL^{-1}) i 2 μL 5x pufera za sijalidazu ($c(\text{Na}_3\text{PO}_4) = 250 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,0$), a reakcijska smjesa inkubirana je preko noći na 37°C . Po završenoj desijalinizaciji enzim se iz reakcijske smjese uklonio pomoću *Omega 10k MWCO Acroprep* filter pločice. Prije nanošenja uzoraka pločica je isprana s 200 μL acetonitrila ($\varphi = 50\%$) i 200 μL vode (po jažici). Otapalo se u svim koracima uklonilo primjenom vakuuma. Svakom se desijaliniziranom uzorku dodalo dva puta po 50 μL vode te je prebačen na 10 kDa filter pločicu, a filtrat skupljen u pločicu za skupljanje uzoraka. Filter pločica je u zadnjem koraku isprana sa 100 μL vode, a filtrat skupljen u istu pločicu za skupljanje uzoraka. Dobiveni pročišćeni i desijalinizirani glikani ($V_{uk} = 200 \mu\text{L}$) ukoncentrirani su sušenjem u vakuum koncentratoru te resuspendirani u 100 μL vode, kako bi se dobila približno početna koncentracija glikana (prije desijalinizacije).

3.3.2.4. Analiza *N*-glikana tekućinskom kromatografijom

Fluorescentno obilješani *N*-glikani (netretirani i desijalinizirani) analizirani su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC).⁴⁸ Navedena analiza provedena je na uređaju *Waters Acquity UPLC H Class* (Waters), sastavljenim od modula za upravljanje otapalima (QSM, engl. *quaternary solvent manager*), modula za upravljanje uzorcima (SM, engl. *sample manager*) i fluorescencijskog (FLR) detektora, a uređaj je bio pod nadzorom programa *Empower 2, 2145* (Waters). Uzorci su pripremani miješanjem s acetonitrilom ψ (uzorak : ACN) = 25 : 75, konačnog volumena $V = 50$

μL , od čega je injektirano $40 \mu\text{L}$. Obilježeni su *N*-glikani bili razdvajani na amidnoj *BEH Glycan* koloni, duljine 150 mm , unutarnjeg promjera $2,1 \text{ mm}$, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$. Pokretnu fazu činio je amonijev formijat (HCOONH_4) ($c = 100 \text{ mM L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,4$) kao otapalo A i acetonitril kao otapalo B, a razdvajanje je provedeno uz linearni gradijent otapala (tablica 3) pri protoku od $0,561 \text{ mL min}^{-1}$ tijekom 25 min . Uzorci su održavani na temperaturi od $5 \text{ }^\circ\text{C}$ prije injektiranja, dok je razdvajanje na koloni provedeno na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Fluorescentno obilježeni glikani detektirani su pri valnoj duljini ekscitacije i emisije za 2-AB ($\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 428 \text{ nm}$).

Kromatografski sustav kalibriran je korištenjem vanjskog standarda hidroliziranih i fluorescentno obilježenih oligomera glukoze (2-AB obilježenim dekstranom), pri čemu su retencijska vremena glikana prevedena u glukozne jedinice (GU, engl. *glucose unit*). Svaki kromatogram obradio se automatskom metodom integriranja, nakon čega je manualno ispravljen kako bi se osigurala ujednačenost integriranja. Kromatogrami netretiranih *N*-glikana ukupnih proteina plazme razdvojeni su na 42 kromatografska pika, unutar kojih su glikanske strukture prethodno određene i poznate (tablica 4).⁸² Kromatogrami desijaliniziranih *N*-glikana razdvojeni su na 32 kromatografska pika, unutar kojih glikanske strukture nisu poznate, a čije je određivanje provedeno unutar ovog doktorskog rada. Relativna količina glikana unutar svakog pika izražena je kao postotak ukupne površine svih integriranih pikova.

Tablica 3 Gradijent otapala za HILIC-UPLC profiliranje *N*-glikana ukupnih proteina plazme

Vrijeme (min)	Protok (mL min^{-1})	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
00,00	0,561	30	70
01,47	0,561	30	70
24,81	0,561	47	53
25,50	0,250	100	0
27,00	0,250	100	0
28,00	0,250	30	70
31,50	0,561	30	70

Tablica 4 *N*-glikom ukupnih proteina plazme

Kromatografski pik	Broj strukture	GU*	Struktura glikana**
GP1	1	5,78	A2B
	2	5,78	A1[3]G1
	3	5,88	FA2
GP2	4	6,18	M5
	5	6,24	FA2B
	6	6,24	FA1[6]G1
	7	6,24	A2[6]G1
	8	6,38	FA1[3]G1
	9	6,38	A2[3]G1
GP3	10	6,55	A2[6]BG1
GP4	11	6,71	A2[3]BG1
	12	6,71	FA2[6]G1
	13	6,71	M4A1G1
GP5	14	6,84	FA2[3]G1
GP6	15	6,95	FA2[6]BG1
GP7	16	7,08	FA2[3]BG1
	17	7,08	M6 D1 ili D2
	18	7,08	M6 D3
GP8	19	7,20	A1[3]G1S[3]1
	20	7,20	A2G2
GP9	21	7,38	A1[3]G1S[6]1
	22	7,38	A2BG2
GP10+11	23	7,62	M5A1G1
	24	7,62	FA2G2
	25	7,62	A2[3]G1S[3]1
	26	7,62	A2[3]G1S[6]1
	27	7,62	FA1G1S[3]1
	28	7,62	FA1G1S[6]1
GP12	29	7,76	FA2BG2
	30	7,76	M7 D3
	31	7,76	A2[6]BG1S[3]1
	32	7,76	A2[6]BG1S[6]1
GP13	33	7,92	A2[3]BG1S[3]1
	34	7,92	A2[3]BG1S[6]1
	35	7,92	FA2[6]G1S[3]1
	36	7,92	FA2[6]G1S[6]1
	37	7,92	M4A1G1S[3]1
	38	7,92	M4A1G1S[6]1
	39	7,92	M7 D1
GP14	40	8,03	FA2[3]G1S[3]1
	41	8,03	FA2[3]G1S[6]1
	42	8,03	FA2[6]BG1S[3]1
	43	8,03	FA2[6]BG1S[6]1
	44	8,20	FA2[3]BG1S[3]1
	45	8,20	FA2[3]BG1S[6]1
GP15	46	8,38	A2G2S[3]1
	47	8,38	A2G2S[6]1
	48	8,38	A3G3

Kromatografski pik	Broj strukture	GU*	Struktura glikana**
GP16	49	8,53	A2BG2S[3]1
	50	8,53	A2BG2S[6]1
GP17+18	51	8,63	M5A1G1S[3]1
	52	8,63	M5A1G1S[6]1
	53	8,63	FA3G3
	54	8,63	M8 D2, D3
	55	8,63	A2G2S[3]1
	56	8,80	FA2G2S[3]1
	57	8,80	FA2G2S[6]1
	58	8,80	M8 D1, D3
GP19	59	9,02	FA2BG2S[3]1
	60	9,02	FA2BG2S[6]1
GP20+21	61	9,21	A2F1G2S[3]1
	62	9,21	A2F1G2S[6]1
	63	9,21	A2G2S[3,3]2
	64	9,21	A2G2S[3,6]2
	65	9,21	FA2G2S[3,3]2
GP22	66	9,43	A3G3S[3]1
	67	9,43	A3G3S[6]1
	68	9,43	M9
GP23	69	9,62	A3BG3S[3]1
	70	9,62	A3BG3S[6]1
	71	9,62	A2G2S[3,3]2
	72	9,62	A2G2S[3,6]2
	73	9,62	A2G2S[6,6]2
GP24	74	9,79	FA3G3S[3]1
	75	9,79	FA3G3S[6]1
	76	9,79	FA3BG3S[3]1
	77	9,79	A2BG2S[3,3]2
	78	9,79	A2BG2S[3,6]2
	79	9,79	A2BG2S[6,6]2
GP25	80	10,04	A3F1G3S[3]1
	81	10,04	FA2G2S[3,3]2
	82	10,04	FA2G2S[3,6]2
	83	10,04	FA2G2S[6,6]2
GP26	84	10,17	FA2BG2S[3,3]2
	85	10,17	FA2BG2S[3,6]2
	86	10,17	FA2BG2S[6,6]2
	87	10,17	A2F1G2S[3,3]2
	88	10,17	A2F1G2S[3,6]2
	89	10,17	A2F1G2S[6,6]2
	90	10,17	M9Glc
GP27+28	91	10,31	A3G3S[3,3]2
	92	10,31	A3G3S[3,6]2
	93	10,31	A3G3S[6,6]2
	94	10,43	A3BG3S[3,3]2
	95	10,43	A3BG3S[3,6]2
	96	10,43	A3BG3S[6,6]2
GP29	97	10,60	A4G4S[3]1
	98	10,77	FA3G3S[3,3]2

Kromatografski pik	Broj strukture	GU*	Struktura glikana**
GP30	99	10,77	FA3G3S[3,6]2
	100	10,77	FA3G3S[6,6]2
	101	10,77	A3G3S[3,3]2
	102	10,96	A3G3S[3,3,3]3
	103	10,96	A3F1G3S[3,3]2
GP31	104	10,96	A4G4S[6]1
	105	11,14	A3G3S[3,3,6]3
	106	11,14	A3G3S[3,6,6]3
	107	11,14	A3BG3S[3,3,3]3
	108	11,14	A3BG3S[3,3,6]3
GP32	109	11,14	A3BG3S[3,6,6]3
	110	11,28	FA3G3S[3,3,3]3
GP33	111	11,28	FA3BG3S[3,3,3]3
	112	11,54	A4G4S[3,6]2
	113	11,54	A3G3S[3,3,3]3
	114	11,54	A3G3S[3,3,6]3
	115	11,54	A3G3S[3,6,6]3
	116	11,54	A3G3S[6,6,6]3
	117	11,72	A3BG3S[3,3,3]3
	118	11,72	A3BG3S[3,3,6]3
GP34	119	11,72	A3BG3S[6,6,6]3
	120	11,89	FA3G3S[3,3,3]3
	121	11,89	FA3G3S[3,3,6]3
	122	11,89	FA3G3S[3,6,6]3
GP35	123	11,89	FA3G3S[6,6,6]3
	124	12,03	A3G3S[3,3,3]3
	125	12,03	A3G3S[3,3,6]3
	126	12,03	A3G3S[3,6,6]3
	127	12,03	A3F1G3S[3,3,3]3
	128	12,03	A3F1G3S[3,3,6]3
	129	12,03	FA3BG3S[3,3,3]3
	130	12,03	FA3BG3S[6,6,6]3
GP36	131	12,15	A4G4S[3,3,3]3
	132	12,15	A3F1G3S[3,6,6]3
GP37	133	12,33	A4G4S[3,3,6]3
	134	12,33	A4G4S[3,6,6]3
GP38	135	12,48	A4F1G3S[3,3,3]3
	136	12,48	A3F2G3S[3,3,3]3
	137	12,48	A4F1G3S[3,3,6]3
	138	12,48	A4F1G3S[3,6,6]3
GP39	139	12,67	A3F2G3S[3,3,6]3
	140	12,67	A4F2G3S[3,3,3]3
	141	12,67	A4F2G3S[3,3,6]3
	142	12,67	A4G4S[3,3,3,3]4
	143	12,78	A4G4S[3,3,3,3]4
GP40	144	12,96	A4G4S[3,3,3,6]4
GP41	145	13,27	A4G4S[3,3,3,6]4
	146	13,27	A4G4S[3,3,6,6]4
	147	13,27	A4G4S[3,6,6,6]4
	148	13,47	A4G4S[3,3,3,3]4

Kromatografski pik	Broj strukture	GU*	Struktura glikana**
GP42	149	13,47	FA4G4S[3,3,3,3]4
	150	13,47	FA4G4S[3,3,3,6]4
	151	13,47	A4BG4S[3,3,6,6]4
	152	13,82	A4F1G4S[3,3,3,3]4
	153	13,82	A4F1G4S[3,3,3,6]4
	154	13,82	A4F1G4S[3,3,6,6]4
	155	13,82	A4F1G4S[3,6,6,6]4
	156	13,99	A4G4LacS[3,3,3,3]4
	157	13,99	A4G4LacS[3,3,3,6]4
	158	13,99	A4F2G4S[3,3,3,3]4
	159	13,99	A4F2G4S[3,3,6,6]4
	160	14,43	A4F3G4S[3,3,3,3]4

* GU – glukozne jedinice (engl. *glucose unit*)

**Simboli struktura: svi *N*-glikani imaju dva sržna GlcNAc-a; F na početku kratice označava sržnu fukozu α -1,6-vezanu za sržni GlcNAc; Mx, broj (x) manozu vezanih na dva sržna GlcNAc-a; D1 označava da se α -1,2-manoza nalazi na Man- α -1,6-Man- α -1,6 ruci, D2 na Man- α -1,3-Man- α -1,6 ruci, D3 na Man- α -1,3 ruci kod M6, odnosno Man- α -1,2-Man- α -1,3 ruci kod M7 i M8; Ax, broj antena (GlcNAc-a) na bazi od tri manoze; A2, biantenar s oba β -1,2-vezana GlcNAc-a; A3, triantenar s β -1,2-vezanim GlcNAc-om na dvije manoze i trećim β -1,4-vezanim GlcNAc-om na α -1,3-vezanu manozu; A4, vezanje isto kao i kod A3, jedino je dodatni GlcNAc β -1,6-vezan na α -1,6-vezanu manozu; B, račvajući (engl. *bisecting*) GlcNAc β -1,4-vezan na β -1,3-vezanu manozu; Gx, broj (x) β -1,4-vezanih galaktoza (na antenama); Fx, broj (x) α -1,3-vezanih fukoza na antenarne GlcNAc-ove; Sx, broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu; Lac (x), broj (x) laktozaminskih lanaca (Gal- β -1,4-GlcNAc). Preuzeto i prilagođeno iz Saldova i sur., 2014.⁸²

3.3.2.5. Izračun deriviranih parametara fukozilacije ukupnih proteina plazme

Na temelju prijašnjih rezultata²¹, očekivano je da će promjene glikozilacije proteina, kao posljedice inaktivirajućih rijetkih *HNF1A* varijanti, biti najviše izražene kod fukozilacije plazmatskih proteina. Stoga su izvedeni i derivirani parametri koji opisuju fukozilaciju ukupnih proteina plazme, na temelju podataka dobivenih HILIC-UPLC profiliranjem netretiranih *N*-glikana (tablica 5).

Tablica 5 Derivirani parametri fukozilacije ukupnih proteina plazme

Derivirani parametar	Opis	Formula
AntFuc	Udio antenarno fukoziliranih struktura u ukupnom <i>N</i> -glikomu plazmatskih proteina	$(0,23 \text{ GP30} + 0,8 \text{ GP35} + 0,14 \text{ GP36} + \text{GP38} + 0,33 \text{ GP39} + 0,84 \text{ GP42}) / \text{GP}$
CorFuc	Udio sržno fukoziliranih tri- i tetra-antenarnih struktura u ukupnom <i>N</i> -glikomu plazmatskih proteina	$(0,25 \text{ GP24} + 0,16 \text{ GP29} + \text{GP32} + \text{GP34} + 0,15 \text{ GP35} + 0,1 \text{ GP41}) / \text{GP}$

Derivirani parametar	Opis	Formula
Indeks_1	Udio antenarno fukoziliranih triantenarnih struktura u ukupnim triantenarnim strukturama	$\frac{A3F}{(A3F + A3)}$ $A3F = (0,23 \text{ GP30} + 0,8 \text{ GP35} + 0,14 \text{ GP36} + 0,2 \text{ GP38} + 0,15 \text{ GP39})$ $A3 = (0,22 \text{ GP22} + \text{GP27}+28 + 0,68 \text{ GP29} + 0,7 \text{ GP30} + \text{GP31} + \text{GP33} + 0.05 \text{ GP35})$
Indeks_2	Udio antenarno fukoziliranih tetraantenarnih struktura u ukupnim tetraantenarnim strukturama	$\frac{A4F}{(A4F + A4)}$ $A4F = (0,8 \text{ GP38} + 0,18 \text{ GP39} + 0,84 \text{ GP42})$ $A4 = (0,15 \text{ GP29} + 0.07 \text{ GP30} + 0.03 \text{ GP33} + 0,87 \text{ GP36} + \text{GP37} + 0,65 \text{ GP39} + \text{GP40})$
Indeks_3	Udio antenarno fukoziliranih tri- i tetra-antenarnih struktura u ukupnim tri- i tetra-antenarnim strukturama	$\frac{(A3F + A4F)}{(A3F + A4F + A3 + A4)}$
Indeks_4	Omjer antenarno i sržno fukoziliranih triantenarnih struktura	$\frac{A3F}{FA3}$ $FA3 = (0,25 \text{ GP24} + 0,16 \text{ GP29} + \text{GP32} + \text{GP34} + 0,13 \text{ GP35})$
Indeks_5	Omjer antenarno i sržno fukoziliranih tetraantenarnih struktura	$\frac{A4F}{FA4}$ $FA4 = 0,1 \text{ GP41}$
Indeks_6	Omjer antenarno i sržno fukoziliranih triantenarnih i tetraantenarnih struktura	$\frac{(A3F + A4F)}{(FA3 + FA4)}$

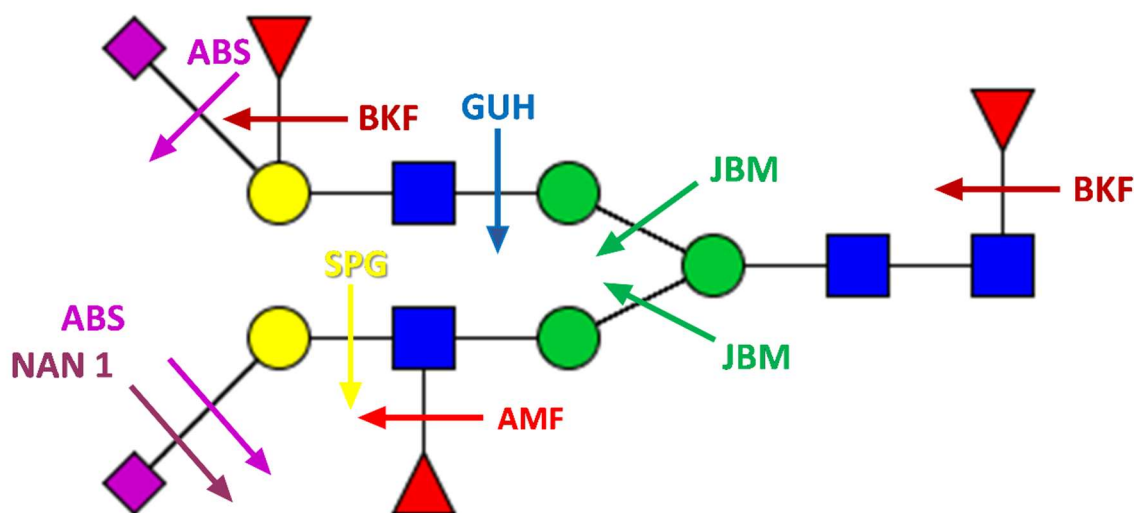
3.3.2.6. Sekvenciranje glikana enzimskim reakcijama egzoglikozidaza

U svrhu potvrđivanja već poznatih i određivanja nepoznatih glikanskih struktura prisutnih u pojedinačnim kromatografskim pikovima provedena je dijagnostička razgradnja *N*-glikana egzoglikozidazama. Egzoglikozidaze su enzimi koji specifično kidaju određene monosaharide s nereducirajućih krajeva glikana, pokazujući i određeni stupanj specifičnosti za glikozidne veze. Dakle, pažljivim odabirom pojedinog enzima ili cijelog niza enzima može se odrediti vrsta vezanog monosaharida, a u određenim slučajevima i tip glikozidne veze.

Razgradnja *N*-glikana obilježenih 2-AB-om provedena je korištenjem sljedećih enzima: sijalidaza A, rekombinantna iz *Arthrobacter ureafaciens* (ABS; 5 U mL⁻¹), sa širokom specifičnošću za α-sijalinsku kiselinu, β-1-3,4-galaktozidaza iz goveđih testisa (BTG; 5 U mL⁻¹), α-1-2,3,4,6-fukozidaza iz goveđih bubrega (BKF; 5 U mL⁻¹) (široke specifičnosti, premda pokazuje najveći afinitet za α1-6-vezanu fukozu), β-*N*-acetilheksozaminidaza, rekombinantna iz *Streptococcus pneumoniae* (GUH; 40 U mL⁻¹) (uklanja β-1-2,3,4,6-vezani GlcNAc s

kompleksnih glikana), α -1-2,3,6-manozidaza iz graha (JBM; 150 U mL⁻¹), α -1-3,4-fukozidaza iz badema (AMF; 4 000 U mL⁻¹) (ne uklanja α -1,6-vezanu sržnu fukožu) (slika 15).

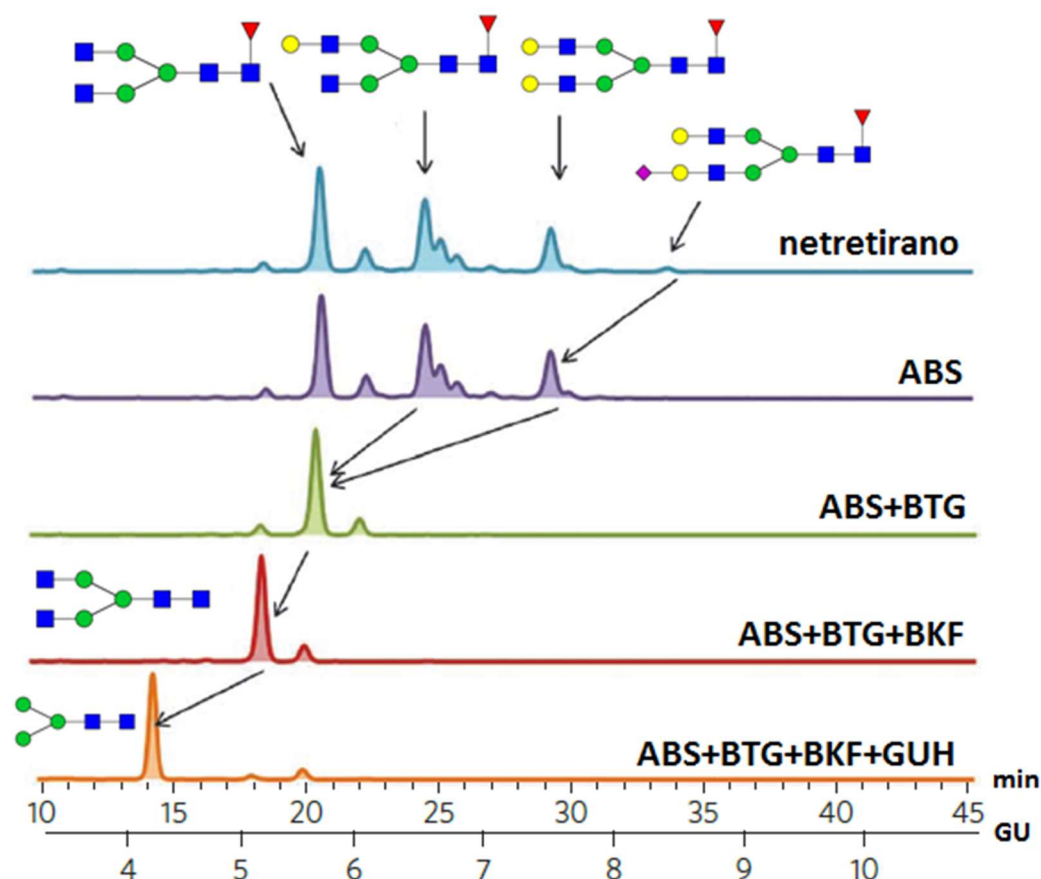
Reakcijske smjese sastavljene od obilježenih *N*-glikana i egzoglikozidaza inkubirane su preko noći na 37 °C u natrijevom citrat-fosfatnom puferu ($c = 50$ mmol L⁻¹, pH = 5,5), jedino za enzim JBM u natrijevom acetatu ($c = 100$ mmol L⁻¹, $c(\text{Zn}^{2+}) = 2$ mmol L⁻¹, pH = 5,0). Kombinacije upotrebljenih egzoglikozidaza, kao i reakcijski volumeni prikazani su u tablici 6. Nakon završetka razgradnje, enzimi su uklonjeni iz reakcijske smjese korištenjem *Omega 10k MWCO Acroprep* filter pločice, prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.2.3. Ukoncentrirani (osušeni) uzorci resuspendirani su u 7,5 μ L vode te pomiješani s 22,5 μ L acetonitrila (ψ (uzorak : ACN) = 25 : 75), te analizirani HILIC-UPLC-om, na način opisan u poglavlju 3.3.2.4. Volumen injekcije iznosio je 25 μ L. Primjer sekvenciranja glikana razgradnjom pomoću egzoglikozidaza i profiliranjem HILIC-UPLC-om dan je na slici 16.



Slika 15 Mjesta djelovanja uobičajeno korištenih egzoglikozidaza za sekvenciranje glikana. **ABS** otpušta α -2-3,6,8-vezanu terminalnu sijalinsku kiselinu (NeuNAc i NeuNGc); **NAN 1** otpušta α -2-3-vezanu terminalnu sijalinsku kiselinu (NeuNAc i NeuNGc); **AMF** otpušta α -1-3,4-vezanu fukožu, no ne i α -1,6-vezanu sržnu fukožu; **BKF** uklanja α -1-2,3,4,6-vezanu fukožu; **BTG** uklanja β -1-3,4-vezanu galaktozu; **GUH** uklanja β -1-2,3,4,6-vezani GlcNAc (ali ne i računajući GlcNAc); **JBM** uklanja s većim afinitetom α -1-2,6-vezanu manozu, nego α -1,3-vezanu manozu. Preuzeto i prilagođeno iz Marino i sur., 2010.⁵⁰

Tablica 6 Kombinacije enzima korištene za sekvenciranje *N*-glikana (netretiranih i desijaliniziranih)

netretirani <i>N</i> -glikani		desijalinizirani <i>N</i> -glikani	
Egzoglikozidaza	V(enzim/ pufer/ uзорak) (μL)	Egzoglikozidaza	V(enzim/ pufer/ uзорak) (μL)
ABS	1/1/3	samo uзорak	0/0/3
JBM	2/2/6	JBM	2/2/6
ABS+BKF	2x1/2x0,5/2	BKF	1/1/3
ABS+AMF	2x1/2x0,5/2	AMF	1/1/3
ABS+AMF+BKF	3x1/3x0,67/5	AMF+BKF	2x1/2x0,5/2
ABS+AMF+BKF+BTG	4x1/4x0,5/4	AMF+BKF+BTG	3x1/3x0,67/5
ABS+BKF+AMF+BTG+GUH	5x1/5x0,4/3	BKF+AMF+BTG+GUH	4x1/4x0,5/4
ABS+BKF+AMF+BTG+GUH → JBM	5x1/5x0,4/3 → 2/2/6	BKF+AMF+BTG+GUH → JBM	4x1/4x0,5/4 → 2/2/6



Slika 16 Princip sekvenciranja glikana korištenjem egzoglikozidaza. Kombiniranjem specifičnih egzoglikozidaza sa znanjem o doprinosu pojedinačnog monosaharida površini kromatografskog pika omogućena je analiza oligosaharidne sekvence i određivanje glikozidne veze. Preuzeto i prilagođeno iz Marino i sur., 2010.⁵⁰

3.3.2.7. Spektrometrija masa otpuštenih i obilježenih *N*-glikana

U svrhu potvrde prisutnosti određenih glikanskih struktura, te za njihovu dodatnu karakterizaciju unutar pojedinačnih kromatografskih pikova, uzorci su analizirani i metodama spektrometrije masa.

MALDI-TOF-MS analiza *N*-glikana

Skupljeni kromatografski pikovi s fluorescentno obilježenim desijaliniziranim *N*-glikanima analizirani su MALDI spektrometrijom masa. Na *MTP AnchorChip* pločicu nanešeno je po 1 μL uzorka zajedno s 1 μL otopine matriksa (γ (2,5-DHB) = 5 g L⁻¹, c (NaOH) = 1 mmol L⁻¹, otapalo ψ (voda : ACN) = 50 : 50) te je smjesa ostavljena da se osuši pri ambijentalnim uvjetima. Osušena smjesa *N*-glikana i matriksa rekristalizirana je s 0,2 μL etanola. Uzorci su analizirani na spektrometru masa *Ultraflex TOF/TOF* (Bruker Daltonik) matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (MALDI) – vrijeme leta (TOF) – spektrometrijom masa (MS) u pozitivnom načinu ionizacije koristeći reflektoron. Uređaj je bio opremljen UV laserom *Smartbeam-II*, te pod nadzorom programa *Flexcontrol 3,4 Build 119* (Bruker Daltonik). Sustav je kalibriran korištenjem *N*-glikana ukupnih proteina plazme kao standarda. Uvjeti analize bili su sljedeći: akcelerijski napon 25 kV, odgoda ekscitacije 140 ns, laserska frekvencija 200 Hz uz 10 000 pucnjeva po spektru. Radno područje snimanja masa instrumenta postavljeno je u rasponu 550 – 3000 m/z. Tandemna spektrometrija masa (MS/MS) je napravljena za najzastupljenije pikove u spektru pomoću laserom inducirane disocijacije.

nanoLC-ESI-MS analiza *N*-glikana

Određeni skupljeni kromatografski pikovi s fluorescentno obilježenim *N*-glikanima (netretirani i desijalinizirani) analizirani su i nano tekućinskom kromatografijom temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC-nanoLC) spregnutom sa spektrometrijom masa. Navedena analiza provedena je na uređaju za kromatografiju *Waters Nano Acquity UPLC M Class* (Waters), sastavljenim od modula za upravljanje otapalima (μBSM , engl. *μ binary solvent manager*) i modula za upravljanje uzorcima (SM, engl. *sample manager*), spregnutim sa spektrometrom masa *Synapt G2-Si* (Waters), opremljenog elektrosprej izvorom iona (ESI), kvadrupolnim analizatorom i detektorom vremena leta (TOF, engl. *time of flight*). Uređaji su bili pod nadzorom programa *MassLynx* (Waters). Uzorci su pripremani miješanjem s acetonitrilom ψ (uzorak : ACN) = 30 : 70, konačnog volumena $V = 10 \mu\text{L}$, od čega je injektirano

2 μL . *N*-glikani su bili razdvajani na amidnoj *Inertsil EX-Nano* koloni, duljine 150 mm, unutarnjeg promjera 0,1 mm, veličine čestica 3 μm . Pokretnu fazu činio je amonijev formijat (HCOONH_4) ($c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,4$) kao otapalo A i acetonitril kao otapalo B, a razdvajanje je provedeno uz linearni gradijent 65 – 50 % otapala B pri protoku od 0,75 $\mu\text{L min}^{-1}$ tijekom 60 min. Uzorci su održavani na temperaturi od 10 °C prije injektiranja, dok je razdvajanje na koloni provedeno na 60 °C. Uvjeti ionizacije u izvoru iona bili su sljedeći: temperatura 100 °C, tlak dušika 0,5 bar, napon kapilare 2,5 kV te napon stošca 60 V. Radno područje snimanja masa instrumenta postavljeno je u rasponu 550 – 3000 m/z . Trajanje skeniranja jednog spektra iznosilo je 1 s. Tandemna spektrometrija masa (MS/MS) napravljena je za tri najzastupljenija pika u spektru.

3.4. Statistička obrada podataka

Deskriptivna statistika za opisivanje istraživane populacije izvedena je u programu *SPSS Statistics* verzija 23 (IBM). Kontinuirane varijable s normalnom raspodjelom izražene su kao srednja vrijednosti $\pm$ standardna devijacija, dok su one s neparametarskom raspodjelom izražene kao medijan $\pm$ interkvartilni raspon. Kategoričke su varijable izražene kao postoci. Za usporedbu grupa korišten je Kruskal-Wallis test. Razlike u frekvenciji kategoričkih varijabli ispitane su korištenjem Chi-kvadrat testa. Značajne su razlike pretpostavljene za p -vrijednosti $< 0,05$.

Glikanski podatci analizirani su programom *R v.3.0.1*. Podatci su najprije normalizirani na ukupnu površinu (engl. *total area normalization*), gdje se udio površine svakog glikanskog (kromatografskog) pika podijeli ukupnom površinom odgovarajućeg kromatograma, kako bi mjerenja različitih uzoraka postala usporediva. Podatci su također korigirani na razlike u serijama (engl. *batch correction*), korištenjem *ComBat* metode nad normaliziranim i logaritmiranim podacima, gdje se tehnički uzroci varijacije modeliraju kao kovarijat određene serije eksperimenta. Kovarijat je neka izvanjska okolnost koju nije moguće kontrolirati, a utječe na zavisnu varijablu, što ometa promatranje utjecaja neke nezavisne varijale, pa se stoga uključuje u model. Uz izravno mjerene glikanske skupine (GP) i desijalinizirane glikanske skupine (DG), izračunato je i nekoliko deriviranih parametara iz izravno mjerenih glikanskih parametara. Analiza povezanosti statusa bolesti s glikanskim svojstvima provedena je korištenjem općeg linearnog modela, u koji su dob i spol uključeni kao dodatni kovarijati.

Analize su najprije provedene za svaku populaciju zasebno (hrvatsku i englesku), a zatim su kombinirane koristeći vaganu meta-analizu inverzne varijance. Prije navedenih analiza sve su glikanske varijable transformirane metodom inverzne transformacije rankova u varijable s normalnom raspodjelom (srednja vrijednost = 0, standardna devijacija = 1). Korištenjem rank-transformiranih varijabli čini procijenjene efekte različitih glikana usporedivim, budući da transformirani glikanski podatci imaju istu standardiziranu varijancu. U tom su slučaju procijenjeni efekti uvijek posljedica razlika među grupama, izraženi u jedinicama standardne devijacije. Stopa lažno pozitivnih rezultata (FDR, engl. *false discovery rate*) kontrolirana je korištenjem Benjamini-Hochberg postupka.

Za predviđanje statusa bolesti korištene su linearna regresija i regularizirana logistička regresija. Logistički model korišten je u bivarijantnoj regresijskoj analizi klasifikacije (korištenjem samo jednog glikanskog svojstva po modelu). Za višestruku regresijsku analizu klasifikacije (koristi se više od jednog glikanskog svojstva kao prediktor u modelu) korišten je regulariziran logistički model. U bivarijantnoj regresijskoj analizi klasifikacije korišteni su inicijalni i derivirani glikanski parametri, dok su kod višestruke regresijske analize klasifikacije korištena samo inicijalna glikanska svojstva. Kako bi se procijenila učinkovitost regulariziranog logističkog prediktivnog modela, korištena je metoda unakrsne validacije (engl. *cross validation*), s k vrijednošću 10. Predviđanja svakog postupka validacije spojena su u jedan validacijski set, na temelju kojeg je procijenjena učinkovitost modela ROC krivuljom (engl. *receiver operating characteristic curve*).

ROC krivulja se koristi za procjenu učinkovitosti novog dijagnostičkog (prognostičkog) testa ili biljega.⁸³ Za provođenje ROC klasifikacije potrebne su kontinuirane varijable, a graf se dobiva unošenjem osjetljivosti (stvarno pozitivnih) nasuprot specifičnosti (stvarno negativnih) mnogih nasumično testiranih graničnih vrijednosti. Površina ispod krivulje (AUC, engl. *area under curve*) se koristi kao mjera diskriminacijske moći ispitivanog biljega, u ovom slučaju, glikana određenih svojstava. Ukoliko, primjerice, oboljeli pokazuju veće vrijednosti nekog dijagnostičkog testa, površina ispod ROC krivulje predstavlja vjerojatnost da će nasumično odabrani kandidat iz grupe oboljelih imati višu vrijednost tog dijagnostičkog testa u usporedbi s nasumično odabranim kandidatom iz zdrave populacije. Ukoliko je dijagnostički test sposoban savršeno razlikovati te dvije populacije, njegova će površina ispod krivulje iznositi 1,0, a ako nema dijagnostičke vrijednosti, AUC će iznositi 0,5.

§ 4. REZULTATI

4.1. Karakteristike ispitanika

Prilikom uključivanja pacijenata u istraživanje, prikupljeni su i osnovni antropometrijski, klinički i anamnestički podatci. Opis ispitivane kohorte dan je u tablici 7. Status bolesti, odnosno boluje li pacijent od dijabetesa tipa 2 ili monogenetskog dijabetesa, nije bio poznat ni za jednog ispitanika prije uključivanja u studiju. Na taj se način osigurala neselektivnost u odabiru ispitivane populacije, s ciljem oponašanja stvarnih uvjeta u dijabetološkim klinikama.

Tablica 7 Karakteristike uključenih pacijenata (nastup dijabetesa prije 45. godine života, negativna protutijela na β -stanice gušterače, dokazana endogena produkcija inzulina)*

Skupine pacijenata ovisno o <i>HNF1A</i> varijanti	Patogene <i>HNF1A</i> varijante	Varijante nepoznatog značaja	Benigne <i>HNF1A</i> varijante	Bez <i>HNF1A</i> varijante / T2D	<i>p</i> -vrijednost
<i>Broj ispitanika</i>	19	7	10	945	
<i>Spol (% muškaraca)</i>	5 (27,8%)	3 (42,9%)	4 (57,1%)	564 (59,8%)	0,011
<i>Dob kod uzorkovanja (god)</i>	39,7 ± 17,4	54,4 ± 12,3	48,1 ± 17,4	47,4 ± 10,9	0,037
<i>Nastup dijabetesa (god)</i>	25,7 ± 8,6	29,4 ± 9,1	36,4 ± 5,6	35,6 ± 6,8	< 0,001
<i>Trajanje dijabetesa (god)</i>	10,0 ± 16,0	18,5 ± 25,5	8,0 ± 13,0	10,0 ± 11,5	0,794
<i>BMI (kg m⁻²)</i>	25,5 ± 8,6	28,0 ± 13,3	35,4 ± 9,7	30,4 ± 8,2	0,002
<i>Glukoza natašte (mmol L⁻¹)</i>	7,20 ± 3,00	5,60 ± 3,80	9,15 ± 5,80	8,10 ± 3,90	0,270
<i>HbA1c (%)</i>	7,36 ± 1,42	7,00 ± 3,20	9,30 ± 3,43	7,50 ± 2,20	0,302
<i>C-peptid (nmol L⁻¹)</i>	0,32 ± 0,37	0,77 ± 1,34	0,67 ± 0,49	0,70 ± 0,56	0,001
<i>Ukupni kolesterol (mmol L⁻¹)</i>	4,75 ± 1,09	4,38 ± 1,06	5,07 ± 0,88	4,59 ± 1,17	0,625
<i>HDL (mmol L⁻¹)</i>	1,32 ± 0,48	1,26 ± 0,95	1,07 ± 0,35	1,15 ± 0,39	0,043
<i>Trigliceridi (mmol L⁻¹)</i>	1,13 ± 0,45	1,01 ± 1,26	1,60 ± 1,70	1,60 ± 1,26	0,018
	Terapija				0,001
<i>Inzulin +/- OAD (%)</i>	7 (38,9%)	4 (57,2%)	5 (71,5%)	618 (65,5%)	
<i>OAD (%)</i>	6 (33,3%)	0 (0%)	1 (14,3%)	236 (25%)	
<i>Dijeta (%)</i>	5 (27,8%)	3 (42,9%)	1 (14,3%)	90 (9,5%)	

*Kontinuirane varijable s normalnom raspodjelom prikazane su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, dok su one s neparametarskom raspodjelom prikazane kao medijan ± interkvartilni raspon. Kategorijske varijable prikazane su kao postotci. Skupine su međusobno uspoređivane Kruskal-Wallis testom (kontinuirane varijable), odnosno Chi-kvadrat testom (kategorijske varijable). Značajne razlike pretpostavljene su za *p*-vrijednosti < 0,05 (označeno podebljano). BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*), HDL – lipoprotein velike gustoće (engl. *high density lipoprotein*), OAD – oralni antidijabetici, T2D – dijabetes tipa 2.

Iz ovih je rezultata vidljivo kako je dob kod nastupa dijabetesa najizraženije različita karakteristika između pacijenata s *HNF1A*-MODY-em i dijabetesom tipa 2 ($p = 3,3 \times 10^{-5}$), što

nije iznenađujuće, budući da je upravo ona jedan od glavnih kliničkih kriterija za postavljanje dijagnoze MODY-a.⁸⁴ Nadalje, pacijenti s patogenim *HNF1A* varijantama imaju niži BMI u usporedbi s pacijentima oboljelim od dijabetesa tipa 2 i nepatogenim *HNF1A* varijantama ($p = 0,002$), a imaju i niže razine C-peptida ($p = 0,001$). Razina HDL kolesterola značajno je viša kod pacijenata s patogenim varijantama, odnosno s HNF1A-MODY-em ($p = 0,043$), dok je razina triglicerida niža ($p = 0,018$), što je u skladu s prijašnjim istraživanjima.⁸⁵ Trenutna terapija značajno se razlikuje među ispitivanim skupinama ($p = 0,001$), budući da se skupina pacijenata s *HNF1A* varijantama u značajnoj mjeri tretira isključivo intervencijom u načinu prehrane, dok je većina pacijenata s dijabetesom tipa 2 na inzulinskoj terapiji, sa ili bez kombinacije s oralnim antidijabeticima.

4.2. Varijante gena *HNF1A* identificirane u istraživanju

Jedan od specifičnih ciljeva ovog istraživanja bilo je i provođenje sekvenciranja gena *HNF1A* za sve uključene ispitanike, a u svrhu identifikacije rijetkih varijanti gena *HNF1A* i molekularnog dijagnosticiranja HNF1A-MODY-a. Naime, i danas se sekvenciranje gena smatra zlatnim standardom u dijagnostici monogenetskog dijabetesa, a u ovom radu predstavlja prvotno istraživanje na koje se nadovezuju ostale, prvenstveno glikanske, analize.

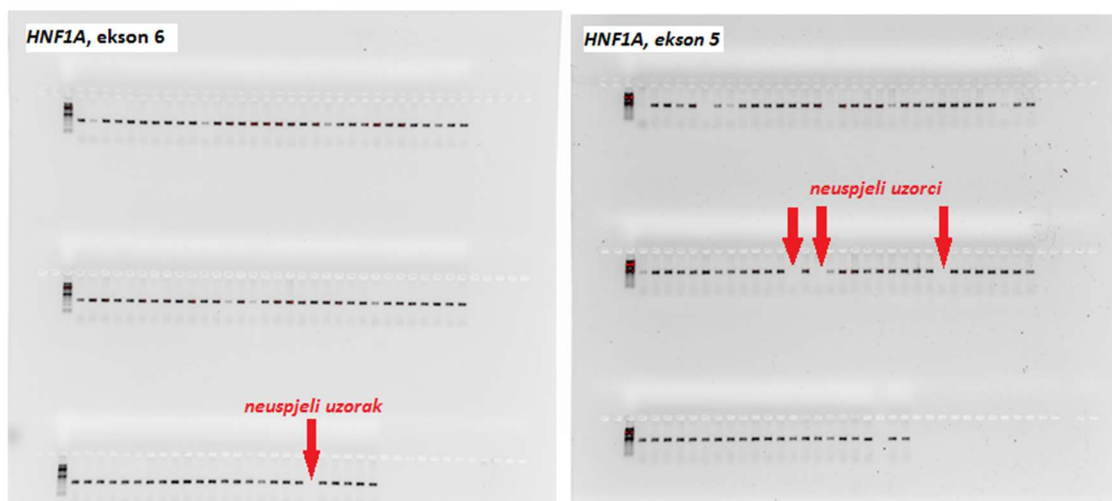
4.2.1. Sekvenciranje gena *HNF1A* i detekcija mutacija

DNA je izolirana iz uzoraka pune krvi svakog od ispitanika, a izolacija je za hrvatske ispitanike provedena na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Ostali postupci vezani uz sekvenciranje gena *HNF1A* provedeni su u Centru za dijabetes, endokrinologiju i metabolizam Sveučilišne bolnice Churchill u Oxfordu te u Laboratorijima za istraživanje dijabetesa Sveučilišta u Oxfordu.

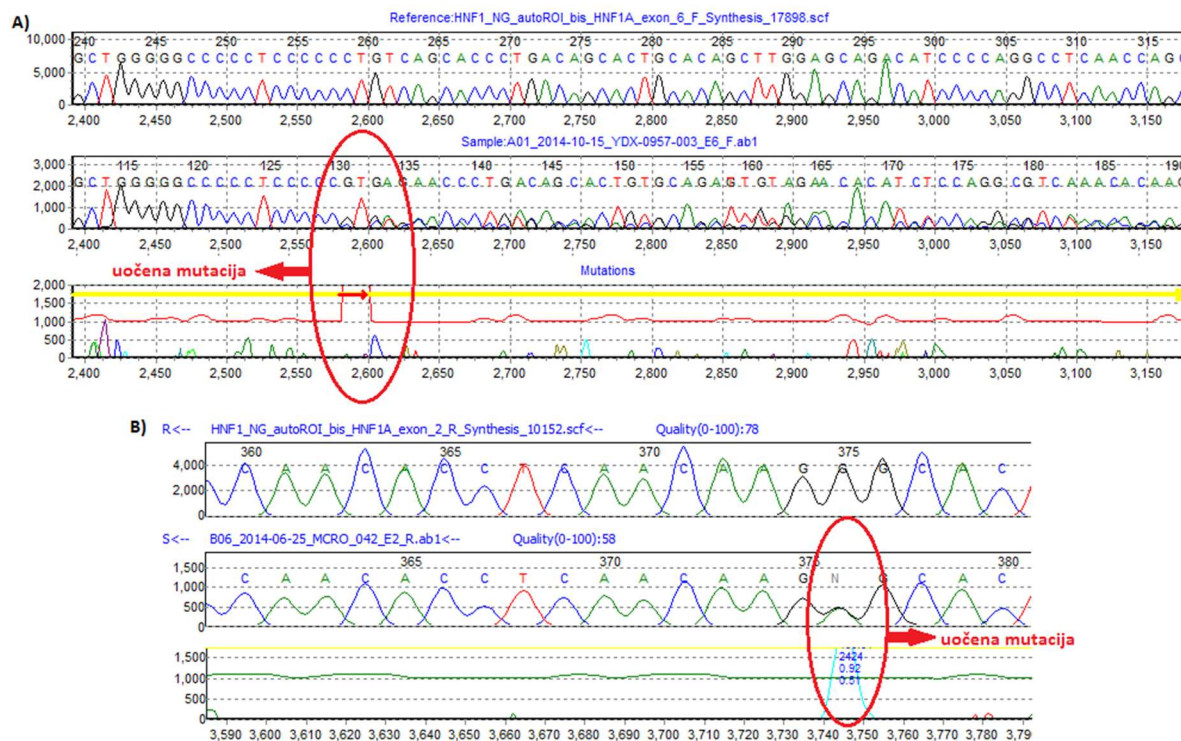
Budući da mutacije mogu biti locirane duž čitavog gena *HNF1A*, strategije za njihov pronalazak moraju uzimati u obzir svih 10 eksona i granične intronske regije. Izolirana DNA poslužila je kao kalup za PCR umnažanje eksonske regije od interesa (postupak opisan u poglavlju 3.3.1.3), a uspješnost postupka provjerena je agaroznom gel-elektroforezom (slika 17). U slučaju neuspjeha ponovilo se PCR umnažanje željene regije gena *HNF1A*.

Rezultati sekvenciranja (elektroferogrami) pojedinog eksona analizirani su programom *Mutation Surveyor v5.1*. Analiza se temelji na usporedbi uzorka i reference, pri čemu se svaka

točka elektroferograma uzorka uspoređuje se s pripadajućom točkom elektroferograma referentne sekvence. Ukoliko se te dvije točke ne podudaraju, izračunavaju se parametri i prikaže se varijacija u obliku pika u elektroferogramu mutacija (slika 18). Referentna sekvenca humanog gena *HNF1A* preuzeta je iz *GenBank* baze podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).⁸⁶



Slika 17 Vizualiziran agarozni gel s *post*-PCR produktima umnažanja regije od interesa gena *HNF1A*. Crveno su označeni neki uzorci kod kojih je PCR umnažanje DNA bilo neuspješno.



Slika 18 Izgled korisničkog sučelja programa *Mutation Surveyor* za detekciju mutacija. A) primjer heterozigotne delecije c.1136_1137delCT (cDNA, delecija C i T na poziciji 1136-1137); B) primjer *missense* mutacije c.451G>A (cDNA, G na poziciji 451 je zamijenjen s A).

4.2.2. Pronađene rijetke varijante gena *HNF1A*

U ovoj je studiji identificirano 25 rijetkih nesinonimnih *HNF1A* varijanti (frekvencija manje učestalog alela < 1 %) kod 29 probanda (prvootkriveni nositelj mutacije), odnosno kod ukupno 36 ispitanika (uključujući i srodnike, n = 7). Pronađene mutacije uključuju sedam mutacija koje dovode do skraćivanja proteina i 18 *missense* mutacija (tablica 8). Razmatrajući njihov potencijal za uzrokovanje bolesti, 14 ih je već ranije prijavljeno da uzrokuju MODY^{14,87–95}, osam ih je prijavljeno kao varijante nepoznatog značaja (VUS) ili benigne varijante^{14,96}, a tri su novootkrivene (p.S3C, p.G151S, p.K22N), s nepoznatim utjecajem na funkcionalnost gena. Za sve mutacije koje rezultiraju skraćivanjem proteina pretpostavljeno je da su patogene, odnosno da uzrokuju HNF1A-MODY.

Kao što je ranije spomenuto (poglavlje 3.3.1.7.), procjena potencijala uzrokovanja bolesti pronađenih varijanti provedena je na nekoliko razina, uzimajući u obzir kliničke karakteristike pacijenata, kosegregaciju dijabetesa i pronađene varijante unutar obitelji, *in silico* predviđanje patogenosti pronađene varijante gena (SIFT, PPH2, *Provean*), utjecaj mutacije na mjesto prekrajanja (*Human Splicing Finder* i *Mutation Taster 2*), prisutnost varijante u bazama podataka (*ExAC*, *T2D-GENES*), literaturu i funkcionalne studije.

Bioinformatički alati za predviđanje patogenosti genskih varijanti su za osam *missense* mutacija predvidjeli da oštećuju funkciju genskog produkta, odnosno da su patogene i da uzrokuju MODY, dok je za njih deset predviđeno da su benigne.⁹⁷ Utjecaj mutacije na mjesto prekrajanja procijenjen je programom *Human Splicing Finder*, koji je varijantu c.-4A>G proglasio benignom. Oba su programska alata (*Human Splicing Finder* i *Mutation Taster 2*) za novootkrivenu *missense* varijantu c.8C>G predvidjela da vjerojatno utječe na prekrajanje, stvarajući novo mjesto prekrajanja.

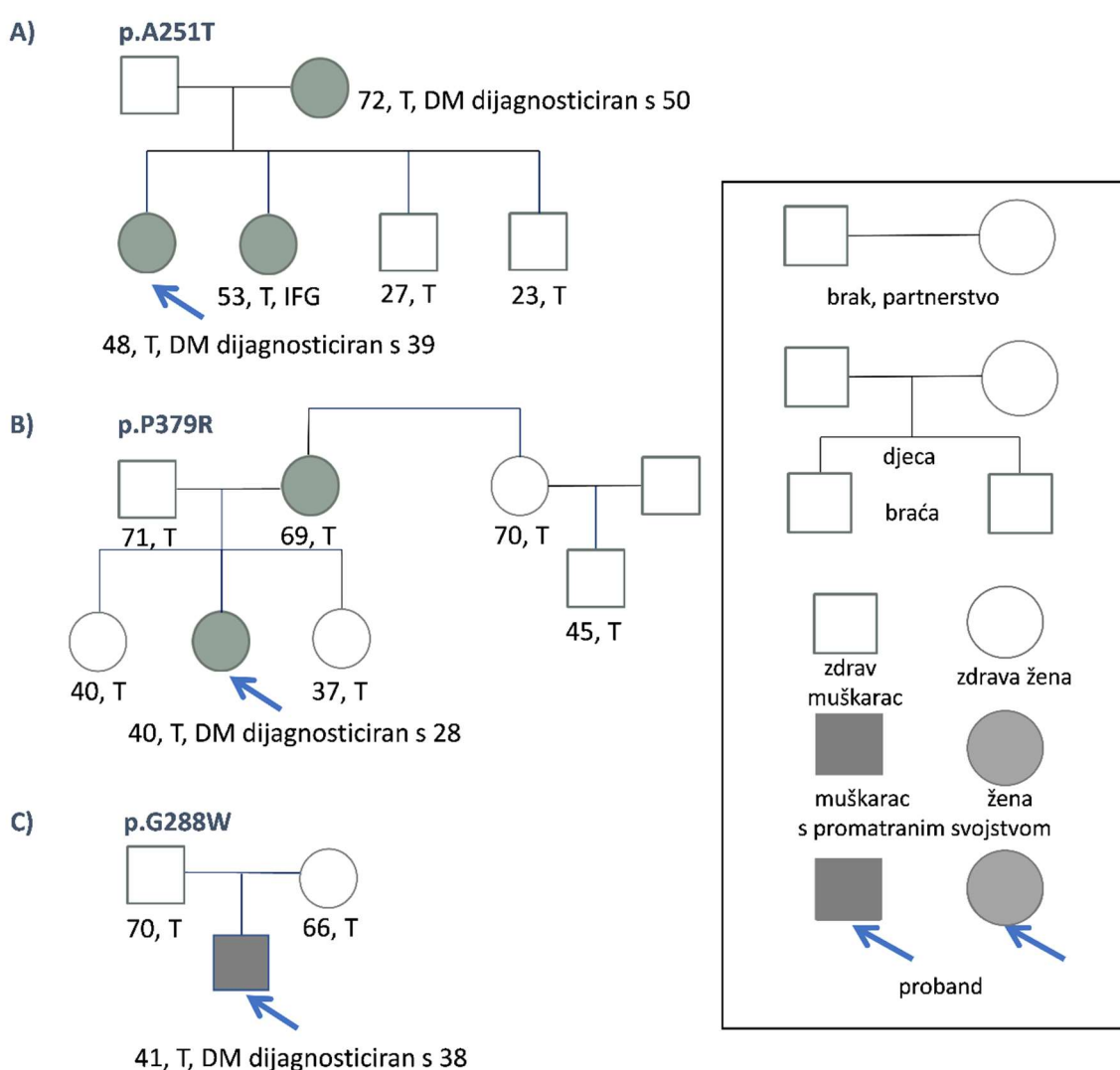
Pretraživanjem baza podataka *ExAC* i *T2D-GENES*, utvrđeno je da je 13 od 25 identificiranih *HNF1A* varijanti pronađeno kod osoba uključenih u *ExAC* bazu, s frekvencijom manje učestalog alela 0,001 – 0,1 %.

Uz ispitanike s identificiranim mutacijama gena *HNF1A*, testirana su i 22 dostupna člana obitelji, od čega se njih desetero također pokazalo nositeljima mutacija. Nadalje, ispitana je i kosegregacija pronađenih *HNF1A* varijanti s dijabetesom unutar 14 obitelji s dostupnim podacima. Primjer kosegregacijske analize prikazan je na slici 19. Ukoliko kosegregacijska analiza pokaže uzorak nasljeđivanja u skladu s autosomno dominantnim načinom nasljeđivanja HNF1A-MODY-a, takav rezultat upućuje da pronađena genska varijanta uzrokuje MODY.

Tablica 8 Rijetke varijante gena *HNF1A* identificirane u ispitivanoj populaciji. VUS – varijanta nepoznatog značaja (engl. *variant of unknown significance*).

Varijanta cDNA	Varijanta proteina	Tip mutacije	Mutacija prijavljena kao patogena	Bioinformatička predviđanja			Frekvencija alela u ExAc-u	Kosegregacija s dijabetesom	Procjena patogenosti
				SIFT	PP2	Provean			
c.-4A>G	/	mjesto prekrajanja	ne	/	/	/	0,102	nedostupno	benigna
c.1-326del	del eksona 1	delecija eksona	da	skraćivanje proteina			0	da ⁸⁷	patogena
c.8C>G	S3C	missense	novootkrivena	štetna	vjer. štetna	štetna	0	nedostupno	vjerojatno patogena
c.139G>C	G47R	missense	da	tolerirana	benigna	neutralna	0,001	da ²¹	benigna
c.142G>A	E48K	missense	da	tolerirana	benigna	neutralna	0,015	da ⁸⁸	benigna
c.404delA	D135fs	pomak okvira čitanja	da	skraćivanje proteina			0	da ⁸⁹	patogena
c.451G>A	G151S	missense	novootkrivena	štetna	vjer. štetna	štetna	0	nedostupno	vjerojatno patogena
c.586A>G	T196A	missense	ne	tolerirana	benigna	neutralna	0,033	ne ⁹⁶	benigna
c.666G>T	K222N	missense	novootkrivena	štetna	vjer. štetna	štetna	0	3 generacije DM	vjerojatno patogena
c.685C>T	R229*	nonsense	da	skraćivanje proteina			0,002	da ⁹³	patogena
c.751G>A	A251T	missense	ne	tolerirana	vjer. štetna	neutralna	0	da ⁹⁸	VUS
c.779C>T	T260M	missense	da	štetna	vjer. štetna	štetna	0	da ^{91,97}	patogena
c.862G>T	G288W	missense	ne	tolerirana	vjer. štetna	neutralna	0,012	ne ⁹⁷	vjerojatno benigna
c.871C>A	P291T	missense	da	tolerirana	benigna	neutralna	0,002	da ^{20,97}	VUS
c.872delC	P291fs	pomak okvira čitanja	da	skraćivanje proteina			0	da ⁹²	patogena
c.872dupC	G292fs	pomak okvira čitanja	da	skraćivanje proteina			0	da ⁹¹	patogena
c.1015G>A	G339S	missense	ne	tolerirana	benigna	neutralna	0,015	da	benigna
c.1047C>A	H349Q	missense	ne	tolerirana	benigna	neutralna	0,007	nedostupno	benigna
c.1129delC	L377fs	pomak okvira čitanja	da	skraćivanje proteina			0	2 generacije DM	patogena
c.1136_37delCT	P379fs	pomak okvira čitanja	da	skraćivanje proteina			0	da ⁹³	patogena
c.1136C>A	P379H	missense	da	štetna	vjer. štetna	štetna	0,003	da ⁹⁴	patogena
c.1136C>G	P379R	missense	da	štetna	vjer. štetna	štetna	0	da ^{95,97}	patogena
c.1165T>G	L389V	missense	ne	tolerirana	vjer. štetna	neutralna	0,054	nedostupno	benigna
c.1544C>T	T515M	missense	ne	štetna	vjer. štetna	neutralna	0,002	nedostupno	VUS
c.1816G>A	G606S	missense	da	tolerirana	benigna	neutralna	0,005	2 generacije DM	benigna

Funkcionalna karakterizacija rijetkih varijanti gena *HNF1A* identificiranih u ispitivanoj populaciji prethodno je provedena i dostupna u literaturi za 14 varijanti (tablica 8). Za tri varijante nepoznatog značaja i tri novootkrivene varijante provedene su funkcionalne studije u partnerskoj instituciji – Centru za dijabetes, endokrinologiju i metabolizam Sveučilišne bolnice Churchill u Oxfordu. Rezultati funkcionalne karakterizacije upućuju da sve novootkrivene varijante vjerojatno uzrokuju MODY, dok rezultati ispitivanja funkcionalnosti varijanti nepoznatog značaja nisu jednoznačni i ne omogućuju jasan zaključak, pa se stoga ove varijante i dalje tretiraju kao VUS.



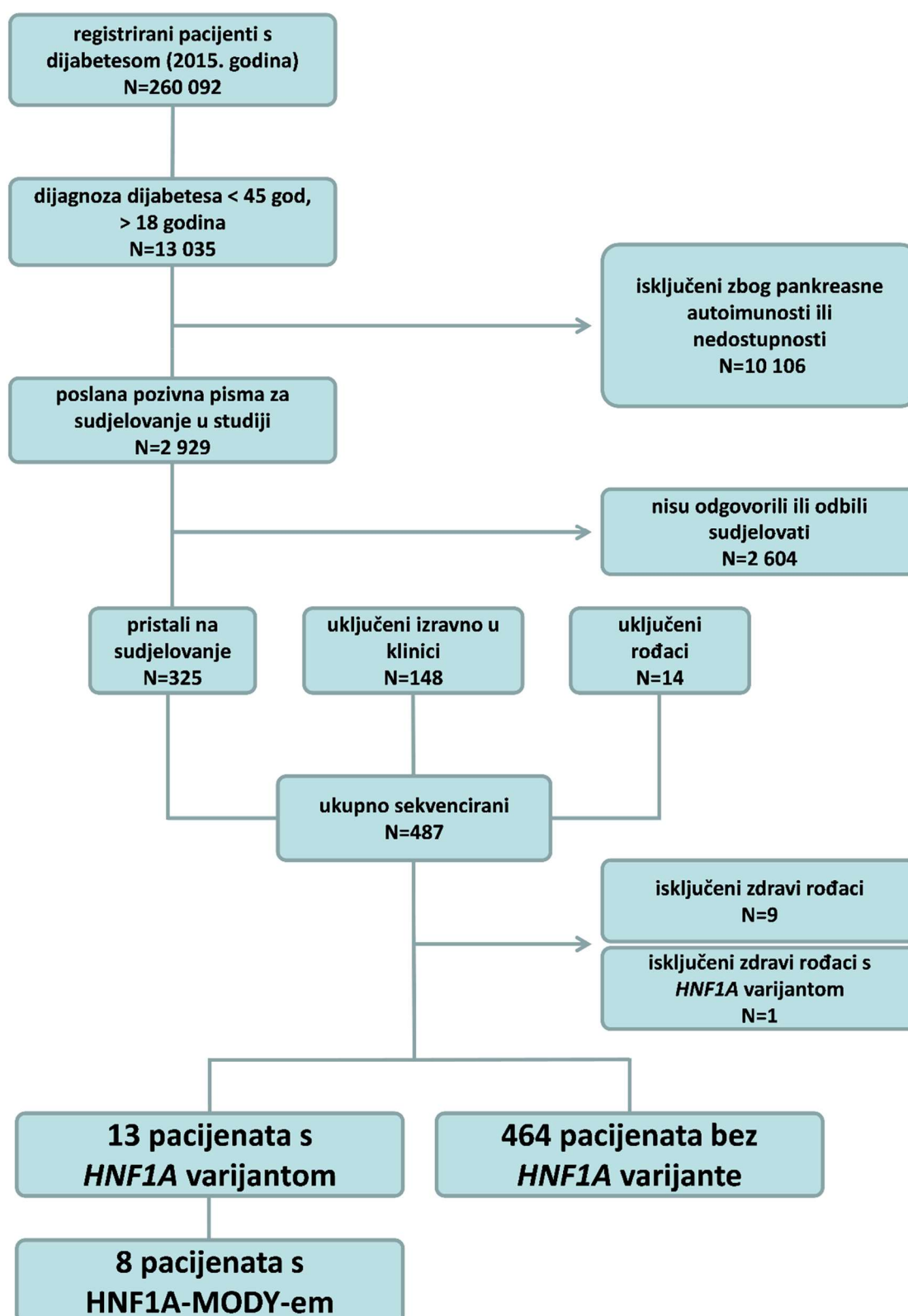
Slika 19 Rodoslovno stablo ispitanika s *HNF1α* varijantama p.A251T, p.G288W i p.P379R. DM – *diabetes melitus*, proband – prvootkriveni nositelj mutacije, T – testiran (sekvenciran gen *HNF1A*). Preuzeto i prilagođeno iz Pavić i sur., 2017.⁹⁸

4.2.3. Prevalencija *HNF1A-MODY*-a u Hrvatskoj

Kako je ovo istraživanje po prvi puta uključivalo i hrvatske pacijente, jedan od postavljenih ciljeva bila je i procjena prevalencije *HNF1A-MODY* oblika dijabetesa u Hrvatskoj. U Hrvatskoj je sustavno uključeno 477 pacijenata koji su zadovoljavali uključne kriterije studije (opisani u poglavlju 3.1.). Postupak uključivanja pacijenata shematski je prikazan na slici 20. Od navedenog broja, devetero prvotno uključenih pacijenata i četvero članova njihovih obitelji nositelji su mutacije u genu *HNF1A*. Procjenom patogenosti pronađenih mutacija, zaključeno je da osam ispitanika (šest prvotno uključenih i dva člana obitelji) nosi rijetke *HNF1A* varijante za koje postoje čvrsti dokazi da uzrokuju *HNF1A-MODY*. Ostalih pet ispitanika nositelji su varijanti koje su odgovorne za slabiju penetraciju bolesti ili povećavaju rizik za razvoj dijabetesa tipa 2, bez uzrokovanja *MODY* fenotipa. Dakle, 2,7 % (95 % CI 1,25 – 4,15 %) hrvatskih ispitanika nositelji su rijetkih *HNF1A* varijanti, dok 1,7 % (95 % CI 0,54 – 2,86 %) ima *HNF1A-MODY*.⁹⁸

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2015. godine, u Hrvatskoj je ukupno registrirano 260 092 pacijenata s dijabetesom, od čega se 90 % odnosi na dijabetes tipa 2. Nadalje, od ukupnog broja pacijenata s dijabetesom tipa 2, njih 7,3 % oboli prije 45. godine života, što je jedan od uključnih kriterija ove studije. Zaključno, na temelju navedenih podataka procijenjeno je da u Hrvatskoj ima 281 pacijent s *HNF1A-MODY*-em (95 % CI 257 – 304), što rezultira procijenjenom prevalencijom od 66 (95 % CI 61 – 72) slučajeva na milijun stanovnika.

Praktična vrijednost identifikacije i pravilne dijagnoze *HNF1A-MODY*-a najviše dolazi do izražaja prilagodbom medicinskog tretmana. Naime, četvero hrvatskih pacijenata za koje je potvrđeno da boluju od *HNF1A-MODY*-a liječeno je inzulinskom terapijom. Za njih dvoje uspješno je provedena promjena terapije, odnosno prekid terapije inzulinom te prelazak na oralnu terapiju derivatima sulfonilureja, pri čemu je postignuta uspješna kontrola razine glukoze u krvi. Druga dva pacijenta boluju od dijabetesa značajnije duži vremenski period (26 odnosno 30 godina), pa se iz tog razloga smatralo da promjena terapije ne bi bila djelotvorna, te stoga nije niti provedena.



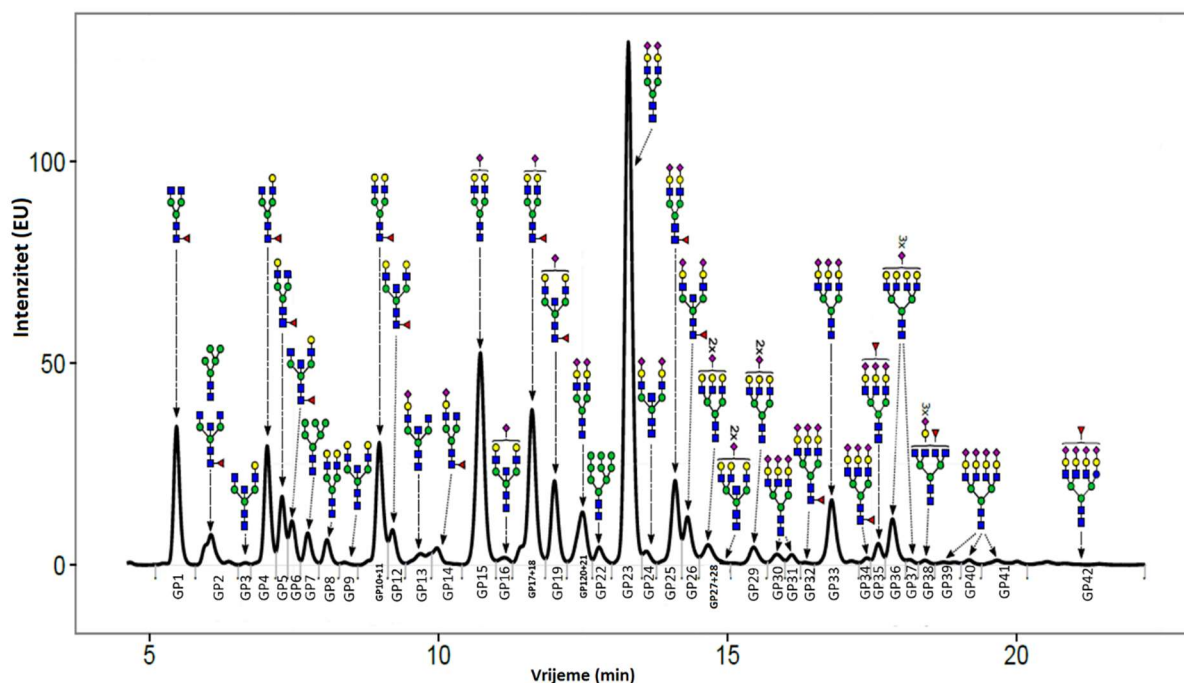
Slika 20 Shematski prikaz strategije uključivanja hrvatskih pacijenata u provedeno istraživanje. Preuzeto i prilagođeno iz Pavić i sur., 2017.⁹⁸

4.3. N-glikanski obrasci plazmatskih proteina u HNF1A-MODY-u

Drugi specifični cilj ovog istraživanja bio je analizirati *N*-glikanske profile ukupnih proteina plazme svih uključenih ispitanika, u svrhu identifikacije specifičnih glikanskih obrazaca kod pacijenata s HNF1A-MODY-em, s konačnim ciljem poboljšanja njegove dijagnostike. Naime, rijetke varijante gena *HNF1A* koje rezultiraju gubitkom funkcije (patogene varijante) dovode, između ostalog, i do značajnih promjena *N*-glikoma proteina plazme.

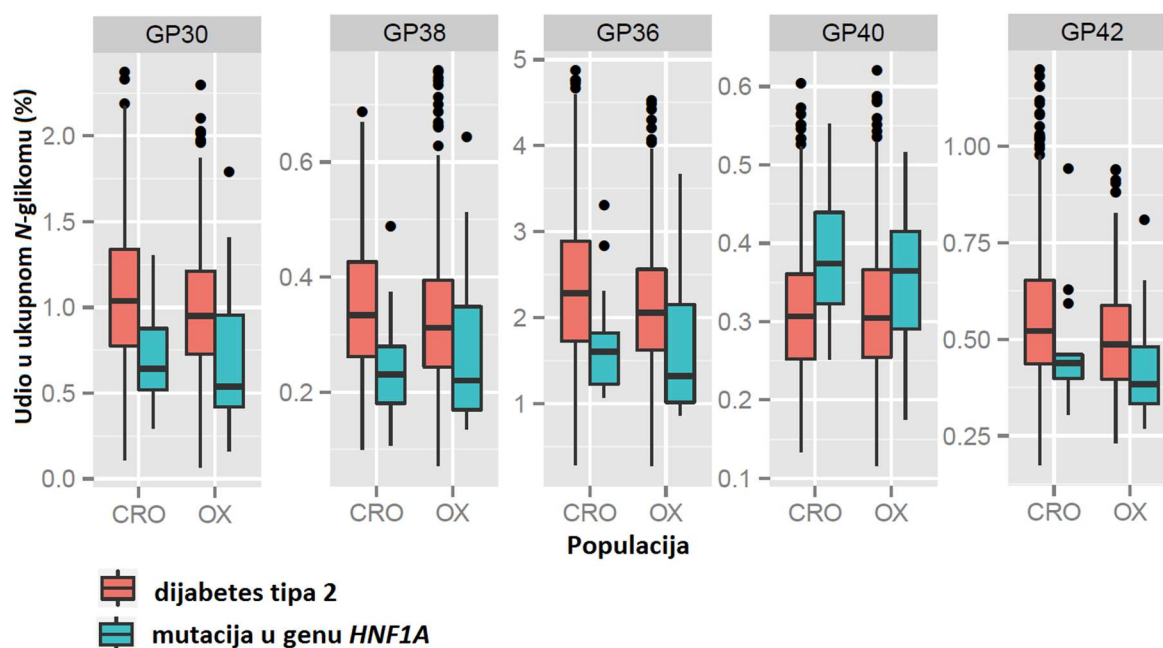
4.3.1. Netretirani *N*-glikani u HNF1A-MODY-u

N-glikom ukupnih plazmatskih proteina analiziran je nakon otpuštanja *N*-glikana s glikoproteina, njihovog fluorescentnog obilježavanja i pročišćavanja, i to profiliranjem HILIC-UPLC tekućinskom kromatografijom. Navedena tehnika razdvaja glikane na 42 kromatografska pika, od kojih svaki sadrži nekoliko strukturno i kompozicijski sličnih oligosaharida, čije su strukture prethodno utvrđene.⁸² Reprezentativni primjer kromatograma *N*-glikana ukupnih proteina plazme s naznačenim najzastupljenijim glikanskim strukturama prikazan je na slici 21. Vrijednost svakog kromatografskog (glikanskog) pika (GP) izražena je kao udio (postotak) u ukupnom *N*-glikomu analiziranog uzorka.



Slika 21 Reprezentativni kromatogram otpuštenih *N*-glikana ukupnih proteina plazme s prikazanim najzastupljenijim glikanskim strukturama unutar pojedinačnog glikanskog pika (GP). EU – jedinica emisije.

Uspoređivanjem razina glikanskih grupa (GP) dvije skupine pacijenata, odnosno pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A* ($n = 33$) i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$), dobivene su statistički značajne razlike za pet od ukupno 42 izravno mjerene glikanske vrijednosti (p -vrijednost $< 0,05$) (tablica 9). Od početnog broja od 36 pacijenata s *HNF1A* varijantom, dva su pacijenta s benignim varijantama isključena zbog nedostupnosti podataka, a treći pacijent (nositelj patogene mutacije) jer se nalazi u završnom stadiju zatajenja bubrega, budući da bubrežne bolesti utječu na profil *N*-glikana.⁹⁹ Dakle, značajne razlike dobivene su za skupine glikana GP30, GP38, GP36, GP40 i GP42, i te su glikanske grupe pokazale najbolju moć u razlikovanju opisanih skupina pacijenata. Naime, razine svih navedenih glikana značajno su niže kod pacijenata s *HNF1A* varijantama, osim u slučaju GP40 čije su razine više kod tih pacijenata (tablica 9, slika 22).



Slika 22 Razlike u udjelima individualnih glikanskih grupa kod pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$) i pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A* ($n = 33$). Prikazane su samo statistički značajno različite glikanske grupe plazmatskih proteina, po redoslijedu značajnosti. Razlike su vizualizirane kao dijagrami pravokutnika (engl. *box plot*), gdje svaki pravokutnik predstavlja raspon od 25. do 75. percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Vanjske linije predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar 1,5 x interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. *outliers*) su naznačene kružićima. GP – glikanski pik; CRO – hrvatska populacija; OX – engleska (Oxford) populacija.

Tablica 9 Usporedba *N*-glikoma plazmatskih proteina pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A* i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2, zasebno u engleskoj i hrvatskoj populaciji, te meta-analiza obje populacije. Prikazano je kretanje promjena glikanskih vrijednosti (efekt), standardna pogreška (SE) i *p*-vrijednosti. Statistički značajnom se smatra *p*-vrijednost < 0,05 (označene podebljano).

GLIKAN	ENGLESKA			HRVATSKA			META-ANALIZA			
	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	prilagođena <i>p</i> -vrijednost
GP30	-0,78	0,23	5,76E-04	-0,85	0,29	2,91E-03	-0,81	0,18	5,40E-06	2,05E-04
GP38	-0,55	0,23	1,50E-02	-0,80	0,28	4,26E-03	-0,65	0,18	2,30E-04	4,36E-03
GP36	-0,60	0,23	8,18E-03	-0,69	0,29	1,55E-02	-0,64	0,18	3,56E-04	4,50E-03
GP40	0,36	0,23	1,08E-01	1,01	0,28	3,57E-04	0,62	0,18	4,88E-04	4,64E-03
GP42	-0,54	0,23	1,82E-02	-0,50	0,29	8,18E-02	-0,52	0,18	3,46E-03	2,63E-02
GP33	0,36	0,23	1,12E-01	0,63	0,29	2,71E-02	0,46	0,18	9,05E-03	5,68E-02
GP25	-0,37	0,23	1,03E-01	-0,58	0,28	3,83E-02	-0,45	0,18	1,05E-02	5,68E-02
GP19	0,33	0,23	1,51E-01	0,61	0,28	3,29E-02	0,44	0,18	1,44E-02	6,83E-02
GP27+28	0,22	0,23	3,43E-01	0,77	0,29	7,42E-03	0,43	0,18	1,62E-02	6,83E-02
GP31	0,30	0,23	1,94E-01	0,62	0,29	3,06E-02	0,42	0,18	1,85E-02	7,04E-02
GP16	0,31	0,23	1,79E-01	0,42	0,28	1,33E-01	0,35	0,18	4,76E-02	1,62E-01
GP12	0,17	0,23	4,54E-01	0,62	0,28	2,89E-02	0,35	0,18	5,10E-02	1,62E-01
GP10+11	0,11	0,21	6,22E-01	0,58	0,27	3,22E-02	0,29	0,17	8,65E-02	2,53E-01
GP9	0,25	0,22	2,63E-01	0,35	0,28	2,13E-01	0,29	0,17	1,00E-01	2,72E-01
GP41	0,08	0,23	7,29E-01	0,53	0,29	6,41E-02	0,25	0,18	1,56E-01	3,41E-01
GP15	-0,34	0,23	1,30E-01	-0,09	0,29	7,44E-01	-0,25	0,18	1,66E-01	3,41E-01
GP20+21	0,09	0,23	7,03E-01	0,49	0,28	8,26E-02	0,24	0,18	1,68E-01	3,41E-01
GP32	0,02	0,23	9,33E-01	0,60	0,29	3,59E-02	0,25	0,18	1,69E-01	3,41E-01
GP24	-0,31	0,23	1,64E-01	-0,13	0,28	6,45E-01	-0,24	0,18	1,70E-01	3,41E-01
GP5	0,45	0,23	4,67E-02	-0,10	0,29	7,21E-01	0,24	0,18	1,82E-01	3,46E-01
GP4	0,23	0,23	3,10E-01	0,23	0,29	4,14E-01	0,23	0,18	1,94E-01	3,52E-01
GP23	-0,13	0,23	5,62E-01	-0,37	0,29	2,04E-01	-0,22	0,18	2,15E-01	3,72E-01
GP8	-0,38	0,23	9,54E-02	0,05	0,29	8,61E-01	-0,21	0,18	2,32E-01	3,83E-01
GP14	0,39	0,23	8,86E-02	-0,09	0,29	7,57E-01	0,20	0,18	2,53E-01	4,01E-01
GP6	0,12	0,22	5,80E-01	0,28	0,29	3,33E-01	0,18	0,18	3,05E-01	4,64E-01
GP22	-0,14	0,22	5,19E-01	-0,17	0,28	5,49E-01	-0,15	0,17	3,83E-01	5,59E-01
GP39	-0,02	0,23	9,43E-01	0,39	0,29	1,76E-01	0,14	0,18	4,32E-01	5,92E-01
GP29	0,15	0,23	5,18E-01	0,13	0,29	6,56E-01	0,14	0,18	4,36E-01	5,92E-01
GP7	0,03	0,23	9,00E-01	0,29	0,29	3,04E-01	0,13	0,18	4,61E-01	6,04E-01
GP17+18	-0,10	0,22	6,60E-01	0,46	0,28	1,00E-01	0,12	0,17	5,05E-01	6,39E-01
GP26	0,28	0,23	2,22E-01	-0,15	0,28	5,91E-01	0,11	0,18	5,44E-01	6,66E-01
GP13	-0,05	0,22	8,18E-01	0,35	0,28	2,16E-01	0,10	0,17	5,60E-01	6,66E-01
GP35	0,07	0,23	7,53E-01	-0,33	0,28	2,40E-01	-0,09	0,18	6,24E-01	7,05E-01
GP2	0,02	0,20	9,08E-01	-0,25	0,27	3,53E-01	-0,08	0,16	6,41E-01	7,05E-01
GP37	0,03	0,23	9,04E-01	0,16	0,28	5,66E-01	0,08	0,18	6,50E-01	7,05E-01
GP34	0,01	0,23	9,59E-01	0,12	0,29	6,68E-01	0,06	0,18	7,58E-01	8,00E-01
GP1	0,18	0,22	4,11E-01	-0,36	0,28	1,97E-01	-0,03	0,17	8,82E-01	9,06E-01
GP3	-0,06	0,21	7,77E-01	0,10	0,27	6,99E-01	0,00	0,17	9,93E-01	9,93E-01

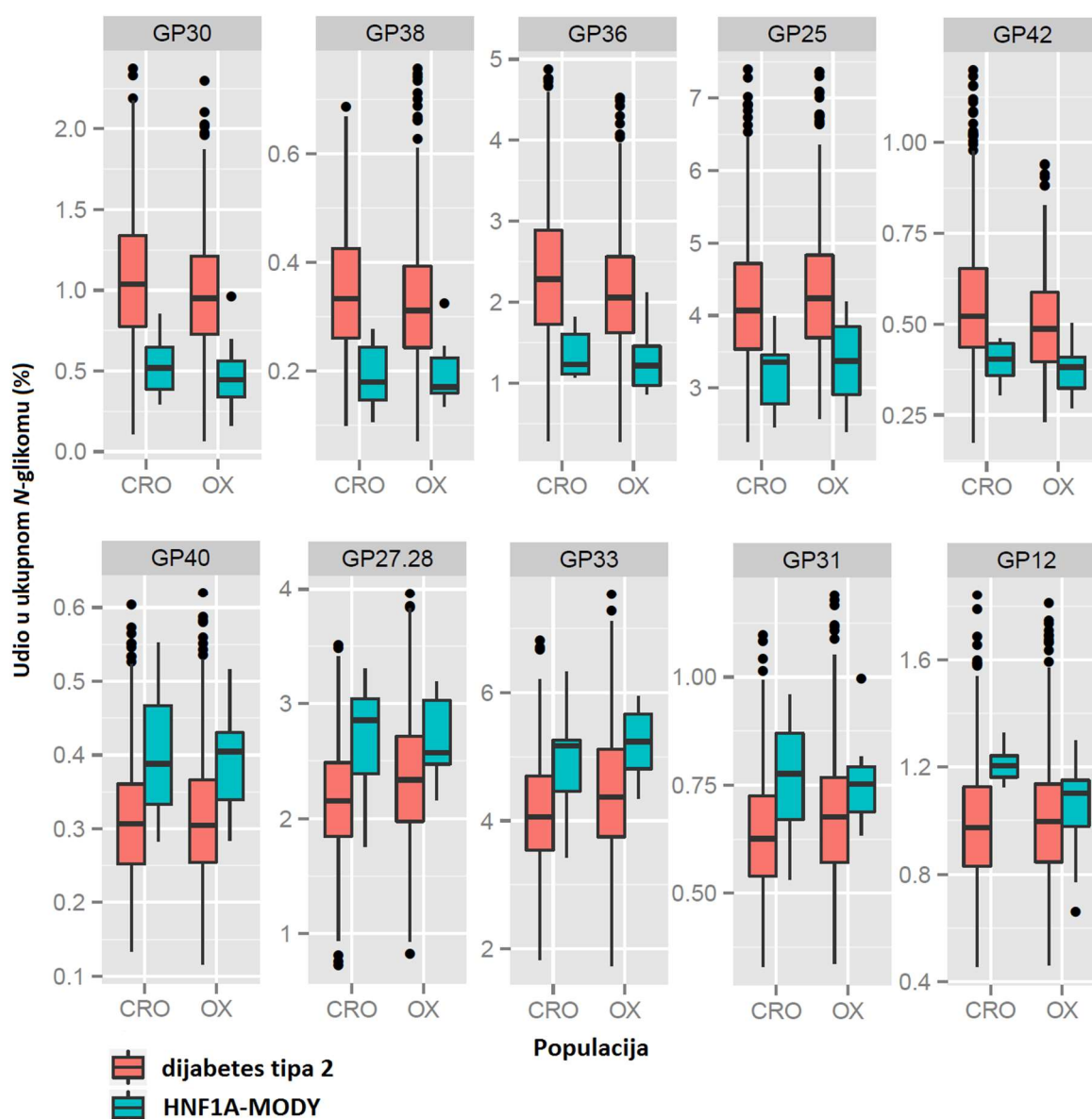
Kao što je bilo riječi u prethodnom poglavlju, sistematična procjena patogenosti genske varijante je apsolutno nužna za određivanje njenog potencijala za uzrokovanje bolesti. Uzimajući u obzir navedeno, pretpostavljeno je da sve rijetke varijante gena *HNF1A* identificirane u ovoj studiji ne uzrokuju nužno i bolest, odnosno HNF1A-MODY. Iz tog je razloga HNF1A-skupina pacijenata preinačena na način da uključuje samo osobe s *HNF1A* varijantama za koje je procijenjeno da su patogene i vjerojatno patogene, tj. da uzrokuju HNF1A-MODY ($n = 18$). Statističke analize ponovljene su na isti način, međutim ovaj su put značajne razlike dobivene za deset od ukupno 42 izravno mjerena glikanska parametra (p -vrijednost $< 0,05$) (tablica 10). Kao i u prethodnom slučaju glikanske grupe GP30, GP38 i GP36 pokazale su se najboljim diskriminatorima dvije grupe pacijenata, međutim sada s većim stupnjem značajnosti: p (GP30_{patogene varijante}) = $4,38 \times 10^{-7}$ naspram p (GP30_{sve varijante}) = $2,05 \times 10^{-4}$; p (GP38_{patogene varijante}) = $6,17 \times 10^{-6}$ naspram p (GP38_{sve varijante}) = $4,36 \times 10^{-3}$; p (GP36_{patogene varijante}) = $1,39 \times 10^{-5}$ naspram p (GP36_{sve varijante}) = $4,50 \times 10^{-3}$. Smjer kretanja promjena navedenih glikanskih grupa i dalje ostaje isti – naime, pacijenti s HNF1A-MODY-em imaju značajno niže razine ovih glikana u usporedbi s pacijentima s ranim nastupom dijabetesa tipa 2. Slika 23 prikazuje statistički značajne razlike u udjelima pojedinačnih glikanskih grupa između opisanih skupina pacijenata.

4.3.2. Desijalinizirani *N*-glikani u HNF1A-MODY-u

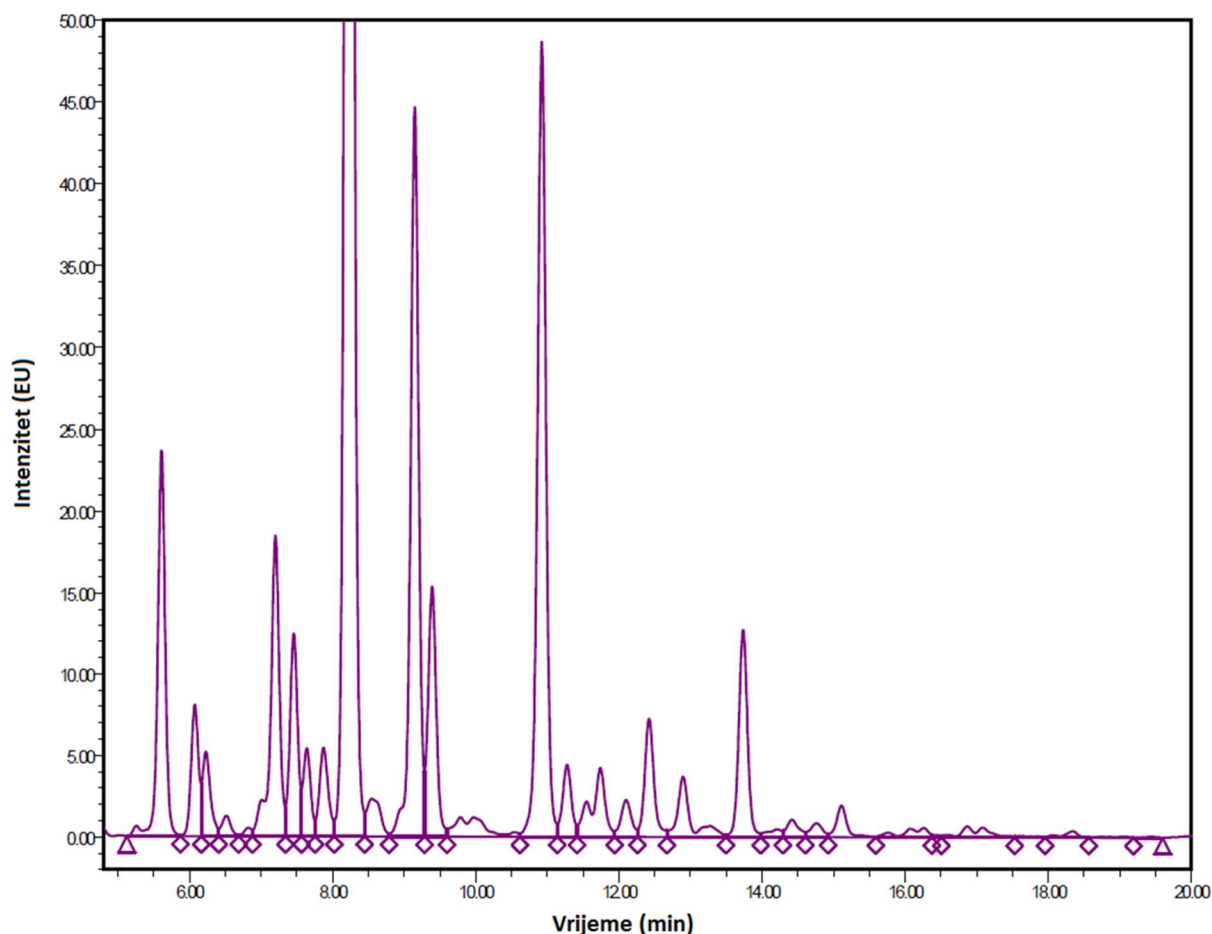
N-glikom ukupnih plazmatskih proteina dodatno je analiziran HILIC-UPLC tekućinskom kromatografijom nakon tretiranja otpuštenih, fluorescentno obilježenih i pročišćenih *N*-glikana enzimom sijalidazom iz *Arthrobacter ureafaciens*, kako bi se otpustile α -2-3,6,8,9-vezane sijalinske kiseline. Desijalinizacija *N*-glikana provela se iz povijesnih razloga²¹, budući da su se tako tretirani glikani specifičnije razdvajali HILIC-HPLC tekućinskom kromatografijom. HILIC-UPLC profiliranjem desijalinizirani glikani se razdvajaju na 32 kromatografska pika, od kojih svaki sadrži samo jedan ili nekoliko strukturno i kompozicijski sličnih oligosaharida. Utvrđivanje oligosaharidnih (glikanskih) struktura u pojedinom kromatografskom piku jedan je od ciljeva ovog doktorskog rada i opisano je u poglavlju 4.4.2. Reprezentativni primjer kromatograma desijaliniziranih *N*-glikana ukupnih proteina plazme prikazan je na slici 24. Vrijednost svakog kromatografskog pika desijaliniziranih glikana (DG) izražena je kao udio (postotak) u ukupnom desijaliniziranom *N*-glikomu analiziranog uzorka.

Tablica 10 Usporedba *N*-glikoma plazmatskih proteina pacijenata s patogenim varijantama gena *HNFI1A*, odnosno *HNFI1A-MODY*-em i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2, zasebno u engleskoj i hrvatskoj populaciji, te meta-analiza obje populacije. Prikazano je kretanje promjena glikanskih vrijednosti (efekt), standardna pogreška (SE) i *p*-vrijednosti. Statistički značajnom se smatra *p*-vrijednost < 0,05 (označene podebljano).

GLIKAN	ENGLESKA			HRVATSKA			META-ANALIZA			
	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	prilagođena <i>p</i> -vrijednost
GP30	-1,36	0,30	8,28E-06	-1,36	0,38	4,10E-04	-1,36	0,24	1,14E-08	4,32E-07
GP38	-1,19	0,30	9,49E-05	-1,24	0,38	1,03E-03	-1,21	0,24	3,25E-07	6,17E-06
GP36	-1,18	0,31	1,27E-04	-1,16	0,39	2,68E-03	-1,17	0,24	1,09E-06	1,39E-05
GP25	-1,16	0,30	1,30E-04	-0,94	0,38	1,35E-02	-1,07	0,24	5,74E-06	5,46E-05
GP42	-0,95	0,31	2,00E-03	-0,96	0,39	1,29E-02	-0,95	0,24	7,42E-05	5,64E-04
GP40	0,72	0,31	1,86E-02	1,19	0,38	1,87E-03	0,90	0,24	1,58E-04	1,00E-03
GP27+28	0,63	0,31	4,13E-02	1,05	0,39	6,49E-03	0,79	0,24	1,02E-03	5,53E-03
GP33	0,67	0,31	2,79E-02	0,93	0,39	1,60E-02	0,77	0,24	1,32E-03	6,29E-03
GP31	0,47	0,31	1,25E-01	0,93	0,39	1,64E-02	0,65	0,24	7,21E-03	3,04E-02
GP12	0,29	0,31	3,50E-01	1,13	0,38	2,89E-03	0,62	0,24	9,28E-03	3,53E-02
GP19	0,27	0,31	3,73E-01	1,06	0,38	5,49E-03	0,58	0,24	1,51E-02	5,20E-02
GP10+11	0,27	0,29	3,44E-01	0,94	0,36	9,85E-03	0,53	0,23	1,92E-02	6,07E-02
GP5	0,91	0,31	3,09E-03	-0,12	0,39	7,53E-01	0,51	0,24	3,34E-02	9,77E-02
GP14	0,82	0,31	7,50E-03	-0,04	0,39	9,17E-01	0,49	0,24	4,19E-02	1,14E-01
GP9	0,20	0,30	5,06E-01	0,87	0,38	2,02E-02	0,47	0,24	4,90E-02	1,24E-01
GP6	0,43	0,30	1,49E-01	0,44	0,39	2,49E-01	0,44	0,24	6,59E-02	1,56E-01
GP20+21	0,31	0,30	3,07E-01	0,62	0,38	1,02E-01	0,43	0,24	6,98E-02	1,56E-01
GP4	0,59	0,31	5,46E-02	0,18	0,39	6,40E-01	0,43	0,24	7,37E-02	1,56E-01
GP16	0,09	0,31	7,61E-01	0,84	0,38	2,76E-02	0,39	0,24	1,05E-01	2,08E-01
GP23	-0,25	0,31	4,12E-01	-0,60	0,39	1,21E-01	-0,39	0,24	1,09E-01	2,08E-01
GP22	-0,32	0,30	2,79E-01	-0,43	0,38	2,61E-01	-0,36	0,24	1,24E-01	2,24E-01
GP29	0,30	0,31	3,31E-01	0,36	0,39	3,50E-01	0,32	0,24	1,81E-01	3,13E-01
GP41	0,22	0,31	4,74E-01	0,43	0,39	2,65E-01	0,30	0,24	2,12E-01	3,50E-01
GP32	-0,05	0,31	8,66E-01	0,72	0,39	6,27E-02	0,25	0,24	3,02E-01	4,79E-01
GP7	0,03	0,31	9,20E-01	0,52	0,39	1,78E-01	0,22	0,24	3,59E-01	5,26E-01
GP39	0,12	0,31	7,00E-01	0,38	0,39	3,22E-01	0,22	0,24	3,60E-01	5,26E-01
GP15	-0,23	0,31	4,47E-01	-0,18	0,39	6,45E-01	-0,21	0,24	3,80E-01	5,35E-01
GP35	-0,06	0,31	8,35E-01	-0,39	0,38	3,08E-01	-0,19	0,24	4,25E-01	5,76E-01
GP2	0,05	0,27	8,51E-01	-0,54	0,36	1,32E-01	-0,16	0,22	4,50E-01	5,90E-01
GP24	-0,26	0,30	3,85E-01	-0,02	0,38	9,60E-01	-0,17	0,24	4,79E-01	6,06E-01
GP8	-0,21	0,31	4,92E-01	-0,02	0,39	9,56E-01	-0,14	0,24	5,69E-01	6,77E-01
GP17+18	-0,26	0,30	3,81E-01	0,76	0,38	4,27E-02	0,13	0,23	5,74E-01	6,77E-01
GP13	-0,10	0,30	7,50E-01	0,49	0,38	1,99E-01	0,13	0,24	5,88E-01	6,77E-01
GP1	0,29	0,30	3,30E-01	-0,74	0,38	4,78E-02	-0,11	0,23	6,48E-01	7,24E-01
GP37	-0,28	0,31	3,72E-01	0,25	0,38	5,03E-01	-0,06	0,24	7,88E-01	8,56E-01
GP3	-0,07	0,28	8,13E-01	0,19	0,37	5,98E-01	0,03	0,22	8,96E-01	9,44E-01
GP34	-0,21	0,31	5,05E-01	0,25	0,38	5,07E-01	-0,02	0,24	9,20E-01	9,44E-01
GP26	0,03	0,31	9,29E-01	-0,05	0,38	8,96E-01	0,00	0,24	9,89E-01	9,89E-01



Slika 23 Razlike u udjelima individualnih glikanskih grupa kod pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$) i pacijenata s patogenim varijantama gena *HNF1A*, odnosno HNF1A-MODY-em ($n = 18$). Prikazane su samo statistički značajno različite glikanske grupe plazmatskih proteina, po redoslijedu značajnosti. Razlike su vizualizirane kao dijagrami pravokutnika (engl. *box plot*), gdje svaki pravokutnik predstavlja raspon od 25. do 75. percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Vanjske linije predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar $1,5 \times$ interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. *outliers*) su naznačene kružićima. GP – glikanski pik; CRO – hrvatska populacija; OX – engleska (Oxford) populacija.

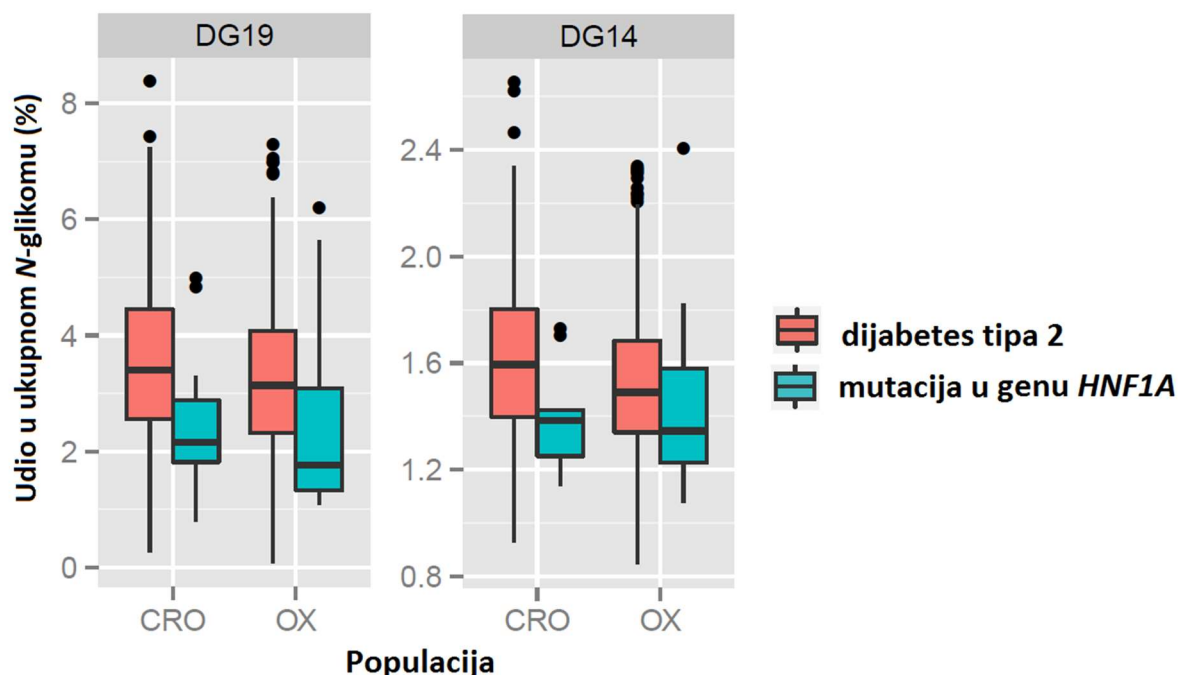


Slika 24 Reprezentativni kromatogram fluorescentno obilježenih desijaliziranih *N*-glikana ukupnih proteina plazme. U kromatogramu su integrirana ukupno 32 kromatografska pika (granice pika omeđene rombom). EU – jedinica emisije.

I u slučaju desijaliziranih *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina uspoređivane su razine desijaliziranih glikanskih grupa (DG) (srednje vrijednosti udjela pojedinačnog kromatografskog pika u ukupnoj površini kromatograma) pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A* ($n = 33$) i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$). Statistički značajne razlike dobivene su za dvije od ukupnih 32 izravno mjerene glikanske vrijednosti (p -vrijednost $< 0,05$) (tablica 11). Desijalizirane glikanske grupe DG19 i DG14 statistički su značajno niže kod pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A*, u usporedbi s pacijentima s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 (tablica 11, slika 25), te mogu poslužiti u razlikovanju ove dvije skupine pacijenata.

Tablica 11 Usporedba desijaliniziranog *N*-glikoma plazmatskih proteina pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNFI1A* i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2, zasebno u engleskoj i hrvatskoj populaciji, te meta-analiza obje populacije. Prikazano je kretanje promjena glikanskih vrijednosti (efekt), standardna pogreška (SE) i *p*-vrijednosti. Statistički značajnom se smatra *p*-vrijednost < 0,05 (označene podebljano).

GLIKAN	ENGLESKA			HRVATSKA			META-ANALIZA			
	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	prilagođena <i>p</i> -vrijednost
DG19	-0,64	0,24	7,48E-03	-0,67	0,31	3,17E-02	-0,65	0,19	6,30E-04	2,02E-02
DG14	-0,51	0,24	3,17E-02	-0,70	0,31	2,53E-02	-0,58	0,19	2,26E-03	3,62E-02
DG25	-0,52	0,24	2,75E-02	-0,47	0,31	1,30E-01	-0,51	0,19	7,85E-03	8,37E-02
DG31	-0,41	0,24	8,50E-02	-0,59	0,32	5,93E-02	-0,47	0,19	1,25E-02	1,00E-01
DG21	0,28	0,24	2,26E-01	0,73	0,31	2,02E-02	0,44	0,19	1,87E-02	1,08E-01
DG29	-0,56	0,24	1,78E-02	-0,22	0,31	4,84E-01	-0,44	0,19	2,14E-02	1,08E-01
DG27	-0,46	0,24	5,13E-02	-0,37	0,31	2,33E-01	-0,43	0,19	2,37E-02	1,08E-01
DG15	0,44	0,24	6,05E-02	0,35	0,32	2,60E-01	0,41	0,19	3,02E-02	1,21E-01
DG16	0,26	0,24	2,82E-01	0,58	0,31	6,33E-02	0,38	0,19	4,84E-02	1,72E-01
DG30	-0,44	0,24	6,59E-02	-0,10	0,32	7,39E-01	-0,32	0,19	9,72E-02	3,11E-01
DG7	0,40	0,24	8,72E-02	0,05	0,32	8,67E-01	0,28	0,19	1,44E-01	4,19E-01
DG32	-0,27	0,24	2,56E-01	-0,25	0,31	4,13E-01	-0,27	0,19	1,65E-01	4,39E-01
DG26	-0,11	0,24	6,48E-01	-0,47	0,31	1,26E-01	-0,25	0,19	1,98E-01	4,87E-01
DG17	-0,21	0,24	3,71E-01	-0,16	0,31	5,99E-01	-0,19	0,19	3,07E-01	6,33E-01
DG5	-0,23	0,22	3,00E-01	-0,09	0,30	7,69E-01	-0,18	0,18	3,16E-01	6,33E-01
DG4	-0,23	0,23	3,10E-01	-0,09	0,31	7,72E-01	-0,18	0,18	3,26E-01	6,33E-01
DG23	-0,46	0,24	5,26E-02	0,29	0,31	3,45E-01	-0,18	0,19	3,36E-01	6,33E-01
DG18	0,29	0,24	2,19E-01	-0,04	0,31	9,04E-01	0,17	0,19	3,70E-01	6,33E-01
DG24	-0,19	0,24	4,34E-01	-0,13	0,31	6,86E-01	-0,16	0,19	3,89E-01	6,33E-01
DG6	0,02	0,24	9,42E-01	0,37	0,31	2,30E-01	0,15	0,19	4,34E-01	6,33E-01
DG10	-0,12	0,24	6,17E-01	-0,20	0,32	5,33E-01	-0,15	0,19	4,41E-01	6,33E-01
DG20	-0,04	0,24	8,57E-01	-0,30	0,30	3,21E-01	-0,14	0,19	4,52E-01	6,33E-01
DG2	-0,20	0,24	4,03E-01	-0,05	0,32	8,84E-01	-0,14	0,19	4,55E-01	6,33E-01
DG8	0,05	0,23	8,28E-01	0,27	0,31	3,89E-01	0,13	0,19	4,93E-01	6,58E-01
DG13	-0,01	0,24	9,62E-01	0,30	0,31	3,26E-01	0,10	0,19	5,81E-01	7,43E-01
DG1	0,22	0,24	3,50E-01	-0,18	0,31	5,63E-01	0,07	0,19	6,98E-01	8,36E-01
DG22	0,17	0,24	4,85E-01	-0,48	0,31	1,25E-01	-0,07	0,19	7,06E-01	8,36E-01
DG28	-0,19	0,24	4,23E-01	0,17	0,31	5,94E-01	-0,06	0,19	7,50E-01	8,36E-01
DG9	0,12	0,24	6,31E-01	-0,04	0,32	9,08E-01	0,06	0,19	7,57E-01	8,36E-01
DG3	0,17	0,22	4,31E-01	-0,19	0,29	5,22E-01	0,04	0,18	8,09E-01	8,63E-01
DG12	-0,16	0,23	4,78E-01	0,37	0,31	2,22E-01	0,03	0,19	8,61E-01	8,89E-01
DG11	-0,03	0,24	8,85E-01	0,03	0,31	9,28E-01	-0,01	0,19	9,53E-01	9,53E-01

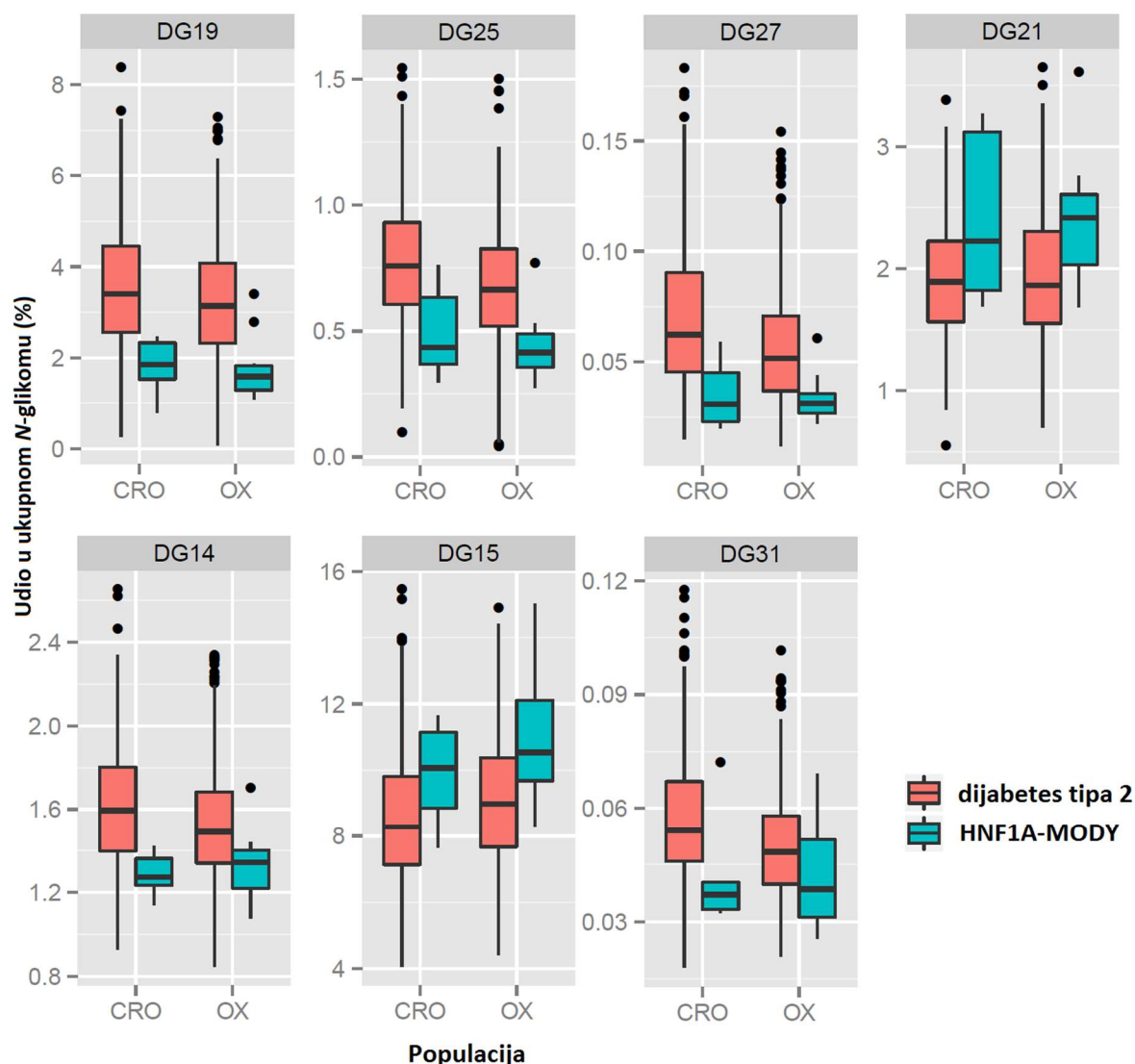


Slika 25 Razlike u udjelima individualnih desijaliziranih glikanskih grupa kod pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$) i pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A* ($n = 33$). Prikazane su samo statistički značajno različite desijalizirane glikanske grupe plazmatskih proteina, po redoslijedu značajnosti. Razlike su vizualizirane kao dijagrami pravokutnika (engl. *box plot*), gdje svaki pravokutnik predstavlja raspon od 25. do 75. percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Vanjske linije predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar $1,5 \times$ interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. *outliers*) su naznačene kružićima. DG – desijalizirani glikan; CRO – hrvatska populacija; OX – engleska (Oxford) populacija.

Kao i u slučaju netretiranih *N*-glikana ukupnih proteina plazme i kod analize desijaliziranih glikana je *HNF1A*-skupina pacijenata preinačena tako da uključuje samo osobe s *HNF1A* varijantama za koje je procijenjeno da su patogene i vjerojatno patogene, tj. da uzrokuju *HNF1A*-MODY ($n = 18$). Statističke analize ponovljene su na isti način, međutim u ovom su slučaju značajne razlike dobivene za sedam od ukupno 32 izravno mjerenih desijaliziranih glikanskih parametara (p -vrijednost $< 0,05$) (tablica 12). U ovom su se slučaju najznačajnijim glikanskim grupama pokazale DG19, DG25 i DG27. One pokazuju najbolju diskriminacijsku vrijednost dvije grupe pacijenata, i to s većim stupnjem značajnosti nego u slučaju kada su u *HNF1A*-grupu uvrštene sve varijante gena *HNF1A*: p (DG19_{patogene varijante}) = $1,07 \times 10^{-4}$ naspram p (DG19_{sve varijante}) = $2,02 \times 10^{-2}$; p (DG25_{patogene varijante}) = $1,03 \times 10^{-3}$ naspram p (DG25_{sve varijante}) = $8,37 \times 10^{-2}$; p (DG27_{patogene varijante}) = $4,52 \times 10^{-3}$ naspram p (DG27_{sve varijante}) = $1,08 \times 10^{-1}$. Kao i ranije, pacijenti s *HNF1A*-MODY-em imaju značajno niže razine navedenih glikana u usporedbi s pacijentima s ranim nastupom dijabetesa tipa 2. Slika 26 prikazuje statistički značajne razlike u udjelima pojedinačnih glikanskih grupa između opisanih skupina pacijenata.

Tablica 12 Usporedba desijaliniziranog *N*-glikoma plazmatskih proteina pacijenata s patogenim varijantama gena *HNF1A*, odnosno HNF1A-MODY-em i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2, zasebno u engleskoj i hrvatskoj populaciji, te meta-analiza obje populacije. Prikazano je kretanje promjena glikanskih vrijednosti (efekt), standardna pogreška (SE) i *p*-vrijednosti. Statistički značajnom se smatra *p*-vrijednost < 0,05 (označene podebljano).

GLIKAN	ENGLESKA			HRVATSKA			META-ANALIZA			
	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	efekt	SE	<i>p</i> -vrijednost	prilagođena <i>p</i> -vrijednost
DG19	-1,16	0,31	2,30E-04	-1,18	0,42	4,70E-03	-1,17	0,25	3,35E-06	1,07E-04
DG25	-1,00	0,31	1,46E-03	-1,02	0,42	1,53E-02	-1,01	0,25	6,46E-05	1,03E-03
DG27	-0,82	0,31	9,10E-03	-1,02	0,42	1,57E-02	-0,89	0,25	4,24E-04	4,52E-03
DG21	0,70	0,31	2,35E-02	1,12	0,42	8,41E-03	0,85	0,25	7,42E-04	5,69E-03
DG14	-0,75	0,32	1,84E-02	-1,01	0,42	1,65E-02	-0,84	0,25	9,21E-04	5,69E-03
DG15	0,85	0,31	5,83E-03	0,76	0,43	7,35E-02	0,82	0,25	1,07E-03	5,69E-03
DG31	-0,51	0,31	1,01E-01	-1,01	0,43	1,73E-02	-0,69	0,25	6,54E-03	2,99E-02
DG16	0,31	0,32	3,33E-01	1,12	0,42	7,80E-03	0,61	0,25	1,76E-02	7,04E-02
DG32	-0,55	0,32	8,21E-02	-0,65	0,42	1,21E-01	-0,59	0,25	2,09E-02	7,44E-02
DG26	-0,34	0,32	2,83E-01	-0,92	0,42	2,76E-02	-0,55	0,25	2,95E-02	9,45E-02
DG7	0,79	0,31	1,10E-02	0,01	0,43	9,83E-01	0,52	0,25	3,92E-02	1,14E-01
DG23	-0,90	0,32	4,52E-03	0,45	0,43	2,85E-01	-0,42	0,25	1,01E-01	2,54E-01
DG6	0,34	0,32	2,77E-01	0,53	0,42	2,09E-01	0,41	0,25	1,07E-01	2,54E-01
DG11	0,21	0,32	5,10E-01	0,76	0,42	7,29E-02	0,41	0,25	1,11E-01	2,54E-01
DG8	0,36	0,31	2,44E-01	0,39	0,42	3,59E-01	0,37	0,25	1,41E-01	3,02E-01
DG24	-0,30	0,32	3,38E-01	-0,43	0,42	3,02E-01	-0,35	0,25	1,69E-01	3,38E-01
DG29	-0,23	0,32	4,60E-01	-0,52	0,42	2,18E-01	-0,34	0,25	1,87E-01	3,52E-01
DG30	-0,31	0,32	3,22E-01	-0,31	0,43	4,67E-01	-0,31	0,26	2,22E-01	3,95E-01
DG13	0,07	0,31	8,19E-01	0,59	0,42	1,61E-01	0,26	0,25	3,11E-01	5,03E-01
DG22	0,01	0,32	9,67E-01	-0,73	0,42	8,27E-02	-0,26	0,26	3,14E-01	5,03E-01
DG10	-0,15	0,32	6,42E-01	-0,33	0,43	4,36E-01	-0,21	0,26	4,06E-01	6,18E-01
DG18	0,24	0,31	4,46E-01	0,03	0,42	9,35E-01	0,16	0,25	5,13E-01	7,27E-01
DG12	-0,56	0,31	6,94E-02	0,56	0,41	1,71E-01	-0,16	0,25	5,22E-01	7,27E-01
DG20	0,06	0,32	8,38E-01	-0,45	0,41	2,72E-01	-0,13	0,25	6,11E-01	8,15E-01
DG28	-0,22	0,31	4,73E-01	0,10	0,43	8,13E-01	-0,11	0,25	6,62E-01	8,47E-01
DG17	-0,16	0,32	6,07E-01	0,03	0,42	9,47E-01	-0,09	0,25	7,15E-01	8,54E-01
DG3	0,17	0,29	5,61E-01	-0,53	0,40	1,74E-01	-0,08	0,23	7,37E-01	8,54E-01
DG9	0,15	0,32	6,29E-01	-0,04	0,43	9,18E-01	0,08	0,26	7,48E-01	8,54E-01
DG1	0,28	0,31	3,65E-01	-0,69	0,42	9,64E-02	-0,07	0,25	7,87E-01	8,69E-01
DG5	0,04	0,29	8,95E-01	0,09	0,41	8,26E-01	0,06	0,24	8,15E-01	8,70E-01
DG2	-0,10	0,32	7,50E-01	0,10	0,43	8,12E-01	-0,03	0,26	9,10E-01	9,40E-01
DG4	-0,03	0,30	9,20E-01	0,03	0,42	9,34E-01	-0,01	0,24	9,74E-01	9,74E-01



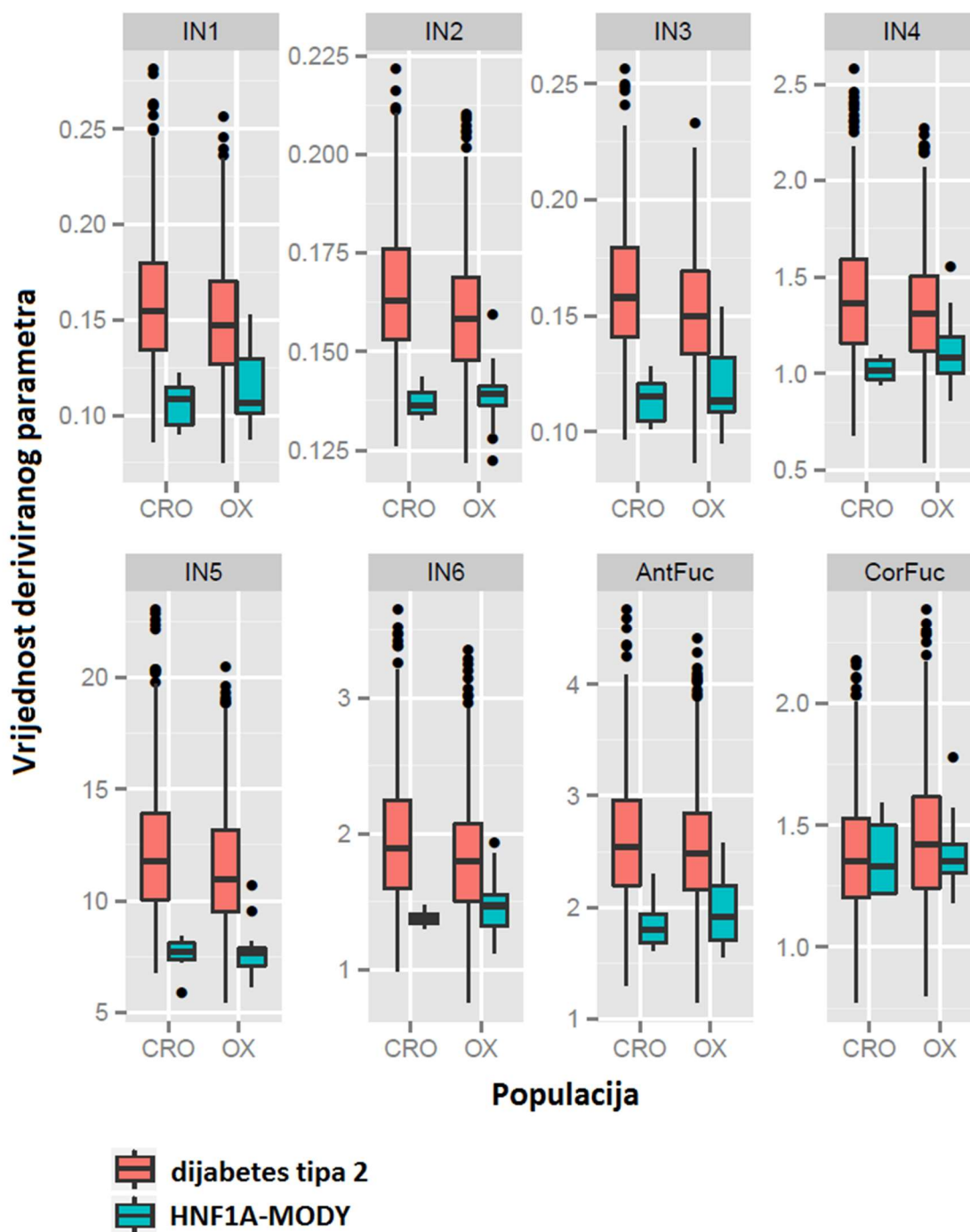
Slika 26 Razlike u udjelima individualnih desijaliniziranih glikanskih grupa kod pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$) i pacijenata s patogenim varijantama gena *HNF1A*, odnosno HNF1A-MODY-em ($n = 18$). Prikazane su samo statistički značajno različite desijalinizirane glikanske grupe plazmatskih proteina, po redoslijedu značajnosti. Razlike su vizualizirane kao dijagrami pravokutnika (engl. *box plot*), gdje svaki pravokutnik predstavlja raspon od 25. do 75. percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Vanjske linije predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar 1,5 x interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. *outliers*) su naznačene kružićima. DG – desijalinizirani glikan; CRO – hrvatska populacija; OX – engleska (Oxford) populacija.

4.3.3. Derivirani parametri fukozilacije u *HNFI1A-MODY-u*

Derivirani parametri fukozilacije plazmatskih proteina izvedeni su iz podataka o udjelima pojedinačnih kromatografskih pikova netretiranih *N*-glikana u ukupnoj površini kromatograma (odnosno u ukupnom *N*-glikomu plazmatskih proteina). Opis izračuna osam deriviranih parametara dostupan je u tablici 5, poglavlje 3.3.2.5. Statističkim metodama, odnosno općim linearnim modelom uspoređivane su srednje vrijednosti deriviranih parametara pacijenata s patogenim varijantama gena *HNFI1A* ($n = 18$) i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$). Statistički značajne razlike dobivene su za sedam od ukupno osam izvedenih parametara fukozilacije (p -vrijednost $< 0,05$) (tablica 13). Dakle, svi derivirani parametri fukozilacije, izuzev parametra koji opisuje sržnu fukozilaciju, statistički su značajno različiti kod pacijenata s *HNFI1A-MODY-em*, u usporedbi s pacijentima s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 (tablica 13, slika 27), te dobro razlikuju ove dvije skupine pacijenata. Indeks_5, koji predstavlja omjer antenarno i sržno fukoziliranih tetraantenarnih struktura u ukupnom *N*-glikomu plazmatskih proteina, pokazuje najbolju moć razlikovanja *HNFI1A-MODY-a* od dijabetesa tipa 2 s ranim nastupom, te u tome nadmašuje i glikansku grupu GP30, najboljeg diskriminatora opisanih skupina pacijenta od svih izravno mjerenih glikanskih parametara: p (GP30_{patogene varijante}) = $4,32 \times 10^{-7}$ naspram p (IN5_{patogene varijante}) = $9,36 \times 10^{-9}$.

Tablica 13 Usporedba deriviranih parametara fukozilacije plazmatskih proteina, izvedenih iz izravno mjerenih glikanskih parametara, pacijenata s patogenim varijantama gena *HNFI1A*, odnosno *HNFI1A-MODY-em* i pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2, zasebno u engleskoj i hrvatskoj populaciji, te meta-analiza obje populacije. Prikazano je kretanje promjena deriviranih parametara (efekt), standardna pogreška (SE) i p -vrijednosti. Statistički značajnom se smatra p -vrijednost $< 0,05$ (označene podebljano).

DERIVIRANI PARAMETAR	ENGLESKA			HRVATSKA			META-ANALIZA			
	efekt	SE	p - vrijednost	efekt	SE	p - vrijednost	efekt	SE	p - vrijednost	prilagođena p -vrijednost
Indeks_5	-1,40	0,30	3,80E-06	-1,64	0,38	1,35E-05	-1,49	0,23	1,99E-10	9,36E-09
Indeks_3	-1,06	0,31	5,42E-04	-1,51	0,38	7,41E-05	-1,23	0,24	2,12E-07	3,06E-06
Indeks_2	-1,10	0,30	2,54E-04	-1,37	0,38	3,21E-04	-1,20	0,24	3,26E-07	3,06E-06
Indeks_1	-1,01	0,31	9,82E-04	-1,46	0,38	1,29E-04	-1,19	0,24	6,54E-07	5,12E-06
AntFuc	-0,86	0,31	5,39E-03	-1,15	0,38	2,44E-03	-0,97	0,24	4,76E-05	2,24E-04
Indeks_6	-0,72	0,31	1,97E-02	-1,21	0,39	1,80E-03	-0,91	0,24	1,67E-04	6,03E-04
Indeks_4	-0,61	0,31	4,79E-02	-1,18	0,39	2,22E-03	-0,84	0,24	5,58E-04	1,87E-03
CorFuc	-0,11	0,31	7,16E-01	0,29	0,38	4,47E-01	0,05	0,24	8,44E-01	9,02E-01



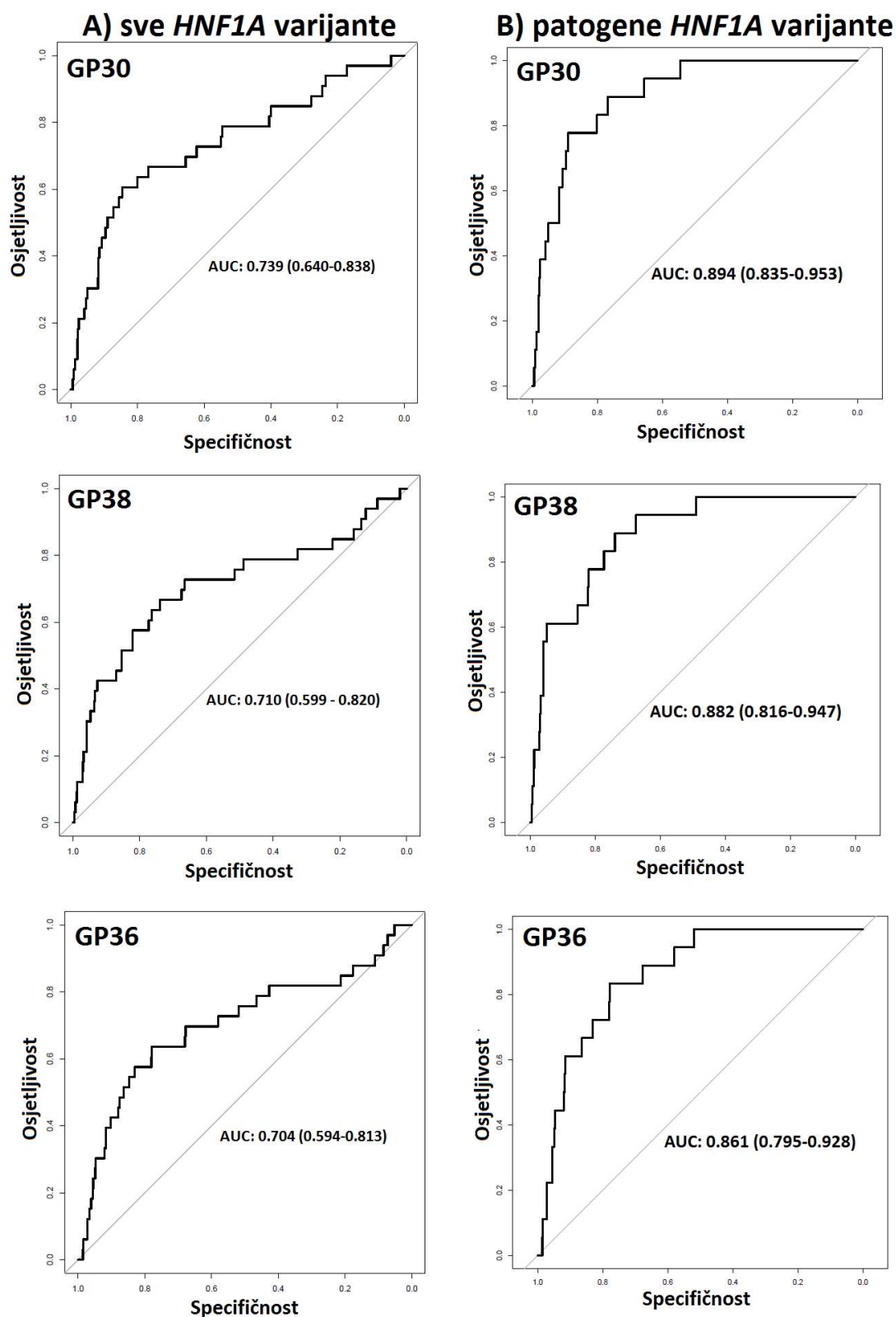
Slika 27 Razlike u vrijednostima deriviranih parametara fukozilacije kod pacijenata s ranim nastupom dijabetesa tipa 2 ($n = 945$) i pacijenata s patogenim varijantama gena *HNF1A*, odnosno HNF1A-MODY-em ($n = 18$). Svi derivirani parametri koji opisuju fukozilaciju plazmatskih proteina, izuzev sržne fukozilacije (CorFuc), statistički se značajno razlikuju među ispitivanim skupinama pacijenata. Razlike su vizualizirane kao dijagrami pravokutnika (engl. *box plot*), gdje svaki pravokutnik predstavlja raspon od 25. do 75. percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Vanjske linije predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar 1,5 x interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. *outliers*) su naznačene kružićima. AntFuc – antenarna fukozilacija; CorFuc – sržna fukozilacija; IN – indeks; CRO – hrvatska populacija; OX – engleska (Oxford) populacija.

4.3.4. Razlikovanje *HNFI1A-MODY-a* od dijabetesa tipa 2 korištenjem glikanskih parametara

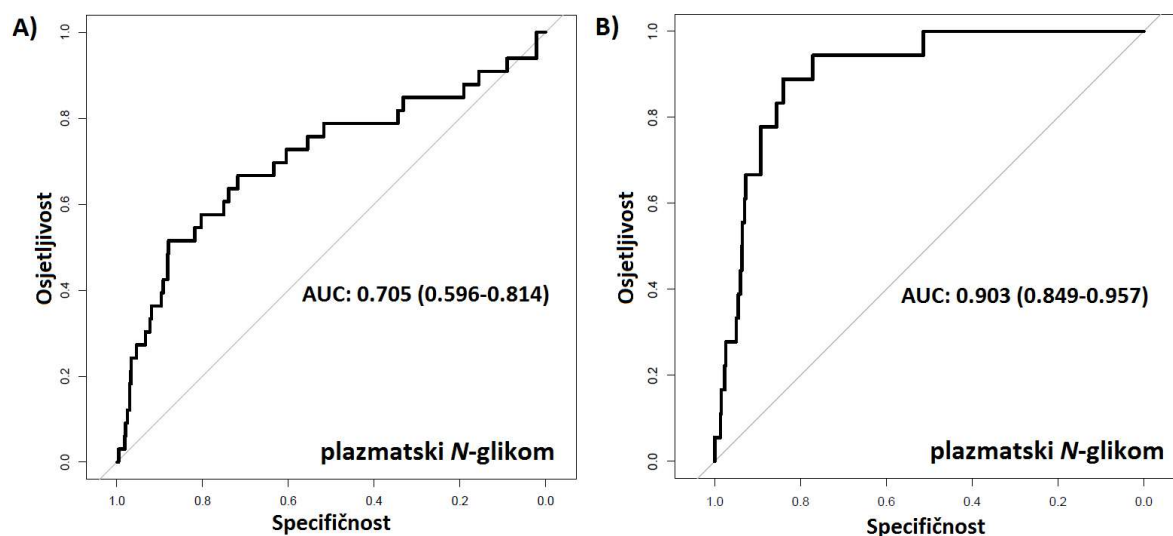
4.3.4.1. Klasifikacija dijabetesa pomoću *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina

Ispitivanje uspješnosti klasifikacije, odnosno previđanja statusa bolesti (u ovom slučaju *HNFI1A-MODY-a*), korištenjem podataka dobivenih profiliranjem *N*-glikana provedeno je pomoću ROC krivulje. Najprije je ispitana diskriminacijska točnost individualnih glikanskih grupa (GP). U tu je svrhu korištena linearna regresija, točnije bivarijantna regresijska analiza klasifikacije. Učinkovitost klasifikacije dijabetesa korištenjem individualnih glikana (GP) kao biljega ispitana je uspoređivanjem njihove razine kod pacijenata bez *HNFI1A* varijante ($n = 945$) i pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNFI1A* ($n = 33$), odnosno pacijenata s isključivo patogenim i vjerojatno patogenim *HNFI1A* varijantama ($n = 18$). U oba su se slučaja najboljim diskriminatorima pokazale glikanske strukture u pikovima GP30, GP38 i GP36, od svih ispitanih individualnih glikanskih pikova (slika 28). Kao i u prethodnom poglavlju, glikani pokazuju veću vrijednost u razlikovanju isključivo patogenih *HNFI1A* varijanti: $AUC (GP30_{patogene\ varijante}) = 0,894$ (95 % CI 0,835 – 0,953) naspram $AUC (GP30_{sve\ varijante}) = 0,739$ (95 % CI 0,640 – 0,838); $AUC (GP38_{patogene\ varijante}) = 0,882$ (95 % CI 0,816 – 0,947) naspram $AUC (GP38_{sve\ varijante}) = 0,710$ (95 % CI 0,599 – 0,820); $AUC (GP36_{patogene\ varijante}) = 0,861$ (95 % CI 0,795 – 0,928) naspram $AUC (GP36_{sve\ varijante}) = 0,704$ (95 % CI 0,594 – 0,813). Svaki prethodno spomenuti glikanski pik sadrži antenarno fukozilirani *N*-glikan. Uočeni glikanski obrasci su sukladni rezultatima prethodne studije²¹ i poznatom utjecaju *HNFI1 α* na fukozilaciju proteina.

Nadalje, uz individualne glikanske grupe, ispitana je i učinkovitost klasifikacije dijabetesa pomoću ukupnog *N*-glikoma plazmatskih proteina (svih 42 individualnih glikanskih parametara su korišteni kao prediktori). To je napravljeno izgradnjom prediktivnog statističkog modela korištenjem regularizirane logističke regresije, kako bi se konstruirao algoritam za najučinkovitije razlikovanje dviju grupa pacijenata. ROC krivulja izrađena je korištenjem opisanog algoritma. Postupak je ponovljen dvaput; prvi put uspoređivanjem pacijenata bez *HNFI1A* varijanti i pacijenata s rijetkim *HNFI1A* varijantama, a drugi put usporedbom samo s pacijentima s isključivo patogenim i vjerojatno patogenim varijantama (slika 29). Dodavanjem ukupnog plazmatskog *N*-glikoma u klasifikacijski model dobivena je bolja moć diskriminacije pacijenata s dijabetesom tipa 2 ranog nastupa od pacijenata s *HNFI1A-MODY-em*, nego kad se za navedenu diskriminaciju koristi samo jedan glikanski parametar. I u ovom slučaju glikani pokazuju veću uspješnost u razlikovanju isključivo patogenih *HNFI1A* varijanti (slika 29).



Slika 28 ROC krivulje prikazuju učinkovitost individualnih glikanskih skupina (GP30, GP38 i GP36) u razlikovanju: A) pacijenata s rijetkim *HNF1A* varijantama; B) pacijenata s isključivo patogenim *HNF1A* varijantama među pacijentima s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa (prije 45. godine života). ROC krivulje su dobivene bivarijantnom regresijskom klasifikacijskom analizom. GP – glikanski pik, AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*).



Slika 29 ROC krivulje prikazuju učinkovitost ukupnog *N*-glikoma plazmatskih proteina u razlikovanju: A) pacijenata s rijetkim *HNF1A* varijantama; B) pacijenata s isključivo patogenim *HNF1A* varijantama među pacijentima s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa (prije 45. godine života). *N*-glikom plazmatskih proteina pokazuje veću uspješnost u razlikovanju isključivo patogenih *HNF1A* varijanti (dio B). ROC krivulje su dobivene regulariziranom logističkom regresijom koja uključuje sve glikanske parametre u klasifikacijski model. AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*).

4.3.4.2. Klasifikacija dijabetesa pomoću desijaliniziranih *N*-glikana plazmatskih proteina

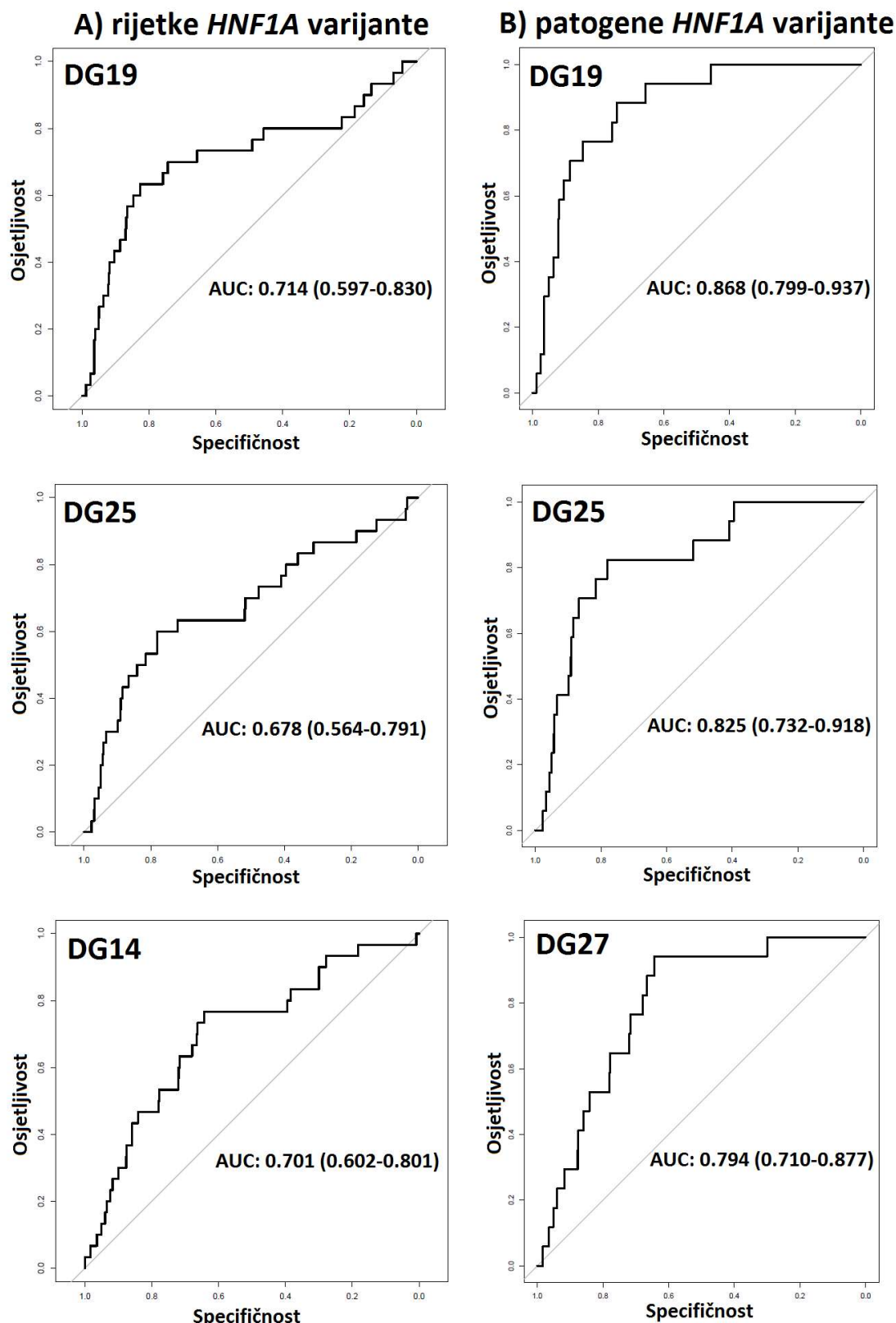
Ispitana je i vrijednost desijaliniziranih *N*-glikana ukupnih proteina plazme kao biljega HNF1A-MODY-a, odnosno njihova uspješnost klasifikacije dijabetesa. Najprije je ispitana uspješnost razlikovanja podtipova dijabetesa koristeći individualne desijalinizirane glikanske grupe (DG) linearnom regresijom, točnije bivarijantnom regresijskom analizom klasifikacije. Uspješnost potencijalnih biljega ispitana je usporedbom njihovih razina kod pacijenata bez *HNF1A* varijante ($n = 945$) i pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A* ($n = 33$), odnosno pacijenata s isključivo patogenim i vjerojatno patogenim *HNF1A* varijantama ($n = 18$). U oba su se slučaja najboljim diskriminatorima pokazale desijalinizirane glikanske strukture u pikovima DG19 i DG25, od svih ispitanih individualnih desijaliniziranih glikana (slika 31). Uz navedene glikanske grupe, zadovoljavajuću moć razlikovanja podtipova dijabetesa pokazuju još i DG14 (za sve rijetke *HNF1A* varijante) i DG27 (za isključivo patogene *HNF1A* varijante). I nakon desijalinizacije glikani pokazuju veću moć razlikovanja isključivo patogenih *HNF1A* varijanti: $AUC (DG19_{patogene\ varijante}) = 0,868$ (95 % CI 0,799 – 0,937) naspram $AUC (DG19_{sve\ varijante}) = 0,714$ (95 % CI 0,597 – 0,830); $AUC (DG25_{patogene\ varijante}) = 0,825$ (95 % CI 0,732 – 0,918) naspram $AUC (DG25_{sve\ varijante}) = 0,678$ (95 % CI 0,564 – 0,791). I u slučaju desijaliniziranih struktura najuspješniji klasifikatori dijabetesa sadrže antenarno fukozilirani *N*-glikan. Uz

navedeno, potrebno je i spomenuti da najuspješnija desijalinizirana glikanska grupa DG19 ipak pokazuje nešto slabiju klasifikacijsku sposobnost u odnosu na najbolju netretiranu glikansku grupu GP30; $AUC(DG19_{patogene\ varijante}) = 0,868$ (95 % CI 0,799 – 0,937) naspram $AUC(GP30_{patogene\ varijante}) = 0,894$ (95 % CI 0,835 – 0,953).

Kao i prethodno, uz individualne desijalinizirane glikanske grupe, ispitana je i učinkovitost klasifikacije dijabetesa pomoću ukupnog desijaliniziranog *N*-glikoma plazmatskih proteina (svih 32 individualnih desijaliniziranih parametara su korišteni kao prediktori). Analiza je provedena izgradnjom prediktivnog statističkog modela korištenjem regularizirane logističke regresije, kako bi se konstruirao algoritam za najučinkovitije razlikovanje dviju grupa pacijenata, čega je rezultat ROC krivulja. Postupak je ponovljen za dva uvjeta; prvo uspoređivanjem pacijenata bez *HNF1A* varijanti s pacijentima s rijetkim *HNF1A* varijantama, a drugi put usporedbom s pacijentima s isključivo patogenim i vjerojatno patogenim varijantama (slika 31). Uključivanjem ukupnog desijaliniziranog plazmatskog *N*-glikoma u klasifikacijski model dobivena je zadovoljavajuća moć diskriminacije pacijenata s dijabetesom tipa 2 ranog nastupa od pacijenata s *HNF1A*-MODY-em, međutim jedino individualni desijalinizirani glikanski parametar DG19 pokazuje još bolju moć diskriminacije *HNF1A*-MODY pacijenata: $AUC(DG_{patogene\ varijante}) = 0,845$ (95 % CI 0,767 – 0,923) naspram $AUC(DG19_{patogene\ varijante}) = 0,868$ (95 % CI 0,799 – 0,937). Ukupni desijalinizirani plazmatski *N*-glikom ipak pokazuje veću učinkovitost razlikovanja dviju skupina pacijenata u usporedbi sa svim ostalim individualnim desijaliniziranim parametrima. I u slučaju desijaliniziranih glikana, veća je uspješnost u razlikovanju isključivo patogenih *HNF1A* varijanti: $AUC(DG_{patogene\ varijante}) = 0,845$ (95 % CI 0,767 – 0,923) naspram $AUC(DG_{sve\ varijante}) = 0,670$ (95 % CI 0,551 – 0,790).

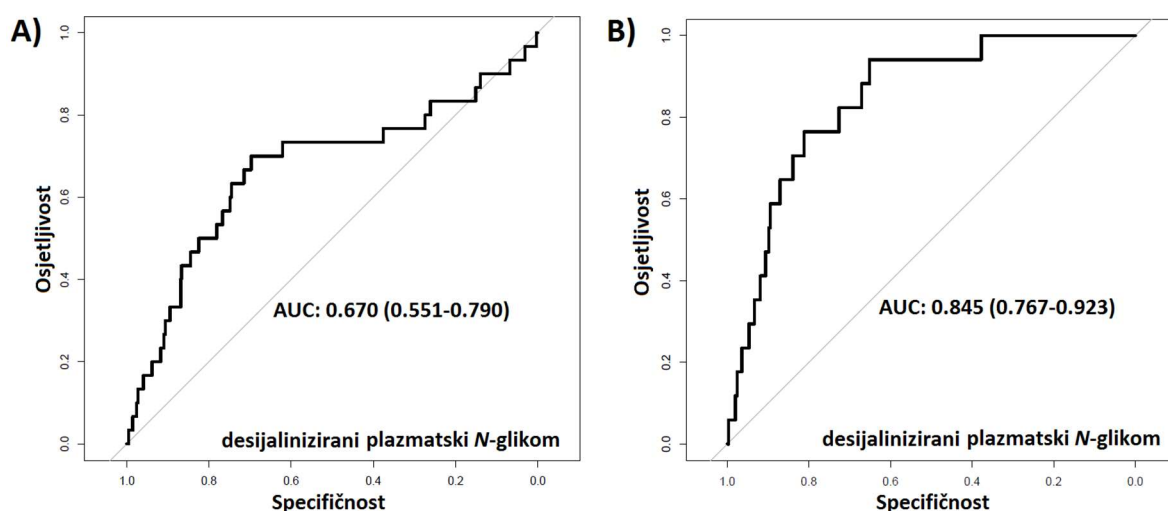
4.3.4.3. Klasifikacija dijabetesa pomoću deriviranih parametara fukozilacije

Završno, ispitana je i uspješnost klasifikacije dijabetesa korištenjem deriviranih parametara fukozilacije. Naime, ispitana je diskriminacijska točnost individualnih deriviranih parametara izvedenih iz udjela površine netretiranih glikanskih pikova (GP) u ukupnom *N*-glikomu, metodom linearne regresije. Uspješnost klasifikacije dijabetesa korištenjem deriviranih parametara kao biljega ispitana je njihovom usporedbom kod pacijenata bez *HNF1A* varijante ($n = 945$) i pacijenata s isključivo patogenim i vjerojatno patogenim *HNF1A* varijantama ($n =$



Slika 30 ROC krivulje prikazuju učinkovitost individualnih desijaliniziranih glikanskih skupina (DG19, DG25, DG14 i DG27) u razlikovanju: A) pacijenata s rijetkim *HNF1A* varijantama; B) pacijenata s isključivo patogenim *HNF1A* varijantama među pacijentima s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa (prije 45. godine života). ROC krivulje su rezultat bivarijantne regresijske klasifikacijske analize. DG – desijalinizirani glikan, AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*).

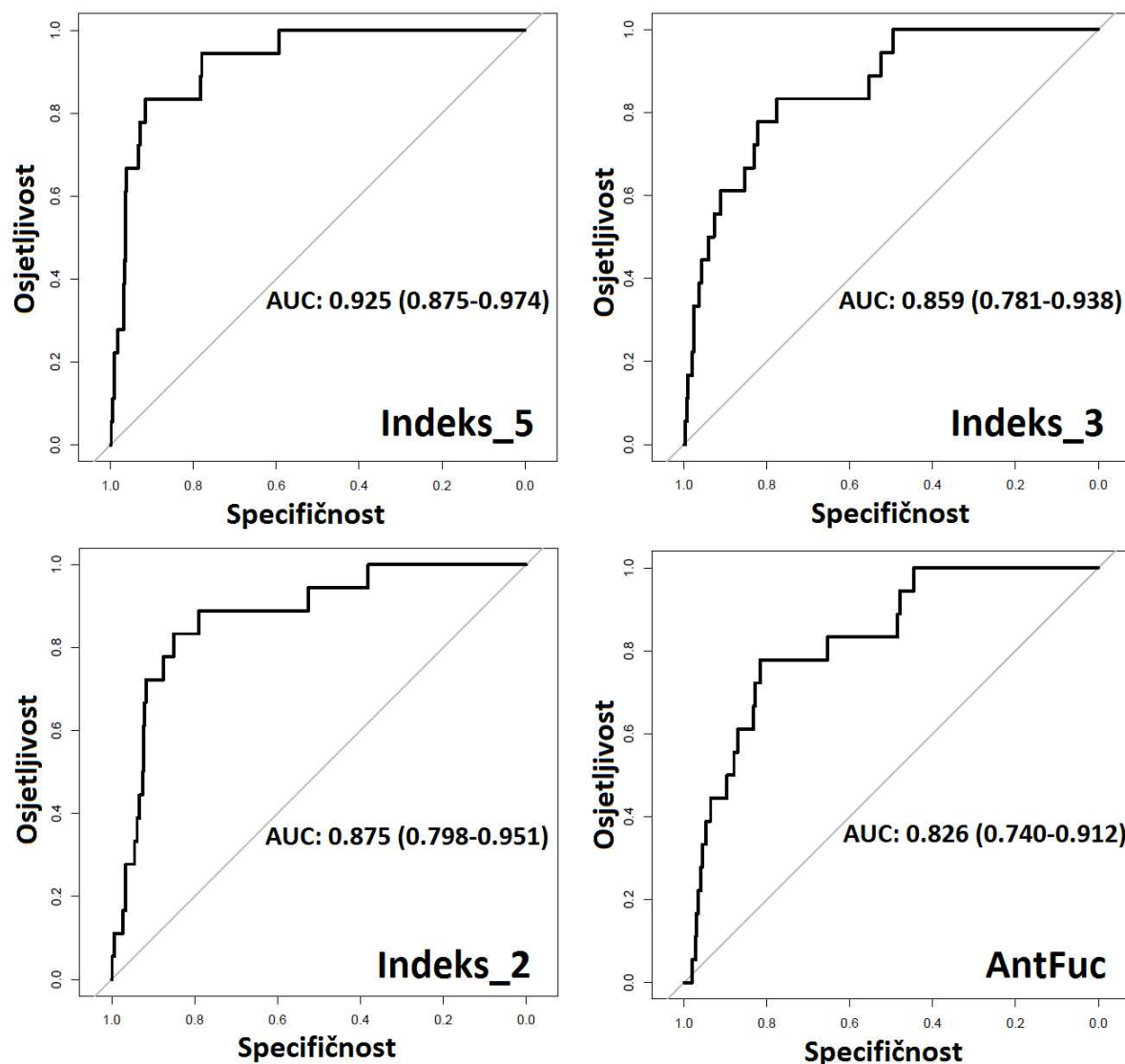
18). Svi su se derivirani parametri (izuzev parametra koji opisuje sržnu fukozilaciju) pokazali uspješnim u razlikovanju pacijenata s HNF1A-MODY-em od pacijenata s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa, s rasponom površina ROC krivulja $AUC = 0,777 - 0,925$ (tablica 14, slika 32). Nadalje, najboljim diskriminatorom pokazao se Indeks_5, koji predstavlja omjer antenarno i sržno fukoziliranih tetraantenarnih struktura u ukupnom *N*-glikomu plazmatskih proteina, čija rezultatna ROC krivulja pokazuje $AUC (Indeks_5) = 0,925$ (95 % CI 0,875 – 0,974). Navedeni rezultat čini Indeks_5 najuspješnijim klasifikatorom dijabetesa među svim glikanskim parametrima.



Slika 31 ROC krivulje prikazuju učinkovitost ukupnog desijaliniziranog *N*-glikoma plazmatskih proteina u razlikovanju: A) pacijenata s rijetkim *HNF1A* varijantama; B) pacijenata s isključivo patogenim *HNF1A* varijantama među pacijentima s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa (prije 45. godine života). Desijalinizirani *N*-glikom plazmatskih proteina pokazuje veću uspješnost u razlikovanju isključivo patogenih *HNF1A* varijanti (dio B). ROC krivulje su rezultat regularizirane logističke regresijske analize koja uključuje sve desijalinizirane glikanske parametre u klasifikacijski model. AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*).

Tablica 14 Površine ispod krivulje (AUC) izvedene iz ROC krivulja koje opisuju diskriminacijsku točnost deriviranih parametara fukozilacije za razlikovanje HNF1A-MODY-a od dijabetesa tipa 2.

<i>Derivirani parametar</i>	<i>AUC (95 % CI)</i>
<i>Indeks_1</i>	0,848 (0,767 – 0,929)
<i>Indeks_2</i>	0,875 (0,798 – 0,951)
<i>Indeks_3</i>	0,859 (0,781 – 0,938)
<i>Indeks_4</i>	0,777 (0,690 – 0,864)
<i>Indeks_5</i>	0,925 (0,875 – 0,974)
<i>Indeks_6</i>	0,802 (0,729 – 0,876)
<i>AntFuc</i>	0,826 (0,740 – 0,912)
<i>CoreFuc</i>	0,538 (0,433 – 0,643)



Slika 32 ROC krivulje prikazuju učinkovitost deriviranih parametara fukozilacije (Indeks_5, Indeks_3, Indeks_2 i AntFuc) u razlikovanju pacijenata s isključivo patogenim i vjerojatno patogenim *HNF1A* varijantama među pacijentima s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa (prije 45. godine života). ROC krivulje su rezultat bivarijantne regresijske klasifikacijske analize. AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*).

4.3.5. Klinički potencijal glikanskih biljega

Dobivene klasifikacijske sposobnosti glikanskih biljega pobliže su istražene, kako bi se ispitao njihov klinički potencijal. Ova je procjena provedena samo za najuspješniju izravno mjerenu individualnu glikansku grupu GP30 te za najuspješniji derivirani parametar fukozilacije Indeks_5. Premda je ukupni *N*-glikom plazmatskih proteina bolje klasificirao različite oblike dijabetesa nego bilo koja individualna glikanska grupa, zbog kompleksnosti statističke manipulacije podacima odlučeno je ipak ispitati jednostavnije i izravnije glikanske parametre.

Analizom ROC krivulje glikanskog pika GP30 utvrđeno je da dijagnostički optimalna vrijednost ovog glikanskog parametra iznosi 0,73. Navedena granična vrijednost (engl. *cut-off*) pruža optimalno razlučivanje pacijenata s HNF1A-MODY oblikom dijabetesa od pacijenata s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa, pokazujući osjetljivost (stopu stvarno pozitivnih) od 89 % i specifičnost (stopu stvarno negativnih) od 77 %. U ovom konkretnom slučaju, promatrajući ispitivanu populaciju, ukoliko bi se kao granična vrijednost upotrijebio GP30 = 0,73, propustio bi se samo jedan pacijent s patogenom i jedan pacijent s vjerojatno patogenom *HNF1A* varijantom, od ukupno 18 pacijenata oboljelih od HNF1A-MODY-a, što rezultira osjetljivošću od 89 %. Nadalje, ukoliko bi se GP30 upotrijebio kao alatka za stratifikaciju pacijenata (uvjet za dijagnostičko sekvenciranje: GP30 < 0,73), prenoseći na ovu ispitivanu populaciju, navedeno bi značilo sekvenciranje gena *HNF1A* kod 250 pacijenata (26 % ispitivane kohorte), a rezultiralo identifikacijom 21 pacijenta nositelja rijetke *HNF1A* varijante (mutacije). Nadalje, to bi značilo identifikaciju 16 pacijenata s inaktivirajućim mutacijama (patogene *HNF1A* varijante), tri pacijenta s benignim mutacijama i dva pacijenta s varijantama nepoznatog značaja (VUS).

Analogno, analizom ROC krivulje deriviranog parametra fukozilacije Indeksa_5 utvrđeno je da dijagnostički optimalna vrijednost ovog deriviranog glikanskog parametra iznosi 8,41. Ova granična vrijednost pruža optimalno razlučivanje pacijenata s HNF1A-MODY oblikom dijabetesa od pacijenata s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa, pokazujući osjetljivost od 83 % i specifičnost od 91,5 %. U ovom konkretnom slučaju, promatrajući ispitivanu populaciju, ako se kao granična vrijednost uzme Indeks_5 = 8,41, propustio bi se samo jedan pacijent s patogenom i dva pacijenta s vjerojatno patogenom *HNF1A* varijantom, od ukupno 18 pacijenata oboljelih od HNF1A-MODY-a, što rezultira osjetljivošću od 83 %. Nadalje, ukoliko bi se Indeks_5 upotrijebio kao alatka probira pacijenata (uvjet za dijagnostičko sekvenciranje: Indeks_5 < 8,41), to bi značilo sekvenciranje gena *HNF1A* kod 103 pacijenata (11 % ispitivane kohorte), a rezultiralo identifikacijom 19 pacijenata nositelja rijetke *HNF1A* varijante (mutacije). Nadalje, navedeno bi značilo identifikaciju 15 pacijenata s inaktivirajućim mutacijama (patogene *HNF1A* varijante), dva pacijenta s benignim mutacijama i jednog pacijenta s varijantom nepoznatog značaja (VUS).

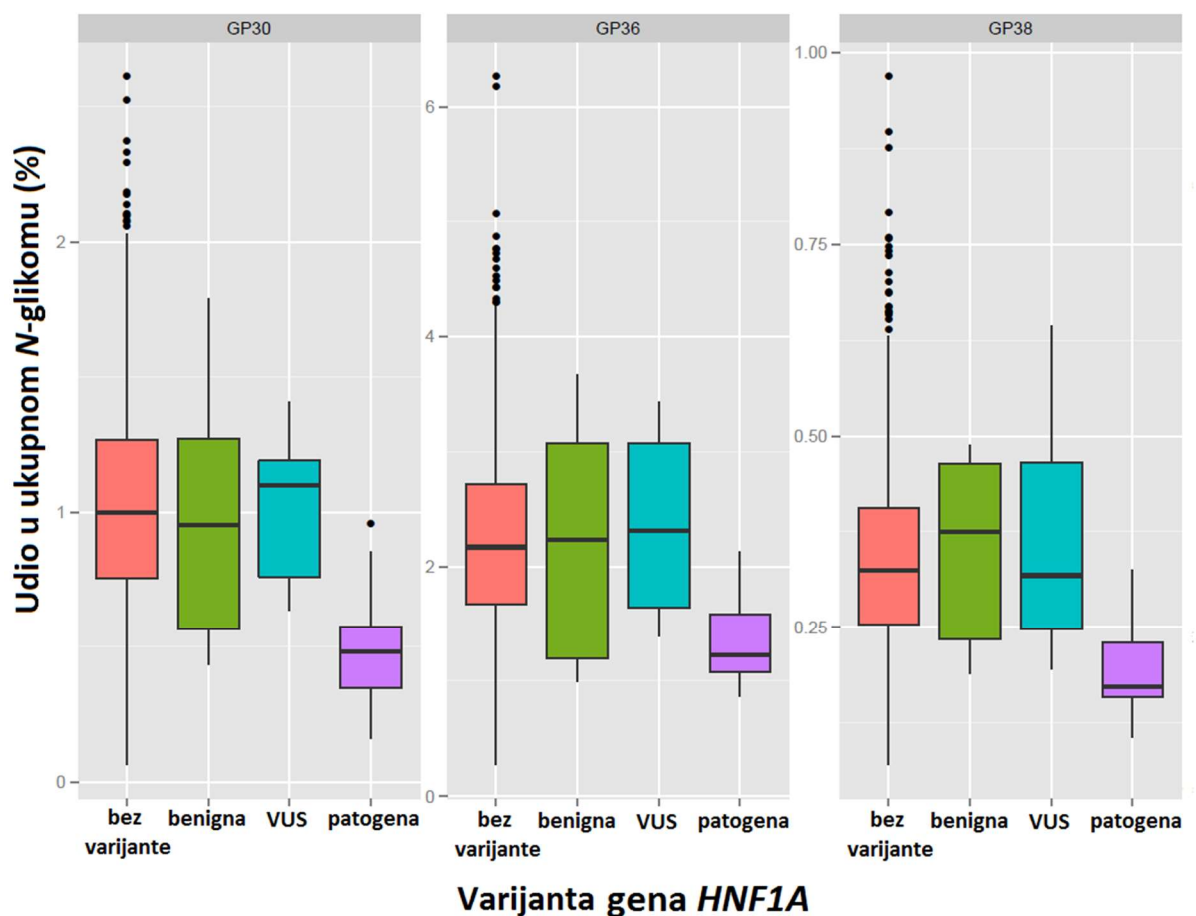
Naprotiv, ukoliko bi se koristio kriterij nastupa dijabetesa u dobi < 25 godina, što je trenutno jedan od glavnih kliničkih kriterija za dijagnostiku HNF1A-MODY-a, u ovoj bi se populaciji pacijenata identificiralo samo devet pacijenata s inaktivirajućim mutacijama, od ukupno 18, što

rezultira osjetljivošću od 50 %. Također, ako bi se nastup dijabetesa prije 25. godine života uzeo kao kriterij za dijagnostičko sekvenciranje, u ovom konkretnom slučaju to bi značilo da bi se gen *HNF1A* sekvencirao kod 102 pacijenta (11 % ispitivane populacije), pri čemu bi se identificiralo devet pacijenata s inaktivirajućim mutacijama (patogene *HNF1A* varijante) i jedan pacijent s varijantom nepoznatog značaja (VUS), dok bi se ostalih 25 pacijenata s rijetkim varijantama *HNF1A* gena propustilo sekvencirati, a time i dijagnosticirati.

4.3.6. Glikani kao biljezi funkcije rijetkih varijanti gena *HNF1A*

GP30, najbolji izravno mjereni individualni glikanski biljeg, značajno je niži kod pacijenata s patogenim i vjerojatno patogenim *HNF1A* varijantama, nego kod pacijenata s *HNF1A* varijantama za koje je procijenjeno da su benigne, odnosno da nemaju negativan utjecaj na funkciju. Medijan glikanskog pika GP30 kod patogenih *HNF1A* varijanti iznosi 0,44 (IQR 0,34 – 0,56), te se značajno razlikuje od medijana GP30 kod benignih *HNF1A* varijanti, koji iznosi 1,10 (IQR 0,57 – 1,55), $p = 0,004$. Medijan glikanskog pika GP30 kod pacijenata s varijantama nepoznatog značaja ne razlikuje se značajno od medijana kod pacijenata s benignim *HNF1A* varijantama ili bez *HNF1A* varijanti (p -vrijednost nije statistički značajna). Razlike u udjelima glikanskih grupa GP30, GP36 i GP38 kod pacijenata bez *HNF1A* varijante ($n = 945$), pacijenata s patogenim varijantama gena *HNF1A* ($n = 18$), pacijenata s benignim varijantama gena *HNF1A* ($n = 8$) i pacijenata s varijantama nepoznatog značaja ($n = 7$) prikazane su na slici 33. Opisane razlike upućuju da glikani pokazuju vrijednost u predikciji patogenosti *HNF1A* varijanti.

Nadalje, analizirane su razine glikanskog pika GP30 kod pacijenata s varijantama nepoznatog značaja te kod novootkrivenih *HNF1A* varijanti, kako bi se utvrdila njegova korisnost u određivanju funkcionalnog učinka alelne varijante. U ispitivanoj kohorti tri su različite varijante nepoznatog značaja (ukupno sedam pacijenata). Tri pacijenta nositelja varijante p.P291T i jedan pacijent nositelj varijante p.T515K imaju razinu GP30 iznad predložene granične vrijednosti ($GP30 < 0,73$), što sugerira benigni učinak navedenih varijanti na gensku funkciju. Sva tri pacijenta s varijantom p.A251T imaju razinu GP30 nižu od 0,73, što upućuje na patogeni učinak varijante. Razine GP30 klasificirale su novootkrivene *HNF1A* varijante na sljedeći način: pacijentu s varijantom p.K222N razina GP30 iznosi 0,33, što upućuje na patogenost varijante, dok pacijenti s varijantama p.S3C i p.G151S imaju razinu GP30 oko granične vrijednosti, što onemogućuje nedvojben zaključak o njihovoj patogenosti. Prema ostalim značajkama i rezultatima funkcionalnih ispitivanja te su varijante okarakterizirane kao vjerojatno patogene.



Slika 33 Razlike u udjelima individualnih glikanskih grupa (GP) kod pacijenata bez *HNF1A* varijante, odnosno s dijabetesom tipa 2 ($n = 945$), pacijenata s benignim varijantama gena *HNF1A* ($n = 8$), pacijenata s varijantama nepoznatog značaja ($n = 7$) i pacijenata s patogenim varijantama gena *HNF1A* ($n = 18$). Razlike su vizualizirane kao dijagrami pravokutnika (engl. *box plot*), gdje svaki pravokutnik predstavlja raspon od 25. do 75. percentila. Linija unutar pravokutnika predstavlja medijan. Vanjske linije predstavljaju raspon do najviše, odnosno najniže vrijednosti unutar 1,5 x interkvartilnog raspona (IQR, razlika između trećeg i prvog kvartila). Stršeće vrijednosti (engl. *outliers*) naznačene su kružićima. GP – glikanski pik; VUS – varijanta nepoznatog značaja (engl. *variant of unknown significance*).

4.4. Identifikacija i strukturna karakterizacija glikanskih struktura

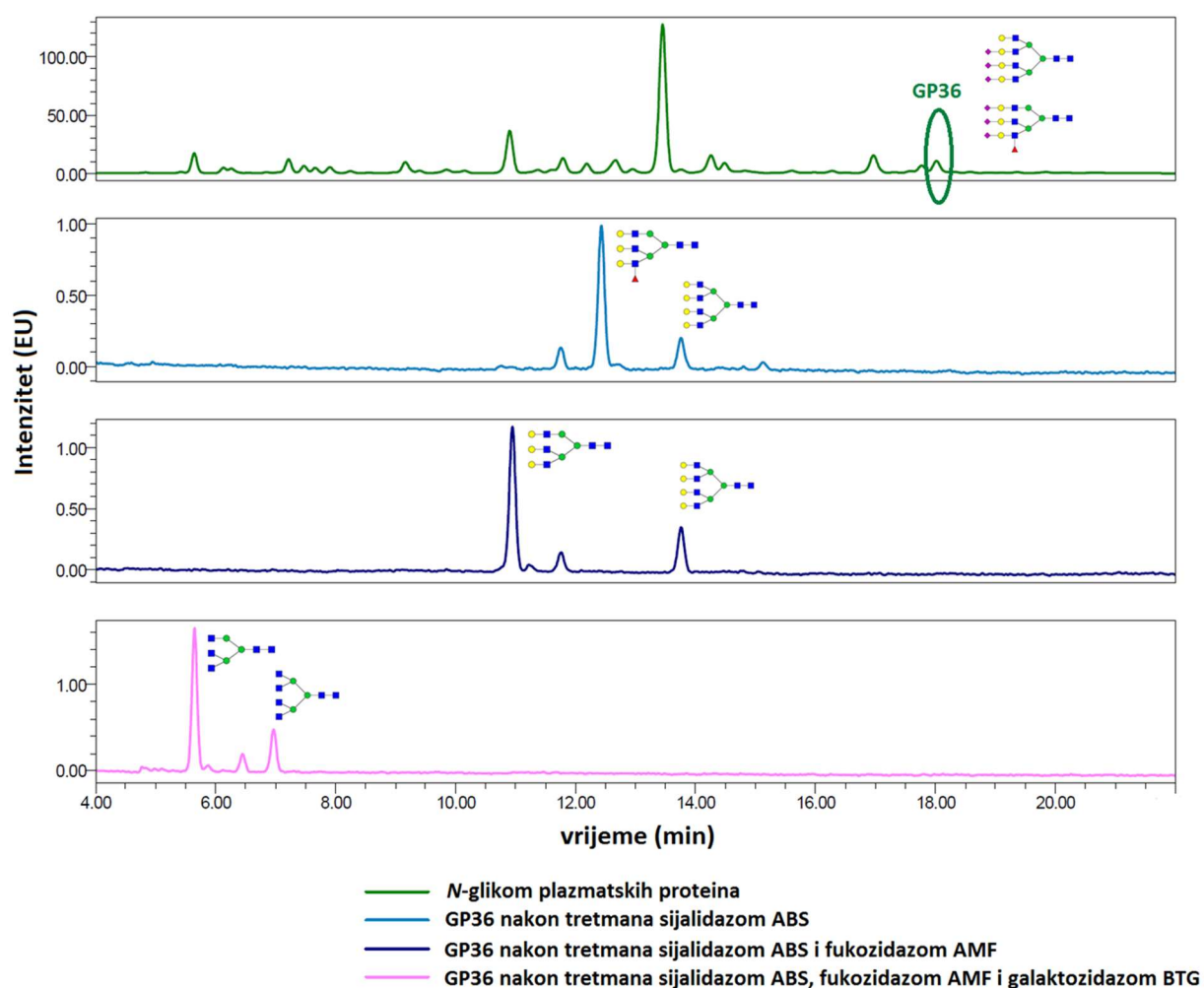
Radi lakšeg razumijevanja i funkcionalne interpretacije opaženih promjena glikanskih parametara u HNF1A-MODY-u provedena je i identifikacija te strukturna karakterizacija nepoznatih glikanskih struktura (prvenstveno prisutnih u pojedinačnim kromatografskim pikovima desijaliniziranih *N*-glikana), te potvrda poznatih glikanskih struktura prisutnih u statistički značajnim glikanskim pikovima. Strukture prisutne u pikovima od interesa identificirane su kombinacijom metoda: najprije je provedeno profiliranje glikana HILIC-UPLC tekućinskom kromatografijom, pri čemu su sakupljeni kromatografski (glikanski) pikovi

od interesa, nakon čega su isti podvrgnuti razgradnji egzoglikozidazama ili su analizirani metodama spektrometrije masa (MALDI-TOF-MS i nanoLC-ESI-MS). Uz individualne glikanske pikove, analizirane su i smjese ukupnih glikana (prvenstveno desijaliniziranih). Navedeni pristup omogućava identifikaciju velikog broja glikanskih struktura prisutnih u analiziranom uzorku, što je omogućila komplementarnost primijenjenih analitičkih metoda.

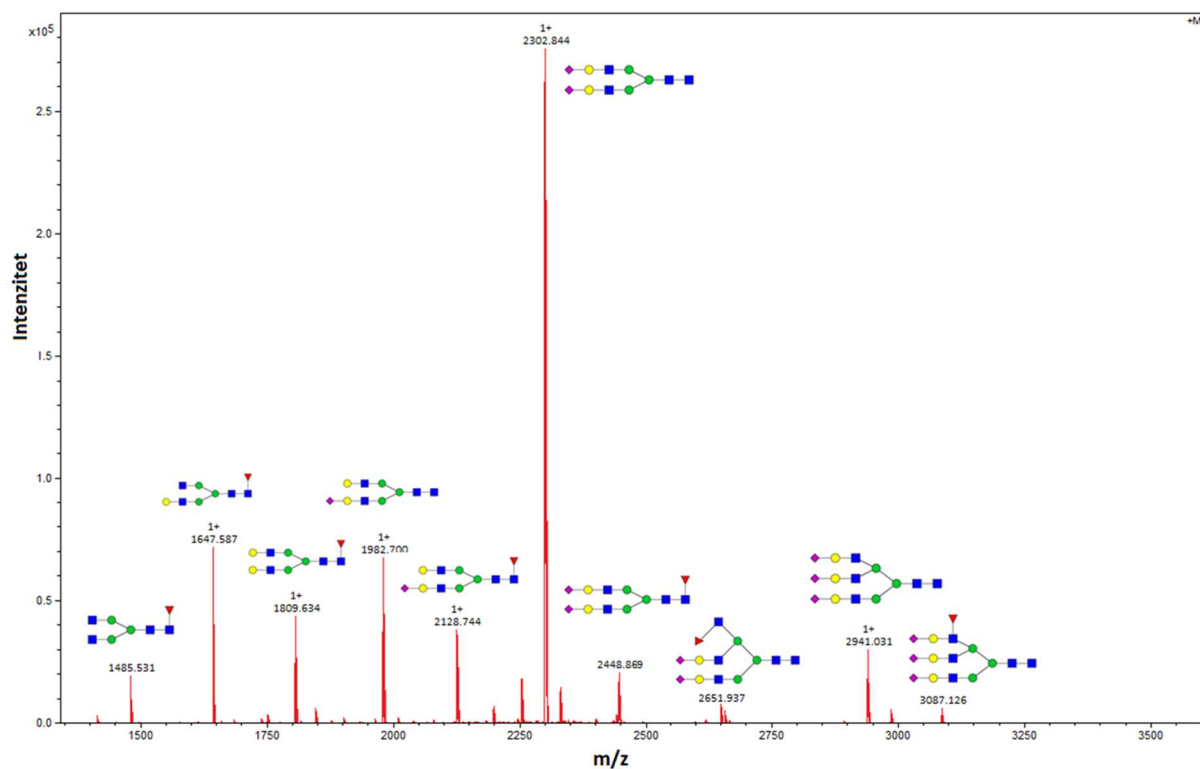
4.4.1. Potvrđivanje struktura prisutnih u značajnim pikovima netretiranih *N*-glikana

Fluorescentno obilježeni *N*-glikani analizirani su normalno-faznom tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC). Kromatogrami netretiranih *N*-glikana ukupnih proteina plazme razdvojeni su na 42 kromatografska pika, unutar kojih su glikanske strukture prethodno određene i poznate (poglavlje 3.3.2.4., tablica 4).⁸² Budući da ovo istraživanje postulira uključenost transkripcijskog faktora HNF1 α u regulaciju fukozilacije plazmatskih proteina, pretpostavka je da će se utjecaj inaktivirajućih varijanti gena *HNF1A* najznačajnije ispoljiti upravo na fukoziliranim glikanskim strukturama. Iz tog je razloga provedena dodatna provjera i potvrda struktura *N*-glikana prisutnih u najznačajnijim glikanskim pikovima – GP30, GP36 i GP38. Potvrda struktura provedena je na temelju rezultata razgradnje glikana egzoglikozidazama, što rezultira nizom kromatograma u kojima je moguće pratiti kretanje kromatografskih pikova uslijed promjene odgovarajuće glikanske strukture ili one novonastale pojedinom razgradnjom (slika 34). Upotrijebljeni enzimi i njihove kombinacije, kao i specifičnost pojedinog enzima opisana je u poglavlju 3.3.2.6. Nadalje, potvrda glikanskih struktura provedena je metodama spektrometrije masa, i to pomoću podataka o masi i sastavu glikana dobivenih MALDI-MS analizom (slika 35) i nanoLC-ESI-MS analizom sakupljenog pojedinačnog pika (slika 36).

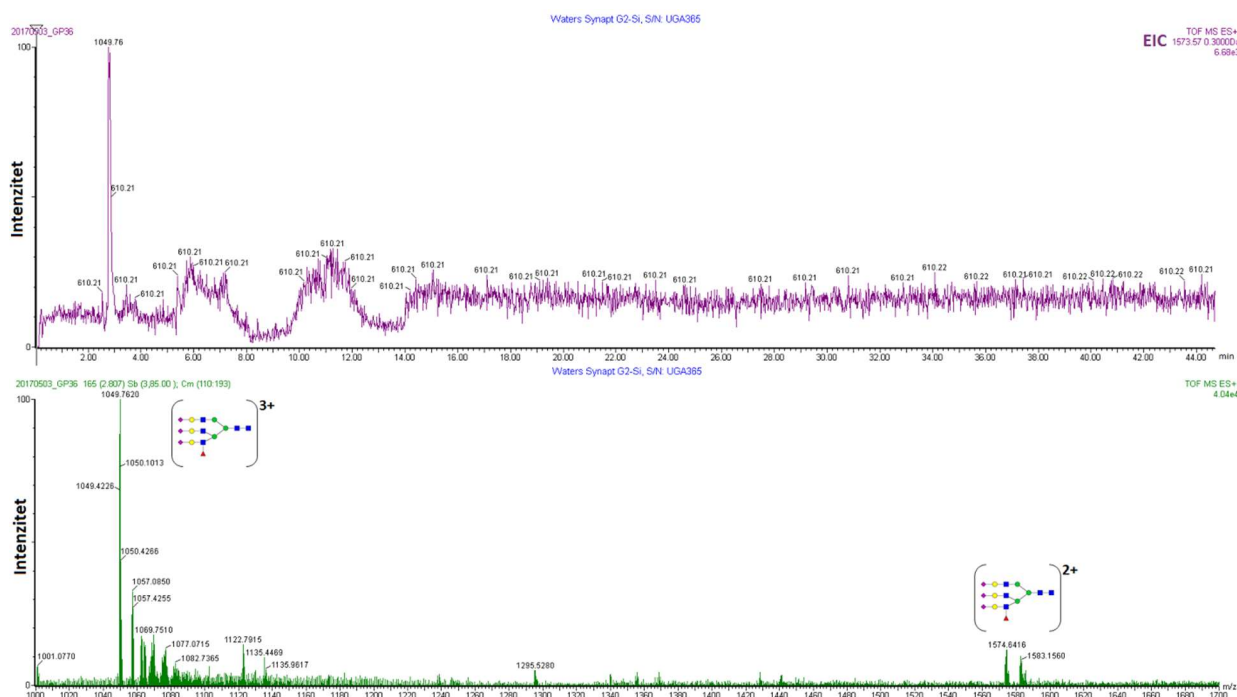
Kombiniranje dobivenih informacija o sastavu i strukturi ispitivanih glikanskih grupa dovelo je do konačnog zaključka o strukturi *N*-glikana prisutnih u glikanskim pikovima od interesa, koji su ujedno i najznačajnije promijenjeni glikani kod pacijenata s HNF1A-MODY oblikom dijabetesa. Strukture *N*-glikana prisutnih u glikanskim pikovima GP30, GP36 i GP38 prikazane su na slici 37.



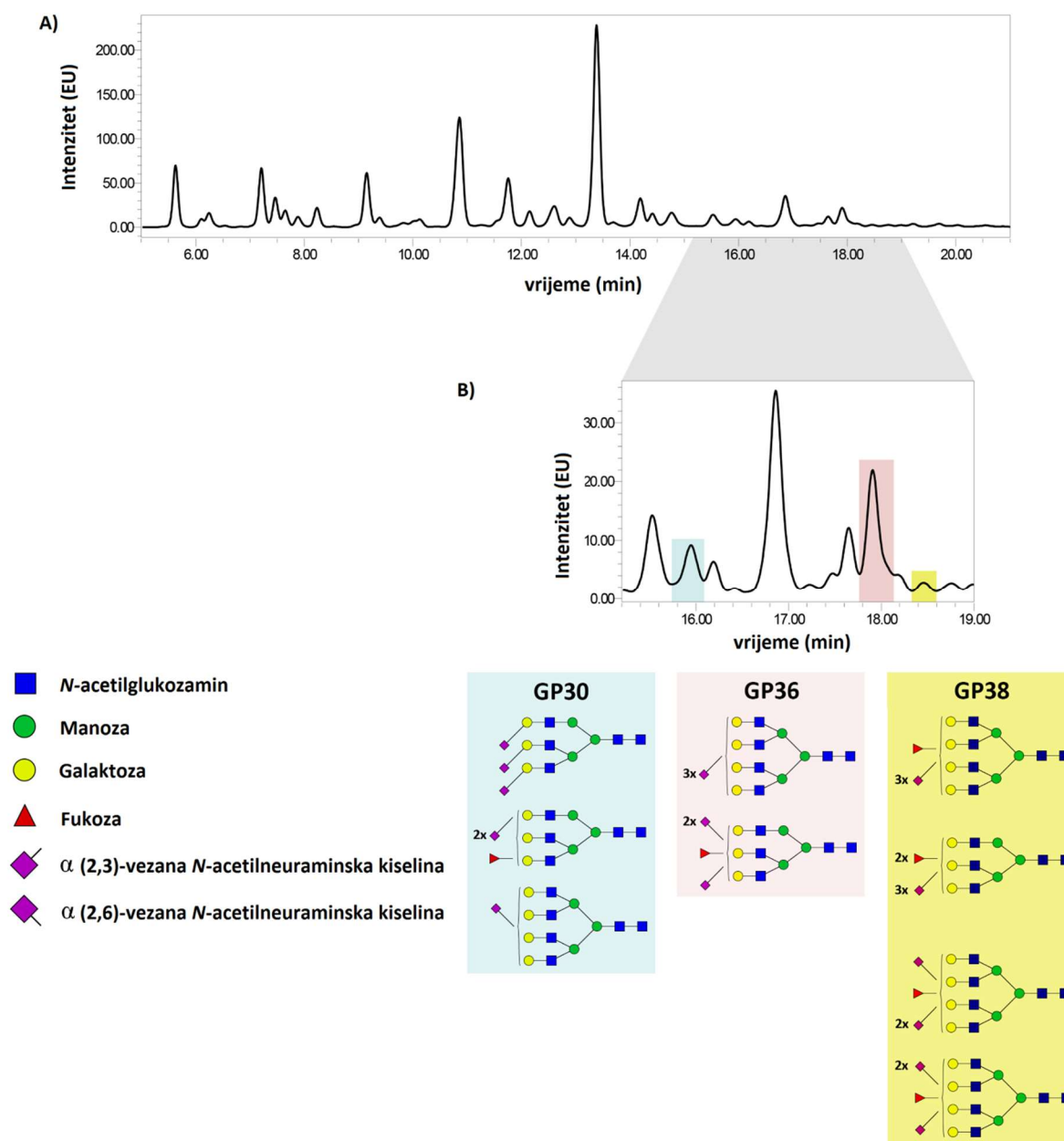
Slika 34 Primjer određivanja strukture *N*-glikana razgradnjom uzorka egzoglikozidazama. U gornjem je primjeru enzimom fukozidazom iz badema potvrđeno da dominantna glikanska struktura prisutna u GP36 sadrži antenarno vezanu fukozu (enzim otpušta isključivo α -1-3,4-vezanu fukozu, no ne i α -1,6-vezanu sržnu fukozu). GP36 – glikanski pik 36, ABS – sijalidaza iz *Arthrobacter ureafaciens*, AMF – fukozidaza iz badema, BTG – galaktozidaza iz govedih testisa.



Slika 35 Reprezentativni MALDI-TOF-MS spektar *N*-glikana ukupnih proteina plazme. Prikazano je deset najzastupljenijih glikanskih struktura. m/z – omjer mase i naboja.



Slika 36 Primjer EIC kromatograma (engl. *extracted-ion chromatogram*), te ESI-MS spektra glikanskih struktura prisutnih u glikanskom piknu GP36. m/z – omjer mase i naboja.

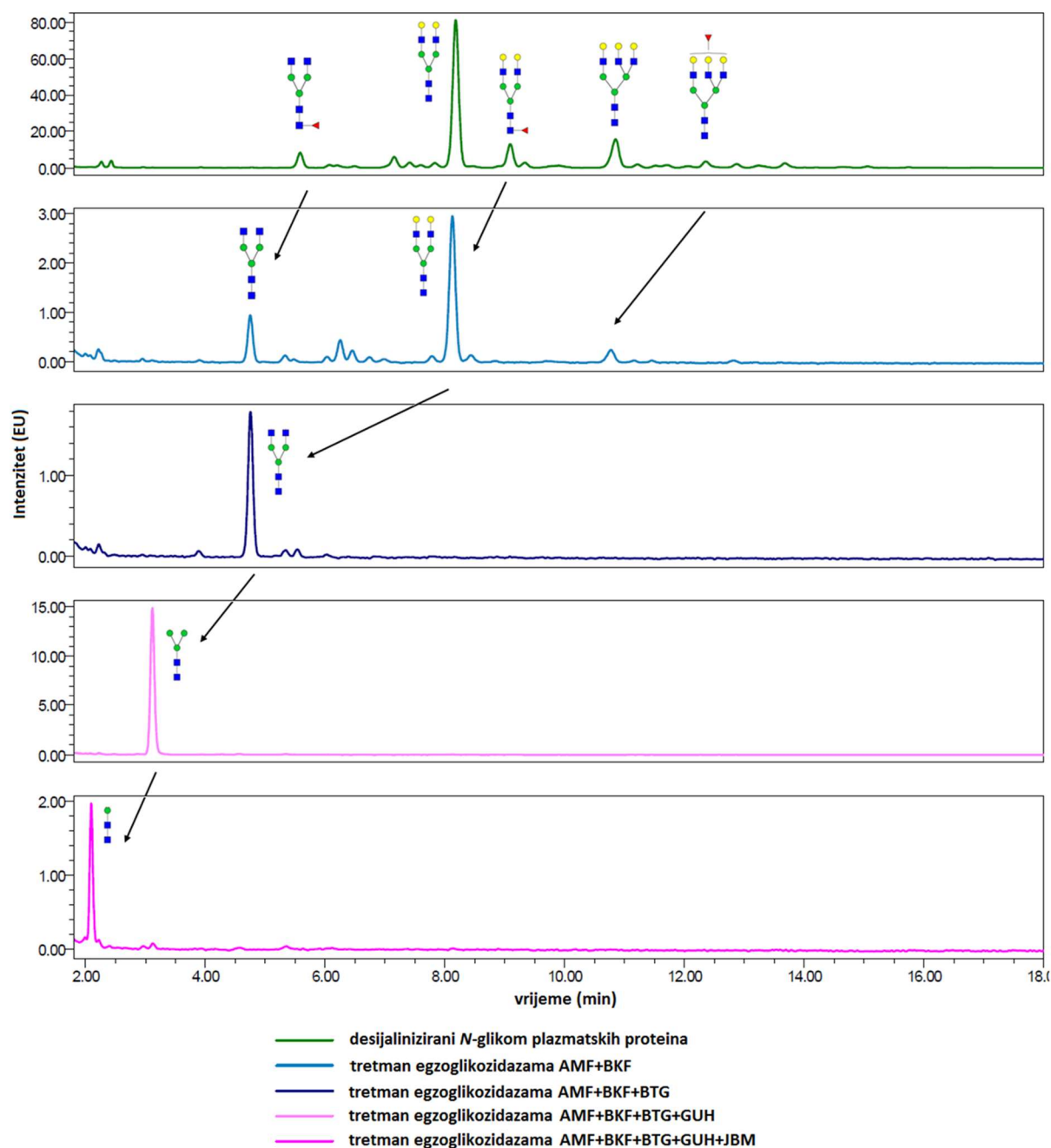


Slika 37 A) Primjer HILIC-UPLC kromatograma *N*-glikana otpuštenih s ukupnih proteina plazme. B) Glikanski pikovi koji su se pokazali najboljima u razlikovanju HNF1A-MODY-a od neautoimunog dijabetesa ranog nastupa s pripadajućim *N*-glikanskim strukturama označeni su kako slijedi: GP30 zeleno, GP36 crveno, GP38 žuto.

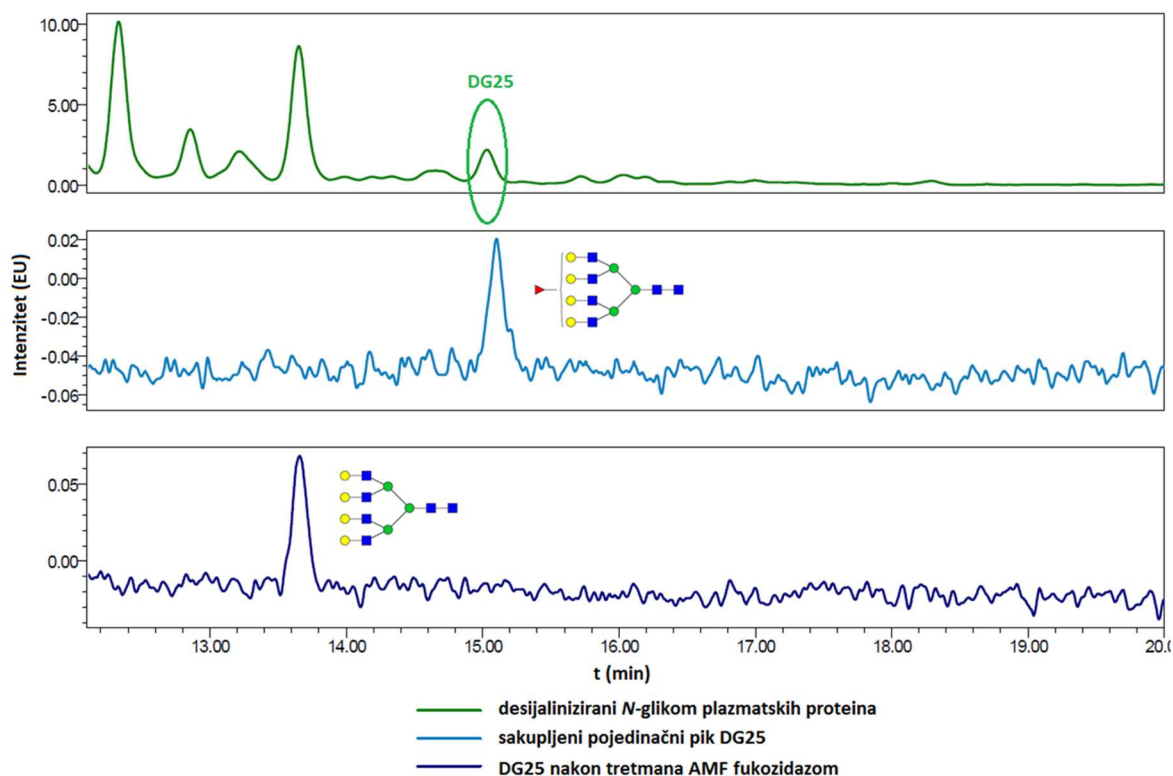
4.4.2. Određivanje glikanskih struktura desijaliniziranog *N*-glikoma plazmatskih proteina

Otpušteni i fluorescentno obilježeni *N*-glikani dodatno su tretirani sijalidazom iz *Arthrobacter ureafaciens* kako bi se otpustile α -2,3-, α -2,6-, α -2,8- i α -2,9-vezane sijalinske kiseline. Uzorci su potom iznova analizirani normalno-faznom tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC). Kromatogrami desijaliniziranih *N*-glikana ukupnih proteina plazme razdvojeni su na 32 kromatografska pika, unutar kojih se nalaze nepoznate glikanske strukture. Razlog desijaliniziranja uzoraka bilo je pretpostavljeno bolje kromatografsko razdvajanje glikanskih struktura od interesa (prvenstveno fukoziliranih). Nadalje, sijalinske su kiseline podložne spontanom otpadanju s *N*-glikana prilikom analize spektrometrijom masa, te na taj način utječu na točnost dobivenih rezultata. Njihovim uklanjanjem značajno se povećava robustnost i reproducibilnost metoda analize glikana temeljenih na spektrometriji masa. Određivanje struktura desijaliniziranog *N*-glikoma plazmatskih proteina provedeno je na razini smjese ukupnih desijaliniziranih glikana i na razini individualnih pikova, posebice najznačajnijih – DG19 i DG25. Strukturna karakterizacija i ovaj je put vršena na temelju rezultata razgradnje glikana egzoglikozidazama – smjese ukupnih desijaliniziranih glikana (slika 38) i pojedinačnih pikova (slika 39). Upotrijebljeni enzimi i njihove kombinacije, kao i aktivnost pojedinog enzima opisana je u poglavlju 3.3.2.6. Nadalje, određivanje strukture desijaliniziranih glikana vršeno je metodama spektrometrije masa, i to MALDI-TOF-MS (slika 40) i nanoLC-ESI-MS analizom.

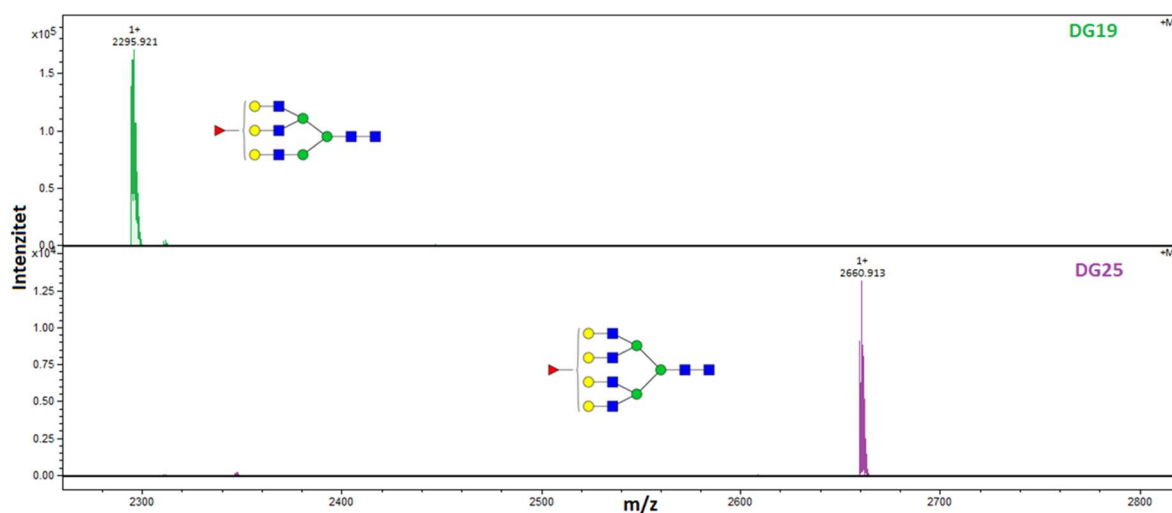
Kombiniranje dobivenih informacija o sastavu i strukturi ispitivanih desijaliniziranih glikanskih grupa i njihove smjese dovelo je do određivanja struktura *N*-glikana prisutnih u kromatografskim pikovima desijaliniziranog *N*-glikoma. Analiza je uspješno provedena za većinu desijaliniziranih pikova, izuzev nekoliko iznimaka, čemu je uzrok slabi intenzitet kromatografskih pikova i mala koncentracija analiziranih glikana unutar istih. Određene strukture *N*-glikana prisutnih u pikovima desijaliniziranih glikana ukupnih proteina plazme dane su u tablici 15.



Slika 38 Primjer sekvenciranja glikana korištenjem egzoglikozidaza. U gornjem je primjeru desijalinizirani *N*-glikom plazmatskih proteina tretiran nizom egzoglikozidaza. Kombiniranjem specifičnosti korištenih egzoglikozidaza i znanja o doprinosu pojedinačnog monosaharida omogućena je analiza oligosaharidne sekvence. AMF – fukozidaza iz badema; BKF – fukozidaza iz goveđih bubrega; BTG – galaktozidaza iz goveđih testisa, GUH – *N*-acetilheksozaminidaza iz *Streptococcus pneumoniae*, JBM – manozidaza iz graha.



Slika 39 Primjer određivanja strukture desijaliniziranog *N*-glikana razgradnjom uzorka egzoglikozidazama. U gornjem je primjeru enzimom fukozidazom iz badema potvrđeno da analizirana glikanska struktura sadrži antenarno vezanu fukozu (enzim otpušta isključivo α -1-3,4-vezanu fukozu, no ne i α -1,6-vezanu sržnu fukozu). DG25 – desijalinizirani glikanski pik 25, AMF – fukozidaza iz badema.



Slika 40 Primjer MALDI-TOF-MS spektra desijaliniziranih glikanskih pikova DG19 i DG25. DG – desijalinizirani glikanski pik, m/z – omjer mase i naboja.

Tablica 15 Identificirane strukture desijaliniziranog *N*-glikoma ukupnih proteina plazme. Glikanske strukture imenovane su prema Oxford nomenklaturi.¹⁰⁰ DG – desijalinizirani glikanski pik, m/z – omjer mase i naboja, H – heksoza, N – *N*-acetilglukozamin, F – deoksiheksoza (fukoza), n.o. – nije određeno.

Kromatografski pik	m/z ([M+Na] ⁺)		Sastav			Struktura*
	teorijski	opaženo	H	N	F	
DG1	1605,60	1605,59	3	4	1	FA2
DG2	1377,49	1377,42	8	2	0	M5
DG3	1808,68	1808,60	3	5	1	FA2B
	1621,59	1621,59	4	4	0	A2[6]G1
DG4	1621,59	1621,80	4	4	0	A2[3]G1
DG5	1824,67	1824,80	4	5	0	A2[6]BG1
DG6	1824,67	1824,80	4	5	0	A2[3]BG1
	1767,65	1767,62	4	4	1	FA2[6]G1
DG7	1767,65	1767,62	4	4	1	FA2[3]G1
DG8	1970,73	1970,93	4	5	1	FA2[6]BG1
DG9	1539,54	1539,66	6	2	0	M6
	1970,73	1970,87	4	5	1	FA2[3]BG1
DG10	1783,65	1783,76	5	4	0	A2G2
DG11	1783,65	1783,74	5	4	0	A2G2
DG12	1742,62	1742,71	6	3	0	M5A1G1
	1929,71	1930,00	5	4	1	FA2G2
DG13	1929,71	1929,95	5	4	1	A2F1G2
	2132,79	2133,07	5	5	1	FA2BG2
DG14	2132,79	2132,73	5	5	1	A2F1BG2
DG15						n.o.
DG16	2148,78	2148,95	6	5	0	A3G3
	1863,65	1863,67	8	2	0	M8 D2
DG17	2148,78	2148,87	6	5	0	A3G3
	1863,65	1863,67	8	2	0	M8 D1
DG18	2294,84	2295,32	6	5	1	FA3G3
DG19	2294,84	2294,93	6	5	1	A3F1G3
DG20	2025,70	2025,32	9	2	0	M9
	2440,90	2441,00	6	5	2	FA3F1G3
DG21	2513,91	2414,00	7	6	0	A4G4
DG22	2513,91	2514,35	7	6	0	A4G4
DG23	2187,75	2188,12	10	2	0	GlcM9
DG24	2659,97	2660,54	7	6	1	FA4G4
DG25	2659,97	2659,92	7	6	1	A4F1G4
DG26						n.o.
DG27	2806,03	2806,51	7	6	2	A4F2G4
DG28 – DG32						n.o.

*Simboli struktura: svi *N*-glikani imaju dva sržna GlcNAc-a; F na početku kratice označava sržnu fukozu α -1,6-vezanu za sržni GlcNAc; Mx, broj (x) manosa vezanih na dva sržna GlcNAc-a; Ax, broj antena (GlcNAc-a) na bazi od tri manose; A2, biantenar s oba β -1,2-vezana GlcNAc-a; A3, triantenar s β -1,2-vezanim GlcNAc-om na dvije manose i trećim β -1,4-vezanim GlcNAc-om na α -1,3-vezanu manozu; A4, vezanje isto kao i kod A3, jedino je dodatni GlcNAc β -1,6-vezan na α -1,6-vezanu manozu; B, račvajući (engl. bisecting) GlcNAc β -1,4-vezan na β -1,3-vezanu manozu; Gx, broj (x) β -1,4-vezanih galaktoza (na antenama); Fx, broj (x) α -1,3-vezanih fukoza na antenarne GlcNAc-ove. Preuzeto i prilagođeno iz Saldova i sur., 2014.⁸²

§ 5. RASPRAVA

5.1. Glikanski obrasci u HNF1A-MODY-u

Glikozilacija je posttranslacijska modifikacija karakterizirana dodavanjem šećernih ostataka (glikana) na proteinsku okosnicu. To je složen, visokospecifičan i strogo reguliran proces, koji uključuje brojne gene i njihove produkte.¹⁰¹ Prije pedesetak godina na glikane se gledalo kao na nevažne strukture, koje eventualno povećavaju topljivost proteina ili doprinose zaštiti od proteolize, te koje nemaju nikakvu funkcionalnu važnost. Danas je poznato da pravilno funkcioniranje brojnih proteina ovisi o točnosti njihove glikozilacije, stoga ne čudi važna uloga koju glikozilacija igra u raznim fiziološkim procesima, kao i u patofiziologiji mnogih bolesti.² Nadalje, nije iznenađujuće da glikani privlače sve više pozornosti mnogih znanstvenika, biofarmaceutskih tvrtki i regulativnih tijela, s obzirom da *N*-glikani dokazano utječu na sigurnost i učinkovitost bioloških lijekova.¹⁰² Glikanska svojstva, poput sijalinizacije, sržne fukozilacije, laktozaminskih sekvenci, α -galaktoze i *N*-glikolilneuraminske kiseline trebaju biti optimizirana i kontrolirana prilikom proizvodnje lijeka. Također, postignut je značajni napredak u razvoju visokoprotocnih metoda za analizu *N*-glikana velikog broja uzoraka.⁴⁸ Glikomske studije temeljene na takvim visokoprotocnim analizama omogućavaju identifikaciju promjena glikozilacije tijekom različitih bioloških procesa i faza bolesti, omogućavajući otkriće dijagnostičkih i prognostičkih biljega temeljenih na glikanima.⁴⁹

Umrežavanjem visokoprotocnih glikomskih analiza s GWAS studijama identificirani su neki od članova kompleksne regulacijske mreže glikozilacije.¹⁰³ Prva GWAS studija provedena na *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina identificirala je gen *HNF1A* kao središnji regulator procesa fukozilacije proteina, što prije nije bilo poznato.¹¹ *HNF1A*, odnosno njegov produkt HNF1 α , uključeni su i u regulaciju procesa biosinteze fukoze i u regulaciju aktivnosti fukoziltransferaza (FUT3, FUT5, FUT6 i FUT8), enzima koji kataliziraju vezanje fukoznog ostatka na *N*-glikan u nastajanju.

S druge strane, uloga gena *HNF1A* u etiologiji monogenetskog dijabetesa dobro je poznata.^{12,13,73} Mladi odrasli ljudi s dijagnozom dijabetesa od druge do četvrte dekade života liječnicima predstavljaju izazov za dijagnosticiranje, zbog širokog spektra potencijalnih etiologija i diferencijalnih dijagnoza. Dijabetes tipa 1 još se uvijek pojavljuje u navedenoj dobi

(doduše sa smanjenom učestalošću), dok se dijabetes tipa 2 pojavljuje kod sve mlađe populacije. Ovo je također dob kada se ispoljava većina oblika monogenetskog dijabetesa.

Dijabetes mladih koji se javlja u odrasloj dobi (MODY) se najjednostavnije može definirati kao poremećaj β -stanica monogenetskog uzroka. Lista poznatih gena-uzročnika „MODY fenotipa“ navedena je u Literaturnom pregledu, tablica 2, a najučestaliji oblik, među odraslom populacijom, je upravo HNF1A-MODY. MODY je uobičajeno karakteriziran ranim nastupom (10. – 45. godine života), autosomno-dominantnim nasljeđivanjem, očuvanom endogenom produkcijom inzulina, odsutnošću znakova autoimunosti na β -stanice, te odsutnošću znakova inzulinske rezistencije. Od navedenih je znakova jedino očuvanost endogene produkcije inzulina nevarijabilna, ostali kriteriji variraju među identificiranim slučajevima. Slika vitkog mladog pacijenta, bez potrebe za egzogenim inzulinom i višegeneracijskom obiteljskom anamnezom dijabetesa poprilično je jasna i takvi se slučajevi jednostavno prepoznaju. Nažalost, približno 50 % pacijenata nema ove tipične karakteristike, što otežava ispravno dijagnosticiranje.⁷² Brojni faktori doprinose pogrešnom dijagnosticiranju monogenetskog dijabetesa; njegova je prevalencija niska u usporedbi s dijabetesom tipa 1 ili 2, kliničke karakteristike pacijenata uvelike se preklapaju kod različitih oblika dijabetesa, molekularna dijagnostika (smatrana zlatnim standardom za otkrivanje monogenetskog dijabetesa) preskupa je za neselektivnu primjenu, njena je dostupnost također varijabilna, a i kad je dostupna, njeno korištenje opet ovisi o iskustvu i svjesnosti o postojanju monogenetskog dijabetesa kod liječnika-dijagnostičara. S obzirom na poteškoće pri dijagnosticiranju MODY-a i visoku cijenu genskog testiranja, razvoj negenskih biljega, specifičnih za MODY, područje je velikog interesa. Biljezi su alati koji kliničarima pomažu predvidjeti, dijagnosticirati, pratiti ili probrati specifičnu bolest. Idealan je biljeg klinički koristan, utoliko što pokazuje visoku osjetljivost i specifičnost za određenu bolest/stanje, jeftin i široko dostupan, jednostavno mjerljiv i sposoban razlikovati pojedince sa ili bez bolesti.⁶⁷

HNF1A kodira za transkripcijski faktor koji je visoko eksprimiran i u drugim tkivima osim gušterače, posebice u jetri.¹² Kako sve oblike dijabetesa karakterizira neki defekt β -stanica, potencijalni biljeg treba reflektirati neka nepankreasna svojstva specifična za MODY, koja se ne pojavljuju kod ostalih oblika dijabetesa. Kao platforma za traženje potencijalnih biljega poslužile su GWAS studije, koje su povezale funkciju *HNF1A* s brojnim svojstvima, poput serumske razine C-reaktivnog proteina¹⁰⁴, γ -glutamil transferaze¹⁰⁵, apolipoproteina M⁷⁶ i LDL kolesterola¹⁰⁶. Na isti je način, putem GWAS studije, otkrivena povezanost *HNF1A* s

glikozilacijom proteina, kao što je ranije istaknuto.¹¹ Pretpostavljeno je da će pacijenti s inaktivirajućim mutacijama gena *HNF1A* (mutacije koje dovode do gubitka funkcije) pokazivati istaknute promjene glikozilacijskog profila plazmatskih proteina (koji se većinom sintetiziraju u jetri, gdje je *HNF1A* visoko eksprimiran) naspram pacijenata s drugim oblicima dijabetesa. To je naredna studija i dokazala²¹, pri čemu je konstruiran deriviran glikanski indeks, koji predstavlja potencijalno uspješan biljeg HNF1A-MODY-a. Međutim, opisana je studija ispitivala uspješnost klasifikacije dijabetesa glikanskim biljegom koristeći dobro definirane skupine pacijenata, nedvojbenih dijagnoza, što u stvarnim kliničkim uvjetima nikad nije slučaj. Stvarna vrijednost glikana kao specifičnih biljega HNF1A-MODY-a ispitana je u ovom doktorskom radu, koristeći neprobranu skupinu pacijenata s nastupom dijabetesa u mlađoj odrasloj dobi, uz odsutnost znakova pankreasne autoimunosti. Ovi simulirani uvjeti najbliži su svakodnevnoj situaciji s kojom se susreću diabetolozi, osiguravaju točnije informacije o prevalenciji rijetke bolesti te isključuju pristranost pri odabiru ispitanika.

Analizirajući glikozilaciju ukupnih plazmatskih proteina pacijenata s ranim nastupom neautoimunog dijabetesa, opažene su opsežne i statistički značajne promjene u sastavu *N*-glikoma pacijenata s rijetkim varijantama gena *HNF1A*. Navedene promjene pokazuju potencijal za poboljšanje diferencijalne dijagnostike dijabetesa, kao biljezi specifični za HNF1A-MODY. Jedan od mehanizama regulacije fukozilacije putem *HNF1A* jest povećanje ekspresije fukoziltransferaznih gena *FUT3*, *FUT5* i *FUT6*, posljedično odgovornih za antenarnu fukozilaciju. Stoga bi osobe s inaktivirajućim (patogenim) varijantama gena *HNF1A* posljedično trebale razviti HNF1A-MODY te istovremeno pokazivati promjene u fukozilaciji proteina, odnosno imati niže razine glikana s antenarnom fukozom u usporedbi s osobama bez inaktivirajućih *HNF1A* varijanti. Zapravo, ovaj je učinak vidljiv u rezultatima ovog dokorskog rada, budući da svi značajno promijenjeni glikani sadrže antenarno vezanu fukozu, te su njihove razine statistički značajno niže kod pacijenata s HNF1A-MODY-em. Ovi su rezultati podudarni s prijašnjim istraživanjem.²¹ Glikanske grupe sadržane u pikovima GP30, GP36 i GP38 (svi sadrže antenarno fukozilirane glikane) zadovoljavajuće diskriminiraju pacijente s patogenim *HNF1A* varijantama, za koje je vrlo vjerojatno da boluju od MODY-a, od pacijenata bez *HNF1A* varijanti (s ranim nastupom dijabetesa tipa 2), s rasponom AUC 0,86 – 0,9. Desijalinizirane glikanske grupe pokazuju nešto slabiju, no još uvijek zadovoljavajuću moć odabira pacijenata s HNF1A-MODY-em (AUC 0,79 – 0,87). Analiza desijaliniziranih glikana provedena je prvenstveno iz povijesnih razloga – naime, prijašnja je studija²¹ provedena

korištenjem upravo tako pripremljenih glikana te su oni poslužili kao osnova za kreiranje prvotnog glikanskog biljega (DG9 indeksa). Također se smatralo da će uklanjanje α -sijalinske kiseline poboljšati kromatografsko razdvajanje glikana od interesa, odnosno da će imati učinak na njihovu raspodjelu unutar pikova. Međutim, u ovom je istraživanju korištena naprednija metodologija analize *N*-glikana – HILIC-UPLC umjesto prethodno korištene HILIC-HPLC metode. Novija metoda omogućava bolju osjetljivost te učinkovitije razdvajanje otpuštenih *N*-glikana (42 kromatografska pika naspram 16), dajući jasnije rezultate. Navedeno je najvjerojatniji razlog zbog kojeg su netretirani *N*-glikani bolji od desijaliniziranih u klasificiranju pacijenata s različitim oblicima dijabetesa, što će u budućnosti omogućiti izostavljanje dodatnog enzimskog uklanjanja α -sijalinske kiseline. Izostavljanje tog dodatnog koraka ne samo da smanjuje vrijeme i trošak analize, već snižava i mogućnost eksperimentalne pogreške i varijacije.

Dobiveni rezultati pokazali su da samo jedna pojedinačna glikanska grupa ima dobru moć razlikovanja HNF1A-MODY-a od dijabetesa tipa 2 s ranim nastupom. Primjerice, GP30 pokazuje sposobnost raspoznavanja HNF1A-MODY pacijenata s osjetljivošću od 89 % i specifičnošću od 77 %, ukoliko se kao granična vrijednost testa upotrijebi vrijednost GP30 = 0,73. Derivirani parametri fukozilacije također su pokazali odličnu sposobnost stratifikacije pacijenata s dijabetesom, posebice Indeks_5, čija je osjetljivost iznosila 83 %, a specifičnost 91,5 % (s graničnom vrijednošću IN5 = 8,41). Derivirani parametri dobri su diskriminatori HNF1A-MODY-a, no budući da su izvedena, a ne izravno mjerena svojstva, ne pokazuju toliko superiorniju moć diskriminacije MODY-a u usporedbi s netretiranim glikanima da bi ih zamijenili u svojstvu biljega. S druge strane, ukoliko bi se za klasifikaciju pacijenata upotrijebili isključivo neki od klasičnih kliničkih kriterija za dijagnosticiranje MODY-a (dijagnoza dijabetesa prije 25. godine života, najmanje dvije generacije oboljelih od dijabetesa u obitelji, dokazana endogena produkcija inzulina i negativna GAD protutijela), u ovoj ispitivanoj kohorti identificiralo bi se samo sedam od 18 pacijenata s HNF1A-MODY-em (39 % slučajeva). Korištenje samo dobi nastupa dijabetesa manje od 25 godina, kao jedinog kriterija, rezultiralo bi dijagnosticiranjem devet pacijenta, što daje osjetljivost od 50 %.

Čak i ako bi se učinkovitost GP30 kao dijagnostičkog biljega dovela u pitanje, on još uvijek može poslužiti kao dobar i učinkovit test probira za upućivanje pacijenata na dijagnostičko sekvenciranje. Za očekivati je da bi takav pristup bio financijski povoljan, budući da komercijalna cijena genskog testiranja iznosi 500 – 800 €. Premda se pretpostavlja da će se

troškovi sekvenciranja drastično smanjiti u budućnosti, isto se može tvrditi i za glikanski test, poglavito ukoliko se razvije metoda koja će mjeriti isključivo određeno glikansko svojstvo, kao što je primjerice antenarna fukozilacija, što će istovremeno i drastično pojednostavniti glikansku analizu.

Nadalje, rezultati ovog istraživanja upućuju na još jednu dodatnu vrijednost glikanskih analiza kod pacijenata s HNF1A-MODY-em, a to je točna interpretacija funkcionalnog utjecaja *HNF1A* varijanti identificiranih kroz sekvenciranje gena. Genetičke studije masovnih razmjera na oboljelim i zdravim pojedincima pokazale su da su mnoge rijetke varijante gena, za koje se smatralo da su patogene, odnosno uzročne za bolesti, prisutne u populacijama s većom učestalošću nego što bi se očekivalo za rijetku monogensku bolest. Stoga GP30 može poslužiti kod određivanja patogenosti pronađenih *HNF1A* varijanti, budući da dobiveni rezultati pokazuju da su njegove razine značajno smanjene kod pojedinaca s patogenim varijantama gena *HNF1A*, u usporedbi s pacijentima s benignim varijantama, odnosno bez *HNF1A* varijante. GP30 je kao biljeg funkcije *HNF1A* varijanti pokazao dosljednost u određivanju smjera funkcionalnog efekta tri varijante nepoznatog značaja, sugerirajući da su varijante p.P291T i p.T515K benigne, te da je varijanta p.A251T patogena, odnosno da uzrokuje HNF1A-MODY.

Zaključno, GP30 je pokazao zadovoljavajuću moć razlikovanja HNF1A-MODY pacijenata od pacijenata s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa, bez *HNF1A* varijanti. Također je pokazao vrijednost u određivanju utjecaja pronađenih *HNF1A* varijanti na funkciju gena, točnije, može se upotrijebiti kao biljeg patogenih genskih varijanti. Točna interpretacija patogenosti identificiranih varijanti od izuzetne je važnosti, ukoliko se kliničarima želi omogućiti točnost informacija, određivanje ispravne terapije te praćenje pacijenata i njihovih članova obitelji. Racionalni dijagnostički protokol koji će uključivati kliničke karakteristike pacijenata i predloženi glikanski biljeg mogao bi značajno poboljšati točnost dijagnoze i stopu identificiranih slučajeva HNF1A-MODY-a.

5.2. Prevalencija HNF1A-MODY-a u Hrvatskoj

Istraživanje provedeno u okviru ovog doktorskog rada prvo je koje adresira dijagnostiku HNF1A-MODY-a u Hrvatskoj. Monogeniski se dijabetes u Hrvatskoj dijagnosticira nesustavno i rijetko, odnosno, u ovdašnjim dijabetološkim klinikama ne postoji ambulanta za monogeniski dijabetes, već njegovo prepoznavanje i dijagnosticiranje velikim dijelom ovisi o dobroj volji i informiranosti pojedinih dijabetologa. Cilj je ovog istraživanja, između ostalog, povećati svjesnost o postojanju ove bolesti te važnosti i pozitivnih učinaka njene ispravne dijagnoze.

Gledajući samo hrvatski dio ispitivane populacije, ovim je istraživanjem identificirano 13 pacijenata nositelja devet različitih *HNF1A* varijanti od 477 uključenih pacijenata – C-peptid pozitivnih, s negativnim protutijelima na β -stanice i nastupom dijabetesa prije 45. godine života. Osmero pacijenata su nositelji patogenih *HNF1A* varijanti, odnosno boluju od HNF1A-MODY-a. Na temelju navedenog izračunato je da 1,7 % hrvatske kohorte ima HNF1A-MODY, što odgovara prevalenciji od 66 (95 % CI 61 – 72) slučajeva na milijun stanovnika.

U dostupnoj literaturi procjene udjela MODY slučajeva variraju između 0,14 % i 4,2 % od svih prijavljenih slučajeva dijabetesa.^{70,72,107–111} Njemačka studija iz 1981. prijavljuje udio MODY-a od 0,14 %, od ukupno 40 927 slučajeva dijabetesa, što odgovara prevalenciji od 70 slučajeva na milijun stanovnika.¹⁰⁷ Norveška HUNT2 studija na 1 972 pacijenta s dijabetesom rezultirala je procjenjenom minimalnom prevalencijom HNF1A-MODY-a od 0,4 %, odnosno 63 slučaja na milijun stanovnika.¹⁰⁹ Britanske studije procijenile su minimalnu prevalenciju MODY-a na 108 slučajeva na milijun stanovnika (pola od navedenog se odnosi na HNF1A-MODY)⁷², odnosno 84 slučajeva HNF1A-MODY-a na milijun stanovnika.¹¹⁰ Procjene prevalencije HNF1A-MODY-a u ostalim europskim zemljama usporedive su s hrvatskim procjenama.

Prednost ovog istraživanja pred većinom ostalih opisanih u literaturi jest činjenica da je omogućilo sekvenciranje gena *HNF1A* za sve C-peptid pozitivne pacijente, s negativnim protutijelima na β -stanice i nastupom dijabetesa prije 45. godine. Navedeno je smanjilo rizik za promašivanje HNF1A-MODY slučajeva, kao posljedice sužavanja kriterija odabira za gensko testiranje. Klasični klinički kriteriji za dijagnosticiranje MODY-a uključuju nastup dijabetesa prije 25. godine života, inzulinsku neovisnost i najmanje dvije generacije oboljelih od dijabetesa u obiteljskoj anamnezi.^{69,73,84} Koristeći ove općeprihvaćene kriterije više od tri četvrtine identificiranih hrvatskih HNF1A-MODY pacijenata ne bi uopće bilo upućeno na molekularnu dijagnostiku (sekvenciranje gena *HNF1A*).

Nedostatak je ovog istraživanja nesigurnost u odabir reprezentativnog uzorka svih pacijenata s ranim nastupom dijabetesa u Hrvatskoj, premda se nastojalo uključiti pacijente iz svih dijelova Hrvatske. Još jednu poteškoću predstavlja i nedvojbeno utvrđivanje funkcionalnog efekta pronađene varijante, o čemu je već ranije bilo govora. Formalno funkcionalno procjenjivanje pronađenih *HNF1A* varijanti upućuje na njihov vjerojatni učinak, međutim, ne može u potpunosti definirati širok raspon fenotipova povezanih s istom varijantom.¹¹² Prilikom izvođenja istraživanja jedan od tekućih problema bio je i pronalazak te uključivanje u studiju članova obitelji prvootkrivenih pacijenata s *HNF1A* varijantom, a u svrhu ispitivanja kosegregacije pronađene *HNF1A* varijante i dijabetesa unutar obitelji. Navedeno je ispitivanje vrlo informativno, jer upućuje na vjerojatni funkcionalni efekt pronađene varijante – ukoliko se kod članova obitelji koji su naslijedili gensku varijantu redovno razvija dijabetes, to snažno podupire zaključak da je navedena varijanta patogena.

Opisani pristup nije idealan za određivanje stvarne prevalencije monogenetskog dijabetesa, međutim svejedno pruža vrijedne informacije o njegovoj prisutnosti u hrvatskoj populaciji. Utvrđivanje stvarne prevalencije MODY-a bilo bi moguće jedino na temelju podataka sustavnog sekvenciranja populacije, za što nije vjerojatno da će biti dostupno u bližoj budućnosti. Kakogod, ovo istraživanje snažno podupire inicijativu za uvođenjem molekularne dijagnostike monogenetskog dijabetesa u hrvatske klinike.

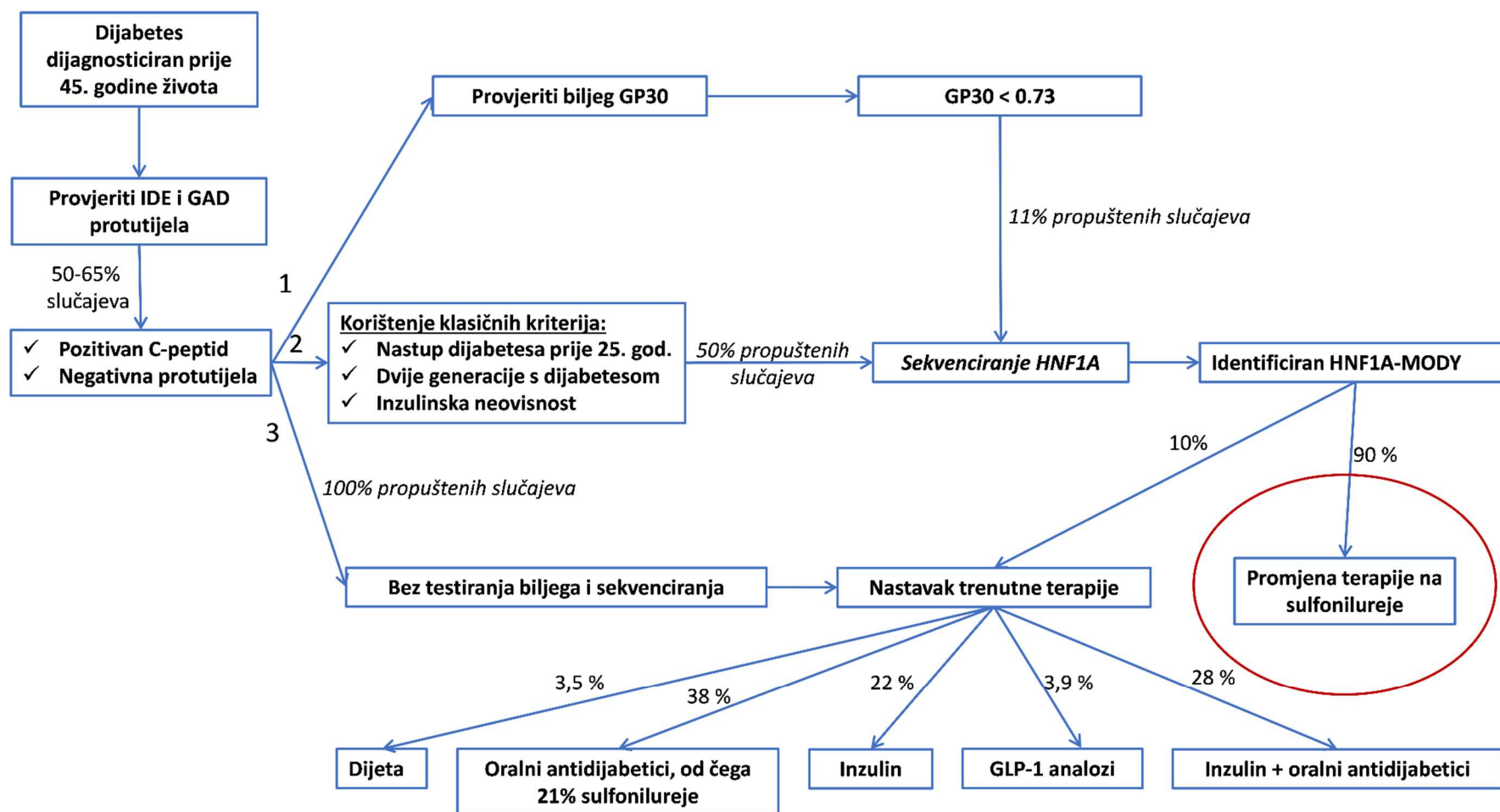
5.3. Dijagnostički protokol za HNF1A-MODY

Krajnji cilj ovog istraživanja bio je razvoj racionalnog protokola za dijagnosticiranje HNF1A-MODY-a. Kako jedino pravo molekularno dijagnosticiranje HNF1A-MODY-a zahtjeva sekvenciranje gena, postojanje jeftinijeg, lako mjerljivog biljega, koji bi mogao izdvojiti pojedince za koje postoji velika vjerojatnost da boluju od HNF1A-MODY-a, bilo bi od velike važnosti. Glikanski biljezi, a posebice GP30, pokazali su veliku uspješnost u raspoznavanju MODY pacijenata. Kakogod, korištenje GP30 u kliničkoj praksi trenutno nije izgledno zbog ograničene dostupnosti glikanskog profiliranja. Zapravo, translacija glikanskog biljega u kliničku praksu najviše ovisi o implementaciji fokusiranog određivanja specifičnog glikanskog svojstva, ponajprije razine antenarne fukozilacije, a ne o sveobuhvatnom kromatografskom profiliranju ukupnog plazmatskog *N*-glikoma provedenog u ovom istraživanju. Takav je pristup trenutno prekompleksan za rutinsku primjenu u bolničkim biokemijskim laboratorijima. Prvi koraci ka razvoju jednog takvog jednostavnijeg glikanskog testa su već napravljeni, a temelje se na enzimskom oslobađanju isključivo antenarnih fukoznih ostataka, te posljedičnom određivanju njihove koncentracije u ispitivanom uzorku.

Glikanski test (razina antenarne fukoze) jednostavnijeg oblika i izvedbe predstavlja ozbiljnog kandidata za uključivanje u algoritam dijagnosticiranja HNF1A-MODY-a. Intuitivno je pretpostaviti da će jedan takav racionalan dijagnostički protokol zasigurno kombinirati kliničke karakteristike pacijenta i biokemijske biljege. Nadalje, zbog niže cijene analize, u usporedbi sa sekvenciranjem gena, glikanski test pokazuje veliki potencijal za korištenje u procesu probira kandidata za dijagnostičko sekvenciranje. Prijedlog racionalnog dijagnostičkog protokola za monogeni diabetes uzrokovan mutacijama gena *HNF1A*, koji uključuje i glikanski biljeg prikazuje slika 41. Primjena opisanog algoritma olakšala bi identifikaciju oboljelih od HNF1A-MODY-a, što bi pak donijelo znatan osobni i društveni benefit te rezultiralo poboljšanjem medicinskog tretmana dijabetesa. I ovo je istraživanje primjer poboljšanja kvalitete života pacijenata nakon uspostavljanja ispravne dijagnoze bolesti, budući da je dvoje od njih uspjelo prekinuti dotadašnje liječenje inzulinom i prijeći na oralnu terapiju derivatima sulfonilureje, što dodatno predstavlja i rasterećenje zdravstvenog sustava, s obzirom da je nova terapija jeftinija za nekoliko redova veličine.

Uz procjenu poboljšanja medicinskog tretmana pacijenata, važan je i ekonomski aspekt uvođenja novih testova u kliničku praksu. Farmakoe ekonomska analiza uzima u obzir dva različita scenarija: prvi, kod kojeg pacijenti s HNF1A-MODY-em ostaju neprepoznati i

vjerojatno pogrešno liječeni, što će za posljedicu imati raniju pojavu komplikacija te veće troškove liječenja, te drugi, kod kojeg su pacijenti s HNF1A-MODY-em pravodobno ispravno dijagnosticirani, tretirani derivatima sulfonilureje, što će za posljedicu vjerojatno imati bolje ishode liječenja. Konačni rezultat takve analize pokazuje potencijal za uštedu, kao i klinički potencijal tretmana dijabetesa koji je pravodobno dijagnosticiran i liječen odgovarajućom terapijom. S obzirom na sve veći broj oboljelih od dijabetesa, važnost ranog prepoznavanja i ispravnog dijagnosticiranja njegovih različitih oblika sve više dolazi do izražaja.



Slika 41 Prijedlog racionalnog protokola za dijagnosticiranje HNF1A-MODY-a

§ 6. ZAKLJUČAK

- ✓ Rezultati ove disertacije jasno ukazuju da je *N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina promijenjen kod oboljelih od dijabetesa uzrokovanog mutacijama gena *HNF1A*.
- ✓ Mnogi glikanski parametri (netretirani *N*-glikani, desijalinizirani *N*-glikani i derivirani parametri fukozilacije) uspješno raspoznaju pacijente s rijetkim varijantama gena *HNF1A*, poglavito s inaktivirajućim genskim varijantama, od pacijenata s neautoimunim dijabetesom ranog nastupa, koji nisu nositelji rijetkih *HNF1A* varijanti.
- ✓ Triantenarne glikanske strukture s vezanom antenarnom fukozom mogu identificirati pacijente s *HNF1A*-MODY-em, s osjetljivošću od 89 % i specifičnošću od 77 % unutar populacije pacijenata s dijabetesom ranog nastupa i isključenom pankreasnom autoimunitetom. To ih čini dobrim alatom probira pacijenata s navedenim oblikom dijabetesa.
- ✓ Dobiveni rezultati upućuju da je HILIC-UPLC profiliranje netretiranih *N*-glikana dovoljno informativno, te ukida potrebu za enzimskim uklanjanjem α -sijalinske kiseline, što rezultira pojednostavljivanjem i skraćivanjem analitičkog postupka.
- ✓ Čak i nakon identifikacije rijetkih varijanti gena *HNF1A* ostaje problem ispravnog tumačenja njihovih funkcionalnih učinaka. Glikanske strukture s vezanom antenarnom fukozom pokazuju vrijednost u određivanju funkcionalnih utjecaja pronađenih rijetkih varijanti gena *HNF1A*, točnije, mogu se upotrijebiti kao biljeg patogenih genskih varijanti.
- ✓ Provedeno istraživanje pokazalo je da je prevalencija *HNF1A*-MODY-a u Hrvatskoj usporediva s njegovom prevalencijom u ostalim europskim zemljama i iznosi 66 slučajeva na milijun stanovnika.
- ✓ Ovo istraživanje snažno podupire inicijativu za uvođenjem molekularne dijagnostike monogenetskog dijabetesa u hrvatske klinike.

- ✓ Racionalni dijagnostički protokol za HNF1A-MODY može se izgraditi na temelju rezultata ovog istraživanja.
- ✓ Uključivanje glikanskog biljega u dijagnostički protokol značajno bi povećao dijagnostičku osjetljivost.
- ✓ Translacija glikanskog biljega u kliničku praksu najviše ovisi o implementaciji jednostavnijeg glikanskog testa, koji bi mjerio razinu antenarne fukoze u uzorku.
- ✓ Uspostavljanje i klinička translacija glikanskog biljega imali bi značajan ekonomski utjecaj na zdravstveni sustav.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Aminokiseline

Ala (A)	Alanin
Cys (C)	Cistein
Asp (D)	Asparaginska kiselina
Glu (E)	Glutaminska kiselina
Phe (F)	Fenilalanin
Gly (G)	Glicin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Izoleucin
Lys (K)	Lizin
Leu (L)	Leucin
Met (M)	Metionin
Asn (N)	Asparagin
Pro (P)	Prolin
Gln (Q)	Glutamin
Arg (R)	Arginin
Ser (S)	Serin
Thr (T)	Treonin
Val (V)	Valin
Trp (W)	Triptofan
Tyr (Y)	Tirozin

Monosaharidi

Fuc	F		fukoza
Gal	G		galaktoza
GalA	-		galakturonska kiselina
GalN	-		galaktozamin
GalNAc	-		N-acetilgalaktozamin

Glc	-		glukoza
GlcA	-		glukuronska kiselina
GlcN	-		glukozamin
GlcNAc	B		<i>N</i> -acetilglukozamin
IdoA	-		iduronska kiselina
Man	M		manoza
ManA	-		manuronska kiselina
ManN	-		manozamin
ManNAc	-		<i>N</i> -acetilmanozamin
Neu5Ac	S		<i>N</i> -acetilneuraminska kiselina
Neu5Gc	-		<i>N</i> -glikolilneuraminska kiselina
Xyl	-		ksiloza

Kratice

2,5-DHB	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina
2-AB	2-aminobenzamid
2-PB	2-pikolin boran
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>area under the curve</i>)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass indeks</i>)
CAD	disocijacija izazvana sudarom (engl. <i>collisionally activated dissociation</i>)
cDNA	komplementarna DNA
CE-LIF	kapilarna elektroforeza s fluorescencijom induciranom svjetlošću (engl. <i>capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence</i>)
CI	područje pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
CID	disocijacija izazvana sudarom (engl. <i>collision-induced dissociation</i>)
cIEF	kapilarno izoelektično fokusiranje (engl. <i>capillary isoelectric focusing</i>)
CZE	kapilarna zonska elektroforeza (engl. <i>capillary zone electrophoresis</i>)
DG	desijalinizirani glikan
DM	šećerna bolest, dijabetes (lat. <i>diabetes mellitus</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina

ECD	disocijacija zahvatom elektrona (engl. <i>electron-capture dissociation</i>)
ER	endoplazmatski retikulum
ERAD	ER-povezana degradacija proteina (engl. <i>ER-associated degradation</i>)
ESI	ionizacija elektroraspršivanjem (engl. <i>electrospray ionization</i>)
ETD	disocijacija prijenosom elektrona (engl. <i>electron-transfer dissociation</i>)
EU	jedinica emisije (eng. <i>emission unit</i>)
FACE	elektroforeza ugljikohidrata potpomognuta fluoroforom (engl. <i>fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis</i>)
GA	Golgijev aparat
GADA	protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. <i>glutamic acid decarboxylase</i>)
GC	plinska kromatografija (engl. <i>gas chromatography</i>)
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GLP1	peptid-1 sličan glukagonu (engl. <i>glucagon-like peptide-1</i>)
GP	glikanski pik
GU	glukozna jedinica (engl. <i>glucose unit</i>)
GWAS	cjelogenomske studije povezanosti (engl. <i>genome-wide association studies</i>)
HbA1c	glikirani hemoglobin
HDL	lipoprotein visoke gustoće (engl. <i>high-density lipoprotein</i>)
HILIC	tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HNF1A	hepatocelularni nuklearni faktor 1-alfa (engl. <i>hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A</i>)
HPAEC-PAD	kromatografija anionske izmjene visoke djelotvornosti s pulsnom amperometrijskom detekcijom (engl. <i>high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection</i>)
HPCE	kapilarna elektroforeza visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance capillary electrophoresis</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
ICA	protutijela na stanice otočića (engl. <i>islet cell antibody</i>)

IDE	enzim koji razgrađuje inzulin (engl. <i>insulin-degrading enzyme</i>)
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquantil range</i>)
LC	tekućinska kromatografija (engl. <i>liquid chromatography</i>)
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. <i>matrix- assisted laser desorption/ionization</i>)
MECC	micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (engl. <i>micellar electrokinetic capillary chromatography</i>)
MODY	dijabetes mladih koji se javlja u odrasloj dobi (engl. <i>maturity-onset diabetes of the young</i>)
MS	spektrometrija masa (engl. <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	tandemna spektrometrija masa (engl. <i>tandem mass spectrometry</i>)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
OAD	oralni antidijabetici
OST	oligosaharil-transferaza
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
ROC	engl. <i>receiver operating characteristic</i>
RP	reverzna faza (engl. <i>reverse phase</i>)
SE	standardna pogreška (engl. <i>standard error</i>)
SDS	natrijev dodecil-sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SNP	jednonukleotidni polimorfizam (engl. <i>single-nucleotide polymorphism</i>)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid phase extraction</i>)
T1D	dijabetes tipa 1
T2D	dijabetes tipa 2
TBE	Tris/ borat/ EDTA pufer
TOF	vrijeme leta (engl. <i>time of flight</i>)
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UDP	uridin-5'-difosfat
UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. <i>ultra performance liquid chromatography</i>)
VUS	varijanta nepoznatog značaja (engl. <i>variant of unknown significance</i>)
WAX	slaba anionska izmjena (engl. <i>weak anion exchange</i>)

§ 8. LITERATURNI IZVORI

- (1) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, 3 (2), 97–130.
- (2) Gornik, O.; Pavić, T.; Lauc, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1820 (9), 1318–1326.
- (3) Pinho, S. S.; Reis, C. A. *Nat Rev Cancer* **2015**, 15 (9), 540–555.
- (4) Higai, K.; Azuma, Y.; Aoki, Y.; Matsumoto, K. *Clinica Chimica Acta* **2003**, 329 (1–2), 117–125.
- (5) Montpetit, M. L.; Stocker, P. J.; Schwetz, T. A.; Harper, J. M.; Norring, S. A.; Schaffer, L.; North, S. J.; Jang-Lee, J.; Gilmartin, T.; Head, S. R.; Haslam, S. M.; Dell, A.; Marth, J. D.; Bennett, E. S. *PNAS* **2009**, 106 (38), 16517–16522.
- (6) Jaeken, J. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2010**, 1214 (1), 190–198.
- (7) Maverakis, E.; Kim, K.; Shimoda, M.; Gershwin, M. E.; Patel, F.; Wilken, R.; Raychaudhuri, S.; Ruhaak, L. R.; Lebrilla, C. B. *Journal of Autoimmunity* **2015**, 57, 1–13.
- (8) Vigerust, D. J. *cent.eur.j.biol.* **2011**, 6 (5), 802.
- (9) Nairn, A. V.; York, W. S.; Harris, K.; Hall, E. M.; Pierce, J. M.; Moremen, K. W. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (25), 17298–17313.
- (10) Ohtsubo, K.; Marth, J. D. *Cell* **2006**, 126 (5), 855–867.
- (11) Lauc, G.; Essafi, A.; Huffman, J. E.; Hayward, C.; Knežević, A.; Kattla, J. J.; Polašek, O.; Gornik, O.; Vitart, V.; Abrahams, J. L.; Pučić, M.; Novokmet, M.; Redžić, I.; Campbell, S.; Wild, S. H.; Borovečki, F.; Wang, W.; Kolčić, I.; Zgaga, L.; Gyllenstein, U.; Wilson, J. F.; Wright, A. F.; Hastie, N. D.; Campbell, H.; Rudd, P. M.; Rudan, I. *PLoS Genet* **2010**, 6 (12), e1001256.
- (12) Harries, L. W.; Ellard, S.; Stride, A.; Morgan, N. G.; Hattersley, A. T. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, 15 (14), 2216–2224.
- (13) Maestro, M. A.; Cardalda, C.; Boj, S. F.; Luco, R. F.; Servitja, J. M.; Ferrer, J. *Endocr Dev* **2007**, 12, 33–45.
- (14) Colclough, K.; Bellanne-Chantelot, C.; Saint-Martin, C.; Flanagan, S. E.; Ellard, S. *Human Mutation* **2013**, 34 (5), 669–685.

- (15) Frayling, T. M.; Bulman, M. P.; Ellard, S.; Appleton, M.; Dronsfield, M. J.; Mackie, A. D. R.; Baird, J. D.; Kaisaki, P. J.; Yamagata, K.; Bell, G. I.; Bain, S. C.; Hattersley, A. T. *Diabetes* **1997**, *46* (4), 720–725.
- (16) Byrne, M. M.; Sturis, J.; Menzel, S.; Yamagata, K.; Fajans, S. S.; Dronsfield, M. J.; Bain, S. C.; Hattersley, A. T.; Velho, G.; Froguel, P.; Bell, G. I.; Polonsky, K. S. *Diabetes* **1996**, *45* (11), 1503–1510.
- (17) Pearson, E. R.; Starkey, B. J.; Powell, R. J.; Gribble, F. M.; Clark, P. M.; Hattersley, A. T. *The Lancet* **2003**, *362* (9392), 1275–1281.
- (18) Shepherd, M.; Shields, B.; Ellard, S.; Rubio-Cabezas, O.; Hattersley, A. T. *Diabetic Medicine* **2009**, *26* (4), 437–441.
- (19) Owen, K. R.; Thanabalasingham, G.; James, T. J.; Karpe, F.; Farmer, A. J.; McCarthy, M. I.; Gloyn, A. L. *Diabetes Care* **2010**, *33* (9), 1919–1924.
- (20) Thanabalasingham, G.; Shah, N.; Vaxillaire, M.; Hansen, T.; Tuomi, T.; Gašperiková, D.; Szopa, M.; Tjora, E.; James, T. J.; Kokko, P.; Loiseleur, F.; Andersson, E.; Gaget, S.; Isomaa, B.; Nowak, N.; Raeder, H.; Stanik, J.; Njolstad, P. R.; Malecki, M. T.; Klimes, I.; Groop, L.; Pedersen, O.; Froguel, P.; McCarthy, M. I.; Gloyn, A. L.; Owen, K. R. *Diabetologia* **2011**, *54* (11), 2801–2810.
- (21) Thanabalasingham, G.; Huffman, J. E.; Kattla, J. J.; Novokmet, M.; Rudan, I.; Gloyn, A. L.; Hayward, C.; Adamczyk, B.; Reynolds, R. M.; Muzinic, A.; Hassanali, N.; Pucic, M.; Bennett, A. J.; Essafi, A.; Polasek, O.; Mughal, S. A.; Redzic, I.; Primorac, D.; Zgaga, L.; Kolcic, I.; Hansen, T.; Gasperikova, D.; Tjora, E.; Strachan, M. W. J.; Nielsen, T.; Stanik, J.; Klimes, I.; Pedersen, O. B.; Njølstad, P. R.; Wild, S. H.; Gyllensten, U.; Gornik, O.; Wilson, J. F.; Hastie, N. D.; Campbell, H.; McCarthy, M. I.; Rudd, P. M.; Owen, K. R.; Lauc, G.; Wright, A. F. *Diabetes* **2013**, *62* (4), 1329–1337.
- (22) Huffman, J. E.; Knežević, A.; Vitart, V.; Kattla, J.; Adamczyk, B.; Novokmet, M.; Igl, W.; Pučić, M.; Zgaga, L.; Johannson, Å.; Redžić, I.; Gornik, O.; Zemunik, T.; Polašek, O.; Kolčić, I.; Pehlić, M.; Koeleman, C. A. M.; Campbell, S.; Wild, S. H.; Hastie, N. D.; Campbell, H.; Gyllensten, U.; Wuhler, M.; Wilson, J. F.; Hayward, C.; Rudan, I.; Rudd, P. M.; Wright, A. F.; Lauc, G. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20* (24), 5000–5011.

- (23) Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, 1473 (1), 4–8.
- (24) Walsh, G.; Jefferis, R. *Nat Biotech* **2006**, 24 (10), 1241–1252.
- (25) Lauc, G.; Rudan, I.; Campbell, H.; Rudd, P. M. *Mol. BioSyst.* **2010**, 6 (2), 329–335.
- (26) *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G., Aebi, M., Darvill, A., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. J., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
- (27) Furmanek, A.; Hofsteenge, J. *Acta Biochim. Pol.* **2000**, 47 (3), 781–789.
- (28) Haynes, P. A. *Glycobiology* **1998**, 8 (1), 1–5.
- (29) Cooper, G. M. *The Cell*, 2nd ed.; Sinauer Associates, 2000.
- (30) Moremen, K. W.; Tiemeyer, M.; Nairn, A. V. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, 13 (7), 448–462.
- (31) Reiter, W.-D. *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, 11 (3), 236–243.
- (32) Breton, C.; Šnajdrová, L.; Jeanneau, C.; Koča, J.; Imberty, A. *Glycobiology* **2006**, 16 (2), 29R–37R.
- (33) Pattison, R. J.; Amtmann, A. *Trends Plant Sci.* **2009**, 14 (2), 92–99.
- (34) Glycosylation <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-glycosylation.html> (accessed May 23, 2017).
- (35) Gomord, V.; Fitchette, A.-C.; Menu-Bouaouiche, L.; Saint-Jore-Dupas, C.; Plasson, C.; Michaud, D.; Faye, L. *Plant Biotechnology Journal* **2010**, 8 (5), 564–587.
- (36) An, H. J.; Gip, P.; Kim, J.; Wu, S.; Park, K. W.; McVaugh, C. T.; Schaffer, D. V.; Bertozzi, C. R.; Lebrilla, C. B. *Mol Cell Proteomics* **2012**, 11 (4), M111.010660.
- (37) Stanley, P. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, 3 (4).
- (38) Rabouille, C.; Hui, N.; Hunte, F.; Kieckbusch, R.; Berger, E. G.; Warren, G.; Nilsson, T. *J. Cell. Sci.* **1995**, 108 (Pt 4), 1617–1627.
- (39) Rayon, C.; Lerouge, P.; Faye, L. *J Exp Bot* **1998**, 49 (326), 1463–1472.
- (40) Lerouge, P.; Cabanes-Macheteau, M.; Rayon, C.; Fischette-Lainé, A.-C.; Gomord, V.; Faye, L. *Plant Mol Biol* **1998**, 38 (1–2), 31–48.
- (41) Lyons, J. J.; Milner, J. D.; Rosenzweig, S. D. *Front. Pediatr.* **2015**, 3.
- (42) Sly, W. S.; Fischer, H. D. *J. Cell. Biochem.* **1982**, 18 (1), 67–85.

- (43) Fuster, M. M.; Esko, J. D. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5 (7), 526–542.
- (44) Marrero, J. A.; Romano, P. R.; Nikolaeva, O.; Steel, L.; Mehta, A.; Fimmel, C. J.; Comunale, M. A.; D’Amelio, A.; Lok, A. S.; Block, T. M. *J. Hepatol.* **2005**, 43 (6), 1007–1012.
- (45) Miyoshi, E.; Nakano, M. *Proteomics* **2008**, 8 (16), 3257–3262.
- (46) Saldova, R.; Fan, Y.; Fitzpatrick, J. M.; Watson, R. W. G.; Rudd, P. M. *Glycobiology* **2011**, 21 (2), 195–205.
- (47) Lebrilla, C. B.; An, H. J. *Mol Biosyst* **2009**, 5 (1), 17–20.
- (48) Huffman, J. E.; Pučić-Baković, M.; Klarić, L.; Hennig, R.; Selman, M. H. J.; Vučković, F.; Novokmet, M.; Krištić, J.; Borowiak, M.; Muth, T.; Polašek, O.; Razdorov, G.; Gornik, O.; Plomp, R.; Theodoratou, E.; Wright, A. F.; Rudan, I.; Hayward, C.; Campbell, H.; Deelder, A. M.; Reichl, U.; Aulchenko, Y. S.; Rapp, E.; Wührer, M.; Lauc, G. *Mol Cell Proteomics* **2014**, 13 (6), 1598–1610.
- (49) Adamczyk, B.; Tharmalingam, T.; Rudd, P. M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2012**, 1820 (9), 1347–1353.
- (50) Mariño, K.; Bones, J.; Kattla, J. J.; Rudd, P. M. *Nature Chemical Biology* **2010**, 6 (10), 713–723.
- (51) Tretter, V.; Altmann, F.; März, L. *Eur. J. Biochem.* **1991**, 199 (3), 647–652.
- (52) Royle, L.; Radcliffe, C. M.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Methods Mol. Biol.* **2006**, 347, 125–143.
- (53) Royle, L.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Curr Protoc Protein Sci* **2006**, Chapter 12, Unit 12.6.
- (54) Kotani, N.; Takasaki, S. *Analytical Biochemistry* **1998**, 264 (1), 66–73.
- (55) Domann, P. J.; Pardos-Pardos, A. C.; Fernandes, D. L.; Spencer, D. I. R.; Radcliffe, C. M.; Royle, L.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Proteomics* **2007**, 7 Suppl 1, 70–76.
- (56) Ruhaak, L. R.; Zauner, G.; Huhn, C.; Bruggink, C.; Deelder, A. M.; Wührer, M. *Anal Bioanal Chem* **2010**, 397 (8), 3457–3481.
- (57) Kang, P.; Mechref, Y.; Novotny, M. V. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22 (5), 721–734.
- (58) Reiding, K. R.; Blank, D.; Kuijper, D. M.; Deelder, A. M.; Wührer, M. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (12), 5784–5793.
- (59) Bush, W. S.; Moore, J. H. *PLoS Comput Biol* **2012**, 8 (12).

- (60) Clarke, G. M.; Anderson, C. A.; Pettersson, F. H.; Cardon, L. R.; Morris, A. P.; Zondervan, K. T. *Nat Protoc* **2011**, 6 (2), 121–133.
- (61) Vaxillaire, M.; Boccio, V.; Philippi, A.; Vigouroux, C.; Terwilliger, J.; Passa, P.; Beckmann, J. S.; Velho, G.; Lathrop, G. M.; Froguel, P. *Nat. Genet.* **1995**, 9 (4), 418–423.
- (62) Vaxillaire, M.; Abderrahmani, A.; Boutin, P.; Bailleul, B.; Froguel, P.; Yaniv, M.; Pontoglio, M. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (50), 35639–35646.
- (63) Bach, I.; Yaniv, M. *EMBO J* **1993**, 12 (11), 4229–4242.
- (64) Pontoglio, M.; Sreenan, S.; Roe, M.; Pugh, W.; Ostrega, D.; Doyen, A.; Pick, A. J.; Baldwin, A.; Velho, G.; Froguel, P.; Levisetti, M.; Bonner-Weir, S.; Bell, G. I.; Yaniv, M.; Polonsky, K. S. *J. Clin. Invest.* **1998**, 101 (10), 2215–2222.
- (65) Miyoshi, E.; Moriwaki, K.; Nakagawa, T. *Journal of Biochemistry* **2007**, 143 (6), 725–729.
- (66) Ma, B.; Simala-Grant, J. L.; Taylor, D. E. *Glycobiology* **2006**, 16 (12), 158R–184R.
- (67) Owen, K. R. *Diabet. Med.* **2013**, 30 (3), 260–266.
- (68) Kim, S.-H. *Diabetes Metab J* **2015**, 39 (6), 468–477.
- (69) Fajans, S. S.; Bell, G. I.; Polonsky, K. S. *New England Journal of Medicine* **2001**, 345 (13), 971–980.
- (70) Ledermann, H. M. *Lancet* **1995**, 345 (8950), 648.
- (71) Pontoglio, M.; Prié, D.; Cheret, C.; Doyen, A.; Leroy, C.; Froguel, P.; Velho, G.; Yaniv, M.; Friedlander, G. *EMBO Rep.* **2000**, 1 (4), 359–365.
- (72) Shields, B. M.; Hicks, S.; Shepherd, M. H.; Colclough, K.; Hattersley, A. T.; Ellard, S. *Diabetologia* **2010**, 53 (12), 2504–2508.
- (73) Stride, A.; Hattersley, A. T. *Ann. Med.* **2002**, 34 (3), 207–216.
- (74) Bacon, S.; Kyithar, M. P.; Rizvi, S. R.; Donnelly, E.; McCarthy, A.; Burke, M.; Colclough, K.; Ellard, S.; Byrne, M. M. *Diabet. Med.* **2016**, 33 (7), 976–984.
- (75) Tuomi, T.; Honkanen, E. H.; Isomaa, B.; Sarelin, L.; Groop, L. C. *Diabetes Care* **2006**, 29 (2), 189–194.
- (76) Richter, S.; Shih, D. Q.; Pearson, E. R.; Wolfrum, C.; Fajans, S. S.; Hattersley, A. T.; Stoffel, M. *Diabetes* **2003**, 52 (12), 2989–2995.
- (77) VVUC CroDiab http://www.idb.hr/web_english/crodiab.htm (accessed Oct 12, 2016).

- (78) QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook - EN - QIAGEN
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en> (accessed Sep 5, 2016).
- (79) Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74* (12), 5463–5467.
- (80) Trbojević Akmačić, I.; Ugrina, I.; Štambuk, J.; Gudelj, I.; Vučković, F.; Lauc, G.; Pučić-Baković, M. *Biochemistry (Moscow)* **2015**, *80* (7), 934–942.
- (81) Wang, T.; Cai, Z. P.; Gu, X. Q.; Ma, H. Y.; Du, Y. M.; Huang, K.; Voglmeir, J.; Liu, L. *Bioscience Reports* **2014**, *34* (6), e00149.
- (82) Saldova, R.; Asadi Shehni, A.; Haakensen, V. D.; Steinfeld, I.; Hilliard, M.; Kifer, I.; Helland, Å.; Yakhini, Z.; Børresen-Dale, A.-L.; Rudd, P. M. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (5), 2314–2327.
- (83) Hajian-Tilaki, K. *Caspian J Intern Med* **2013**, *4* (2), 627–635.
- (84) Bellanné-Chantelot, C.; Lévy, D. J.; Carette, C.; Saint-Martin, C.; Riveline, J.-P.; Larger, E.; Valéro, R.; Gautier, J.-F.; Reznik, Y.; Sola, A.; Hartemann, A.; Laboureaux-Soares, S.; Laloi-Michelin, M.; Lecomte, P.; Chaillous, L.; Dubois-Laforgue, D.; Timsit, J.; French Monogenic Diabetes Study Group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96* (8), E1346-1351.
- (85) McDonald, T. J.; McEneny, J.; Pearson, E. R.; Thanabalasingham, G.; Szopa, M.; Shields, B. M.; Ellard, S.; Owen, K. R.; Malecki, M. T.; Hattersley, A. T.; Young, I. S. *Clinica Chimica Acta* **2012**, *413* (9–10), 927–932.
- (86) Benson, D. A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Sayers, E. W. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (Database issue), D36-42.
- (87) Ellard, S.; Thomas, K.; Edghill, E. L.; Owens, M.; Ambye, L.; Cropper, J.; Little, J.; Strachan, M.; Stride, A.; Ersoy, B.; Eiberg, H.; Pedersen, O.; Shepherd, M. H.; Hansen, T.; Harries, L. W.; Hattersley, A. T. *Diabetologia* **2007**, *50* (11), 2313–2317.
- (88) Møller, A. M.; Dalgaard, L. T.; Pociot, F.; Nerup, J.; Hansen, T.; Pedersen, O. *Diabetologia* **1998**, *41* (12), 1528–1531.
- (89) Frayling, T. M.; Evans, J. C.; Bulman, M. P.; Pearson, E.; Allen, L.; Owen, K.; Bingham, C.; Hannemann, M.; Shepherd, M.; Ellard, S.; Hattersley, A. T. *Diabetes* **2001**, *50 Suppl 1*, S94-100.

- (90) Kaisaki, P. J.; Menzel, S.; Lindner, T.; Oda, N.; Rjasanowski, I.; Sahm, J.; Meincke, G.; Schulze, J.; Schmechel, H.; Petzold, C.; Ledermann, H. M.; Sachse, G.; Boriraj, V. V.; Menzel, R.; Kerner, W.; Turner, R. C.; Yamagata, K.; Bell, G. I. *Diabetes* **1997**, *46* (3), 528–535.
- (91) Lehto, M.; Tuomi, T.; Mahtani, M. M.; Widén, E.; Forsblom, C.; Sarelin, L.; Gullström, M.; Isomaa, B.; Lehtovirta, M.; Hyrkkö, A.; Kanninen, T.; Orho, M.; Manley, S.; Turner, R. C.; Brettn, T.; Kirby, A.; Thomas, J.; Duyk, G.; Lander, E.; Taskinen, M. R.; Groop, L. *J Clin Invest* **1997**, *99* (4), 582–591.
- (92) Vaxillaire, M.; Rouard, M.; Yamagata, K.; Oda, N.; Kaisaki, P. J.; Boriraj, V. V.; Chevre, J. C.; Boccio, V.; Cox, R. D.; Lathrop, G. M.; Dussoix, P.; Philippe, J.; Timsit, J.; Charpentier, G.; Velho, G.; Bell, G. I.; Froguel, P. *Hum. Mol. Genet.* **1997**, *6* (4), 583–586.
- (93) Kawasaki, E.; Sera, Y.; Yamakawa, K.; Abe, T.; Ozaki, M.; Uotani, S.; Ohtsu, N.; Takino, H.; Yamasaki, H.; Yamaguchi, Y.; Matsuura, N.; Eguchi, K. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85* (1), 331–335.
- (94) Domínguez-López, A.; Miliar-García, Á.; Segura-Kato, Y. X.; Riba, L.; Esparza-López, J.; Ramírez-Jiménez, S.; Rodríguez-Torres, M.; Canizales-Quinteros, S.; Cabrera-Vásquez, S.; Fragoso-Ontiveros, V.; Aguilar-Salinas, C. A.; Altamirano-Bustamante, N.; Calzada-León, R.; Robles-Valdés, C.; Bravo-Ríos, L. E.; Tusié-Luna, M. T. *JOP : Journal of the pancreas, JOP [electronic resource] : Journal of the pancreas.* **2005**, *6* (3), 238–245.
- (95) Xu, J. Y.; Dan, Q. H.; Chan, V.; Wat, N. M. S.; Tam, S.; Tiu, S. C.; Lee, K. F.; Siu, S. C.; Tsang, M. W.; Fung, L. M.; Chan, K. W.; Lam, K. S. L. *Eur. J. Hum. Genet.* **2005**, *13* (4), 422–427.
- (96) Galán, M.; García-Herrero, C.-M.; Azriel, S.; Gargallo, M.; Durán, M.; Gorgojo, J.-J.; Andía, V.-M.; Navas, M.-A. *Mol. Med.* **2011**, *17* (3–4), 256–265.
- (97) Juszczak, A.; Pavić, T.; Vučković, F.; Bennett, A. J.; Shah, N.; Pape Medvidović, E.; Groves, C. J.; Šekerija, M.; Chandler, K.; Burrows, C.; Rojnić Putarek, N.; Čuća Knežević, J.; James, T.J.; Gloyn, A. L.; Lauc, G.; McCarthy, M. I.; Owen, K.; Gornik, O. *rad u procesu recenzije* **2017**.

- (98) Pavić, T.; Juszczak, A.; Pape Medvidović, E.; Burrows, C.; Šekerija, M.; Bennett, A. J.; Čuća Knežević, J.; Gloyn, A. L.; Lauc, G.; McCarthy, M. I.; Gornik, O.; Owen, K. *rad u procesu recenzije* **2017**.
- (99) Barrios, C.; Zierer, J.; Gudelj, I.; Štambuk, J.; Ugrina, I.; Rodríguez, E.; Soler, M. J.; Pavić, T.; Šimurina, M.; Keser, T.; Pučić-Baković, M.; Mangino, M.; Pascual, J.; Spector, T. D.; Lauc, G.; Menni, C. *JASN* **2015**, ASN.2015010109.
- (100) Harvey, D. J.; Merry, A. H.; Royle, L.; Campbell, M. P.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Proteomics* **2009**, 9 (15), 3796–3801.
- (101) Spiro, R. G. *Glycobiology* **2002**, 12 (4), 43R–56R.
- (102) Reusch, D.; Tejada, M. L. *Glycobiology* **2015**, 25 (12), 1325–1334.
- (103) Rudd, P. M.; Rudan, I.; Wright, A. F. *J. Proteome Res.* **2009**, 8 (3), 1105.
- (104) Reiner, A. P.; Barber, M. J.; Guan, Y.; Ridker, P. M.; Lange, L. A.; Chasman, D. I.; Walston, J. D.; Cooper, G. M.; Jenny, N. S.; Rieder, M. J.; Durda, J. P.; Smith, J. D.; Novembre, J.; Tracy, R. P.; Rotter, J. I.; Stephens, M.; Nickerson, D. A.; Krauss, R. M. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, 82 (5), 1193–1201.
- (105) Yuan, X.; Waterworth, D.; Perry, J. R. B.; Lim, N.; Song, K.; Chambers, J. C.; Zhang, W.; Vollenweider, P.; Stirnadel, H.; Johnson, T.; Bergmann, S.; Beckmann, N. D.; Li, Y.; Ferrucci, L.; Melzer, D.; Hernandez, D.; Singleton, A.; Scott, J.; Elliott, P.; Waeber, G.; Cardon, L.; Frayling, T. M.; Kooner, J. S.; Mooser, V. *The American Journal of Human Genetics* **2008**, 83 (4), 520–528.
- (106) Kathiresan, S.; Willer, C. J.; Peloso, G. M.; Demissie, S.; Musunuru, K.; Schadt, E. E.; Kaplan, L.; Bennett, D.; Li, Y.; Tanaka, T.; Voight, B. F.; Bonnycastle, L. L.; Jackson, A. U.; Crawford, G.; Surti, A.; Guiducci, C.; Burt, N. P.; Parish, S.; Clarke, R.; Zelenika, D.; Kubalanza, K. A.; Morken, M. A.; Scott, L. J.; Stringham, H. M.; Galan, P.; Swift, A. J.; Kuusisto, J.; Bergman, R. N.; Sundvall, J.; Laakso, M.; Ferrucci, L.; Scheet, P.; Sanna, S.; Uda, M.; Yang, Q.; Lunetta, K. L.; Dupuis, J.; de Bakker, P. I. W.; O'Donnell, C. J.; Chambers, J. C.; Kooner, J. S.; Hercberg, S.; Meneton, P.; Lakatta, E. G.; Scuteri, A.; Schlessinger, D.; Tuomilehto, J.; Collins, F. S.; Groop, L.; Altshuler, D.; Collins, R.; Lathrop, G. M.; Melander, O.; Salomaa, V.; Peltonen, L.; Orho-Melander, M.; Ordovas, J. M.; Boehnke, M.; Abecasis, G. R.; Mohlke, K. L.; Cupples, L. A. *Nat. Genet.* **2009**, 41 (1), 56–65.
- (107) Panzram, G.; Adolph, W. *The Lancet* **1981**, 318 (8253), 986.

- (108) Schober, E.; Rami, B.; Grabert, M.; Thon, A.; Kapellen, T.; Reinehr, T.; Holl, R. W. *Diabetic Medicine* **2009**, *26* (5), 466–473.
- (109) Eide, S. Å.; Ræder, H.; Johansson, S.; Midthjell, K.; Søvik, O.; Njølstad, P. R.; Molven, A. *Diabetic Medicine* **2008**, *25* (7), 775–781.
- (110) Kropff, J.; Selwood, M. P.; McCarthy, M. I.; Farmer, A. J.; Owen, K. R. *Diabetologia* **2011**, *54* (5), 1261–1263.
- (111) Pihoker, C.; Gilliam, L. K.; Ellard, S.; Dabelea, D.; Davis, C.; Dolan, L. M.; Greenbaum, C. J.; Imperatore, G.; Lawrence, J. M.; Marcovina, S. M.; Mayer-Davis, E.; Rodriguez, B. L.; Steck, A. K.; Williams, D. E.; Hattersley, A. T. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98* (10), 4055–4062.
- (112) Flannick, J.; Beer, N. L.; Bick, A. G.; Agarwala, V.; Molnes, J.; Gupta, N.; Burt, N. P.; Florez, J. C.; Meigs, J. B.; Taylor, H.; Lyssenko, V.; Irgens, H.; Fox, E.; Burslem, F.; Johansson, S.; Brosnan, M. J.; Trimmer, J. K.; Newton-Cheh, C.; Tuomi, T.; Molven, A.; Wilson, J. G.; O'Donnell, C. J.; Kathiresan, S.; Hirschhorn, J. N.; Njølstad, P. R.; Rolph, T.; Seidman, J. G.; Gabriel, S.; Cox, D. R.; Seidman, C. E.; Groop, L.; Altshuler, D. *Nat Genet* **2013**, *45* (11), 1380–1385.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 09. srpnja 1986. u Ptuju, Republika Slovenija. Opću sam gimnaziju završila 2005. godine u Krapini, te iste godine upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad naslova „Unapređenje metode otpuštanja i analize *N*-glikana biljnih glikoproteina na primjeru peroksidaze iz hrena“ izradila sam na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olge Gornik, te studij završila 2010. godine. Nakon završenog diplomskog studija u razdoblju od dvije godine radila sam u javnoj ljekarni. Doktorski studij kemije, smjer biokemija, upisala sam 2013. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Trenutno sam zaposlena na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju, kao članica glikobiološke grupe.

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

- 2016 – Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Berlin, Njemačka - usavršavanje u području spektrometrije masa
- 2016 – Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford, Oxford, Velika Britanija – usavršavanje u interpretaciji patogenosti varijanti gena *HNFLA*
- 2015 – Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford, Oxford, Velika Britanija – usavršavanje u sekvenciranju gena *HNFLA*

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

1. Keser T, Vučković F, Barrios C, Zierer J, Wahl A, Akinkuolie AO, Štambuk J, Nakić N, **Pavić T**, Periša J, Mora S, Gieger C, Menni C, Spector TD, Gornik O, Lauc G. Effects of statins on the immunoglobulin G glycome. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Mar 2;1861:1152-1158. doi: 10,1016/j.bbagen,2017.02.029.
2. **Pavić T**, Gornik O. Analysis of N-Glycosylation of Total Membrane Proteins. *Methods Mol Biol*. 2017;1503:197-205.
3. **Pavić T**, Gudelj I, Keser T, Pučić-Baković M, Gornik O. Enrichment of hydrophobic membrane proteins using Triton X-114 and subsequent analysis of their N-glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1860(8):1710-5. doi: 10,1016/j.bbagen,2015,12.025.
4. Freidin MB, Keser T, Gudelj I, Štambuk J, Vučenović D, Allegri M, **Pavić T**, Šimurina M, Fabiane SM, Lauc G, Williams FM. The Association Between Low Back Pain and Composition of IgG Glycome. *Sci Rep*. 2016 May 27;6:26815. doi: 10,1038/srep26815.
5. Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, Pučić-Baković M, Štambuk J, Trbojević-Akmačić I, Barrios C, **Pavić T**, Menni C, Wang Y, Zhou Y, Cui L, Song H, Zeng Q, Guo X, Pons-Estel BA, McKeigue P, Leslie Patrick A, Gornik O, Spector TD, Harjaček M, Alarcon-Riquelme M, Molokhia M, Wang W, Lauc G. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Nov;67(11):2978-89. doi: 10,1002/art,39273.
6. Barrios C, Zierer J, Gudelj I, Štambuk J, Ugrina I, Rodríguez E, Soler MJ, **Pavić T**, Šimurina M, Keser T, Pučić-Baković M, Mangino M, Pascual J, Spector TD, Lauc G, Menni C. Glycosylation Profile of IgG in Moderate Kidney Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Mar;27(3):933-41. doi: 10,1681/ASN,2015010109.
7. Gudelj I, Keser T, Vučković F, Škaro V, Goreta SŠ, **Pavić T**, Dumić J, Primorac D, Lauc G, Gornik O. Estimation of human age using N-glycan profiles from bloodstains. *Int J Legal Med*. 2015 Sep;129(5):955-61. doi: 10,1007/s00414-015-1162-x.
8. Gornik O, **Pavić T**, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1820(9):1318-26. doi: 10,1016/j.bbagen,2011,12.004. Review.

KONFERENCIJE I RADIONICE

- 2017 – 12th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium, Dubrovnik, Hrvatska – poster
- 2016 – Workshop: Analysis of peptides and proteins by LC-MS, Zagreb, Hrvatska
- 2015 – 2015 Meeting of Society for Glycobiology, San Francisco, SAD – poster
- 2015 – 26th Joint Glycobiology Meeting, Lille, Francuska – kratka oralna prezentacija + poster
- 2015 – 23rd International Symposium on Glycoconjugates, Split, Hrvatska – poster
- 2014 – Workshop on Protection of Intellectual Property, Zagreb, Hrvatska
- 2014 – 25th Joint Glycobiology Meeting, Gent, Belgija – poster
- 2013 – 8th ISABS Conference in Forensic, Anthropological and Medicinal Genetics, Split, Hrvatska

NAGRADE I PRIZNANJA

- 2009 – 2010 Stipendija NZPUSS-a za osobito nadarene studente
- 2005 – 2009 Državna stipendija za osobito nadarene studente