

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Dragana B. Robajac

**N-glikom membranskih proteina i
receptora za insulin i faktore rasta slične
insulinu, izolovanih iz humane placentе
u različitim (pato)fiziološkim stanjima**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Dragana B. Robajac

**N-glycome of membrane proteins and
receptors for insulin and insulin-like
growth factors, isolated from human
placenta at different
(patho)physiological states**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

dr Romana Masnikosa, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Članovi komisije:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

dr Romana Masnikosa, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Institutu za primenu nuklearne energije - INEP u Zemunu i Flamanskom institutu za biotehnologiju u Gentu.

Veliku zahvalnost dugujem doktorki Romani Masnikosi, koja je do samog kraja izvela ovu doktorsku disertaciju. Hvala na upornim i iscrpnim ponavljanjima zahvaljujući kojima sam uspela da nadogradim svoje znanje, kao i na sugestijama i korekcijama koje su doprinele kvalitetu ove teze od samog početka njene izrade.

Profesorki Ljubi Mandić dugujem posebnu zahvalnost zbog interesovanja koje je pokazala tokom mojih doktorskih studija, kao i prilikom finalne izrade ove teze, zahvaljujući čemu je teza znatno dobila na kvalitetu.

Veliko hvala i profesorki Mariji Gavrović-Jankulović na interesovanju za ovu doktorsku disertaciju, kao i na predlozima i sugestijama u finalnoj izradi ove teze.

Velerie, as your foetus, I thank you for your kindest support and for accepting me to your lab (and the lab of professor Claude Libert). I appreciate all you have done for me. As you can see, you have helped us to pave completely new brick-road.

Zahvaljujem se osoblju iz Instituta za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije i Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front“ Beograd. Posebno dr Željku Mikoviću, dr Vesni Mandić i dr Dejanu Filimonoviću.

Zahvaljujem se članovima svoje grupe: Goranu, Milošu, Ani i Nikoli, ali i ostalim kolegama i saradnicima INEP-a, jer je svako (ne)svesno dao svoj doprinos prilikom izrade ove teze.

Na kraju, hvala doktorki Olgici Nedić jer mi je, pored svih mojih mana, pružila šansu da budem deo grupe koju vodi. I dalje je nepoznato da li je pogrešila.

N-glikom membranskih proteina i receptora za insulin i faktore rasta slične insulinu, izolovanih iz humane placente u različitim (pato)fiziološkim stanjima

Rezime

Funkcije membranskih proteina su brojne: međucelijska komunikacija, adhezija, signalna transdukcija. Većina membranskih proteina je glikozilovana i N-glikani imaju važnu ulogu u formiranju trodimenzionalne strukture membranskih proteina, kao i u ispoljavanju njihove funkcije. Receptori za insulin (IR) i faktor rasta sličan insulinu tip 1 (IGF1R) su transmembranske tirozin-kinaze sa visokim stepenom homologije (u nekim domenima čak i 80%). Familija IGF receptora, pored IR i IGF1R, uključuje i receptor za faktore rasta slične insulinu tip 2 (IGF2R). Sva tri receptora (IR, IGF1R i IGF2R) su glikozilovani i obilno prisutni u placenti, gde imaju važne uloge u njenom razvoju i funkcionisanju.

Placenta raste i razvija se da bi ispunila različite potrebe fetusa, pa se struktura i funkcija placente menjaju tokom gestacije. Znajući da su proteini odgovorni za biološke funkcije placente pretpostavljeno je da tokom gestacije može doći i do promene u sadržaju različitih tipova N-glikana prisutnih na membranskim proteinima. U ovoj tezi analizirani su tipovi N-glikana koji se mogu naći u sastavu membranskih glikoproteina, odnosno membranski N-glikom proteina humane placente. Ispitana je podložnost membranskog N-glikoma individualnim varijacijama i uticaju starosti majke/trudnice, kao i uticaj gestacije na membranski N-glikom. Znajući da je izmenjena glikozilacija često povezana sa izmenjenom funkcijom, kao i da izmenjena funkcija jednog ili više proteina može biti uzrok bolesti, ispitane su potencijalne promene membranskog N-glikoma u patološkim trudnoćama (kod preeklampsije) i trudnoćama komplikovanim patologijom majki (dijabetes). Uporedo je ispitan i uticaj starosti, gestacije i patologije na tip i zastupljenost različitih N-glikana koji ulaze u sastav receptora IGF sistema. Cilj je bio da se ispita da li promene na ukupnim membranskim proteinima (na N-glikomu) prate promene N-glikana prisutnih na pojedinačnim membranskim glikoproteinima važnim za rast i funkcionisanje placente.

Pokazano je da je membranski N-glikom bogat različitim N-glikanskim strukturama, od kojih je jedanaest struktura najzastupljenije, i to su: biantenarni N-

glikani: bigalaktozilovani glikan bez fukoze (Fuc) u jezgru - NA2, bigalaktozilovani glikan sa Fuc u jezgru NA2F, bigalaktozilovani glikan sa Fuc u jezgru i sa umetnutim ostatkom N-acetilglukozamina (GlcNAc) - NA2FB, agalakto glikan sa Fuc u jezgru - NGA2, triantenarni N-glikani sa antenarnom Fuc - Na3Fb, triantenarni N-glikani sa Fuc u jezgru - NA3F i tetraantenarni N-glikani sa antenarnom Fuc - Na4Fb. Strukture preostalih N-glikana koji se eluiraju na pozicijama max1, max2 i max6 pretpostavljene su na osnovu retencionih vremena RNaze B, dok struktura max4 nije mogla biti identifikovana. Pokazano je da starost žena nema uticaja na membranski N-glikom humane placente. U uzorcima placenti različite gestacijske starosti (placenta prvog i placenta trećeg trimestra) prisutno je svih jedanaest N-glikanskih struktura, ali je njihova zastupljenost različita, i razlika se javlja kod devet od jedanaest N-glikanskih frakcija. Tokom gestacije sadržaj paucimanoznih, NA2F i NA3F N-glikana se povećava, dok se sadržaj NGA2, max4, NA2, max6 i NA2FB smanjuje. Nađeno je da preeklampsija dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti manjih N-glikana (paucimanozne strukture, NGA2 i max4) i smanjenja zastupljenosti većih N-glikana (NA2, max6 i NA3F). Sa druge strane, u slučaju dijabetesa nađeno je da postoje razlike u odnosu na kontrolnu grupu, mada nije ustanovljena statistička značajnost.

Ispitivanjem uticaja starosti žena, gestacijske starosti placente i patoloških stanja na tip i zastupljenost N-glikana prisutnih na receptorima IGF sistema nađeno je: i) da starost žena ne utiče na tip i zastupljenost N-glikana prisutnih na IR i IGF2R, dok kod IGF1R sa starošću žena, u prvom trimestru trudnoće, dolazi do smanjenja sadržaja biantenarnih N-glikana, i povećanja sadržaja tri- i tetraantenarnih N-glikana; ii) da se tokom gestacije kod IR smanjuje sadržaj N-glikana koji nose ostatke L-Fuc, zatim biantenarnih N-glikana, i N-glikana koji se završavaju ostacima α 2,6-Sia, da se kod IGF1R tokom gestacije smanjuje sadržaj fukozilovanih i N-glikana koji se završavaju ostacima α 2,6-Sia, i povećava zastupljenost N-glikana sa jezgarnom Fuc, dok se kod IGF2R tokom gestacije povećava zastupljenost fukozilovanih N-glikana; iii) da dijabetes i preeklampsija ne dovode do promena tipa i zastupljenosti N-glikana prisutnih na IR, dok dijabetes ne dovodi do promena tipa i zastupljenosti N-glikana prisutnih na IGF1R i IGF2R.

Rezultati ove teze ukazuju da je N-glikozilacija proteina regulisana tokom razvoja, kao i da trend promena membranskog N-glikoma nije praćen istim trendom

promena na nivou N-glikana membranskih receptora odgovornih za rast, proliferaciju i diferencijaciju (IR, IGF1R i IGF2R).

Ključne reči: membranski proteini, N-glikani, N-glikom, insulinski receptor, receptori za faktore rasta slične insulinu tip 1 i 2, gestacijske promene, starosne promene, placenta

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija proteina

UDK broj: 577.112

N-glycome of membrane proteins and receptors for insulin and insulin-like growth factors, isolated from human placenta at different (patho)physiological states

Abstract

Membrane proteins have numerous functions such as cell-cell communication, adhesion and signal transduction. Most of them are glycosylated and N-glycans play important role in the formation of three-dimensional structure and function of membrane proteins. Receptors for insulin (IR) and the type 1 insulin-like growth factors receptor (IGF1R) are transmembrane tyrosine kinases with high degree of homology (in some domains even 80%). Together with IR and IGF1R, the family of IGF receptors includes the type 2 insulin-like growth factor receptor (IGF2R). All three receptors (IR, IGF1R and IGF2R) are glycosylated and abundantly present in placenta, where they play important roles in placental development and functions.

Placenta grows and differentiates to fulfil different needs of a foetus, so its structure and function change during gestation. Knowing that proteins are responsible for placental biological functions, it was assumed that during gestation, changes could occur in the content of different types of N-glycans present on membrane proteins. The types of N-glycans commonly found attached to membrane glycoproteins were examined, which resulted in an overview of the membrane N-glycome of human placental proteins. The susceptibility of membrane N-glycome to individual variations and to the effect of maternal/women age was investigated, as well as the influence of the gestational stage on membrane N-glycome. Knowing that altered glycosylation is often related to altered function, and that altered function of one or more proteins can cause a disease, potential changes in membrane N-glycome were analysed in pathological pregnancies (preeclampsia) and in pregnancies complicated by pathology of a mother (diabetes). The impact of aging, gestation and pathology on the type and abundance of different N-glycans on receptors belonging to the IGF system was investigated in parallel. The aim was to resolve whether changes on the entire membrane N-glycome coincide with changes on specific membrane glycoproteins important for placental growth and functions.

It was found that membrane N-glycome is rich in different N-glycan structures,

among which eleven are the most abundant: biantennary N-glycans: bigalactosylated glycans without core fucosylation - NA2, bigalactosylated glycan with core fucosylation - NA2F, bigalactosylated glycan with core fucosylation and bisected N-acetylglucosamine (GlcNAc) - NA2FB, agalacto glycan with core fucosylation - NGA2, triantennary N-glycan with antennary fucose (Fuc) - Na3Fb, triantennary N-glycan with core fucosylation - NA3F, and tetraantennary N-glycan with antennary Fuc - Na4Fb. Structures of glycans eluting at position of max1, max2 i max6 are suggested according to the retention times of RNase B glycans, while N-glycan eluting at position of max4 was not identified. It was found that maternal age does not affect N-glycome of human placental membrane. Investigating gestational influence on placental membrane N-glycome it was found that same eleven structures appear in all analyzed samples, except that their abundance differs in nine out of eleven glycan structures. While some glycans are more abundant at term (paucimannosidic, NA2F and NA3F), abundance of other glycans appears to be higher in the first trimester of gestation (NGA2, max4, NA2, max6 and NA2FB). It was found that preeclampsia significantly increases the abundance of smaller N-glycan structures (paucimannosidic, NGA2 and max4) and decreases the abundance of larger N-glycans (NA2, max6 and NA3F). In the case of diabetes, it was found that disease affects placental membrane N-glycome but obtained data were not subjected to statistical analysis.

Influence of maternal age, gestation and pathology on the type and abundance of N-glycans found on the receptors of IGF system showed that: i) maternal age does not affect the type and abundance of N-glycans present on IR and IGF2R, while in the case of IGF1R it was found that with maternal age, in first trimester of gestation content of biantennary N-glycans decreases and the content of tri- and tetraantennary N-glycans increases; ii) during gestation in the case of IR content of N-glycans with L-Fuc residues decreases as well as the content of biantennary N-glycans and N-glycans terminating with α 2,6-Sia, in the case of IGF1R during gestation content of fucosylated and N-glycans terminating with α 2,6-Sia decreases, while the content of N-glycans with core fucosylation increases, and in the case of IGF2R content of fucosylated N-glycans increases during gestation; iii) diabetes and preeclampsia do not affect type and abundance of N-glycans present on placental IR, and diabetes does not affect type and abundance of N-glycans present on placental IGF1R and IGF2R.

Data obtained in this PhD thesis revealed strong gestational impact on placental N-glycome, showing that membrane protein N-glycosylation is developmentally regulated. It was also found that changes on the membrane N-glycome are not in accordance with the pattern observed for N-glycans present on membrane receptors responsible for growth, proliferation and differentiation (IR, IGF1R and IGF2R).

Key words: membrane proteins, N-glycans, N-glycome, insulin receptor, insulin-like growth factor receptors type 1 and 2, gestational changes, aging, placenta

Scientific field: Biochemistry

Special topic: Biochemistry of proteins

UDC number: 577.112

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
2.1. Sistem faktora rasta sličnih insulinu	5
2.1.1. Signalni peptidi IGF sistema.....	5
2.1.2. Vezujući proteini za faktore rasta slične insulinu	6
2.1.3. Receptor za faktore rasta slične insulinu tip 1	8
2.1.4. Receptor za faktor rasta sličan insulinu tip 2	11
2.1.5. Insulinski receptor.....	12
2.2. Uloge IGF sistema u rastu i razviću, kao i u nekim bolestima	14
2.2.1. IGF sistem i embrionalni razvoj	15
2.2.2. IGF sistem i dijabetes.....	16
2.2.3. IGF sistem i zastoje rasta fetusa <i>in utero</i>	18
2.3. Glikozilacija proteina.....	20
2.3.1. Tipovi glikozilacije proteina	22
2.3.2. N-glikozilacija.....	24
2.3.2.1. Biosinteza N-glikana.....	25
2.3.2.2. Regulacija biosinteze N-glikana	33
2.3.2.3. Uloge N-glikana.....	37
2.4. Lektini	40
2.4.1. Biljni lektini	41
3. Materijal i metode	45
3.1. Hemikalije.....	46
3.2. Lektini	47
3.3. Antitela i enzimi.....	47
3.4. Aparati i prateće komponente	48

3.5. Uzorci.....	49
3.6. Izolovanje plazminih membrana i membranskih proteina iz placentnog tkiva	50
3.7. Obeležavanje liganada izotopom ^{125}I	52
3.8. Testovi vezivanja insulina za IR u epruveti.....	52
3.9. Lektinska afinitetna hromatografija.....	53
3.10. Elektroforetsko razdvajanje proteina i elektrotransfer.....	56
3.11. Bojenje gelova Coomassie brilliant blue bojom	57
3.12. Bojenje gelova Schiff-ovim reagensom.....	57
3.13. Imunoblot.....	58
3.14. Lektinski blot	59
3.15. Elektroforetsko razdvajanje ugljenih hidrata na DNK sekvenatoru	60
3.16. Analiza i obrada podataka.....	61
4. Rezultati i diskusija	62
4.1. Membranski N-glikom.....	63
4.1.1. Uticaj starosti žena na membranski N-glikom humane placente.....	65
4.1.1.1. Profil membranskog N-glikoma humane placente određen pomoću DSA-FACE	65
4.1.1.2. Lektinski blot N-glikozilovanih membranskih proteina iz humane placente	75
4.1.1.2.1. Provera lektinske specifičnosti	81
4.1.2. Gestacijske promene	85
4.1.2.1. Uticaj gestacijske starosti na profile mebranskog N-glikoma, određene pomoću DSA-FACE	86
4.1.2.2. Lektinski blot N-glikozilovanih membranskih proteina iz humane placente. Uticaj gestacijske starosti na membranski N-glikom.	91
4.1.3. N-glikom u patološkim stanjima.....	96

4.1.3.1. Uticaj preeklampsije i dijabetesa na profile N-glikana iz membranskih proteina humane placente, analiziran pomoću DSA-FACE	97
4.1.3.2. Membranski N-glikom u dijabetesu i preeklampsiji - analiza lektinskim blotom	102
4.2. N-glikani receptora za insulin i faktore rasta slične insulinu.....	106
4.2.1. N-glikani receptora za insulin.....	108
4.2.1.1. Uticaj starosti žena na sastav N-glikana receptora za insulin	108
4.2.1.2. Uticaj gestacijske starosti na sastav N-glikana receptora za insulin.....	112
4.2.1.3. Uticaj ¹²⁵ I-insulina na vezivanje kompleksa ¹²⁵ I-insulin-IR za SNA.....	116
4.2.1.4. Uticaj dijabetesa i preeklampsije na sastav N-glikana IR.....	119
4.2.2. N-glikani receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1	122
4.2.2.1. Uticaj starosti žena na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1	122
4.2.2.2. Uticaj gestacijske starosti na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1	125
4.2.2.3. Uticaj dijabetesa na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1	128
4.2.3. N-glikani receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2	130
4.2.3.1. Uticaj starosti žena na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2	131
4.2.3.2. Uticaj gestacijske starosti na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2	132
4.2.3.3. Uticaj dijabetesa na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2	134
4.2.3.4. Sumirani rezultati ispitivanja uticaja gestacije na sadržaj N-glikana IR, IGF1R i IGF2R	136
5. Zaključci.....	138
6. Literatura	140

Lista skraćenica

AAL - lektin narandžaste ljuspaste gljive

BSA - govedi serumski albumin

Con A - lektin tropskog pasulja

DM - dijabetes (*diabetes mellitus*)

DSA-FACE - elektroforetsko razdvajanje ugljenih hidrata na DNK sekvenatoru

ECL - lektin koralnog drveta

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta

ER - endoplazmatični retikulum

FGFR - receptori fibroblastnih faktora rasta

Fuc - fukoza

FUT - fukozil-transferaza

Gal - galaktoza

GalT - galaktozil-transferaza

Glc - glukoza

GlcNAc - N-acetilglukozamin

GNL - lektin visibabe

GnT, GlcNAcT - N-acetilglukozaminil-transferaza

hCG - humani horionski gonadotropin

IGF - faktori rasta slični insulinu

IGF1R - receptor za faktore rasta slične insulinu tip 1

IGF2R - receptor za faktore rasta slične insulinu tip 2

IGF-BP - vezujući proteini za faktore rasta

IGF-I -faktor rasta sličan insulinu tipa I

IGF-II - faktor rasta sličan insulinu tipa I

IgG - imunoglobulin G

IR - insulinski receptor

IUGR - zastoj rasta fetusa *in utero*

LAH - lektinska afinitetna hromatografija

LCA - lektin sočiva

MAL-II - lektin amurske makije

Man - manozna

NA2 - biantenarni glikan

NA2F - biantenarni glikan sa Fuc u jezgru

NA2FB - biantenarni glikan sa Fuc u jezgru i umetnutim GlcNAc ostatkom

NA3F - triantenarni glikan sa Fuc u jezgru

NA3Fb - antenarno fukozilovani triantenarni glikan

NA4Fb - antenarno fukozilovani tetraantenarni glikan

NGA2 - biantenarni agalakto glikan

NGA2F - biantenarni agalakto-glikan sa Fuc u jezgru

PDGFR - receptor faktora rasta izvedenih iz trombocita

PE - preeklampsija

PHA-E - lektin pasulja - eritroaglutinin

PHA-L - lektin pasulja - leukoaglutinin

PPTm - placenta prvog trimestra, mlađa grupa

PPTs - placenta prvog trimestra, starija grupa

PTTm - placenta trećeg trimestra, mlađa grupa

PTTs - placenta trećeg trimestra, starija grupa

RCA-I - lektin ricinusa - tip I

RNaza B - ribonukleaza B

SDS - natrijumdodecil-sulfat

SDS-PAGE - SDS-poliakrilamid gel elektroforeza

Sia, SA - sijalinska kiselina

SNA - lektin kore zove

ST - sijalil-transferaza

sWGA - sukcinilovani lektin pšenične klice

TK - tirozin-kinaza

t_r - retenciono vreme

UEA-I - lektin vresa - tip I

WGA - lektin pšenične klice

1. Uvod

Membranski proteini su u najvećem broju slučajeva glikozilovani. N-glikozilacija membranskih proteina zauzima bitno mesto u formiranju njihove trodimenzionalne strukture i njihovom funkcionisanju. U poslednjoj deceniji se u literaturi pojavio veći broj studija koje su demonstrirale učešće N-glikana na membranskim proteinima u ostvarivanju njihovih funkcija (kontakt sa drugim ćelijama, adhezija na ekstracelularni matriks, ćelijska migracija, transport jona i nutrijenata ka i van ćelije, odbrana ćelije od mikroorganizama itd.), o kojima govore i brojni revijalni radovi. Na primeru nekoliko membranskih receptora je pokazano da, u ćelijama u kojima je potpuno blokirana sinteza N-glikana, receptor ne dospeva na površinu ćelije, to jest ostaje u citoplazmi. Najnovija istraživanja su počela da otkrivaju mehanizme direktne sprege između metaboličkog fluksa heksoza i dužine poluživota receptora za faktore rasta (IGF1R, EGFR, PDGFR, FGFR) na površini ćelije, koji se odigravaju posredstvom stepena razgranatosti N-glikana vezanih za ove receptore.

Sistematsko profilisanje N-glikoma humanog seruma u zdravlju i bolesti je već godinama u toku, i odrađeno je više hiljada uzoraka. Izmenjena N-glikozilacija je već dovedena u vezu sa određenim oboljenjima. Odavno je poznato da kancerske ćelije po pravilu sekretuju glikoproteine sa izmenjenom glikozilacijom, koji mogu biti solubilni ali i membranski glikoproteini. Takvi proteini su potencijalni biomarkeri za određene bolesti. Postavlja se pitanje koji je razlog zbog kojeg je glikozilacija membranskih proteina ovoliko dugo bila van fokusa istraživanja. Jedan od odgovora na ovo pitanje leži u tome da je rad sa membranskim proteinima otežan zbog problema vezanih za njihovu rastvorljivost. Nekompatibilnost deterdženata sa mnogim analitičkim metodama, posebno onima za određivanje strukture glikana, verovatno predstavlja glavni uzrok nedostatka literaturnih podataka, koji se tiču glikozilacije membranskih proteina.

U početku izrade ove doktorske teze, u literaturi gotovo da nije bilo podataka o ukupnom membranskom N-glikomu bilo kojeg tkiva ili ćelijske linije. Takođe su i informacije o tipu i strukturi N-glikana vezanih za pojedinačne membranske proteine bile sporadične. Iz navedenih razloga, cilj ove teze je profilisanje membranskog N-glikoma jednog humanog tkiva, odnosno ispitivanje tipova N-glikana koji su najčešće vezani za membranske glikoproteine. Kao model-tkivo odabrana je humana placenta. Literaturni podaci ukazuju da su individualne varijacije u N-glikomu humanog seruma

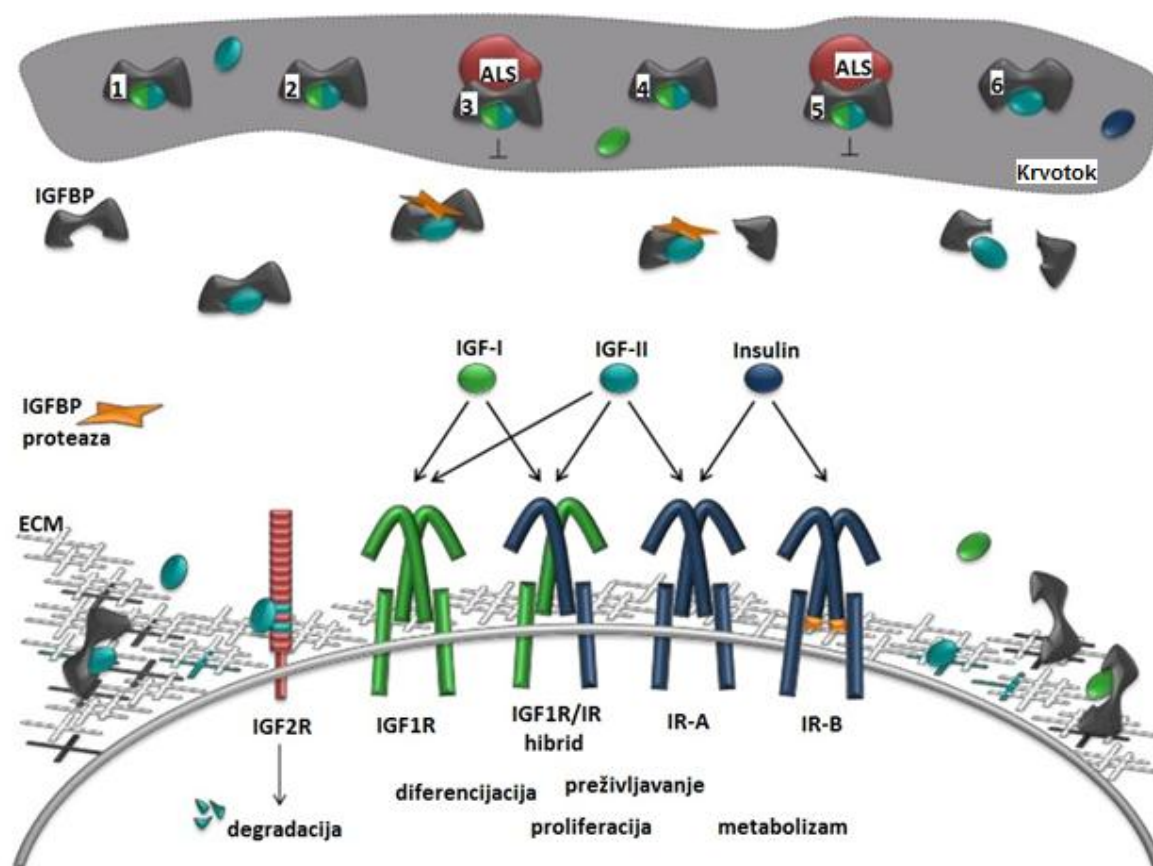
izrazite, i da se N-glikozilacija serumskih proteina menja sa starošću. U okviru ove teze ispitano je da li je membranski N-glikom placente podložan individualnim varijacijama i zavisi li od starosti žena. Placenta raste i razvija se u cilju ispunjenja zahteva fetusa, pa se njena struktura i funkcija znatno menjaju tokom gestacije. Znajući da su proteini nosioci bioloških funkcija placente, pretpostavljeno je da bi tokom gestacije moglo doći do promena u ekspresiji i/ili funkcionisanju membranskih proteina. Ove promene ne bi mogle biti na nivou aminokiselinske sekvence proteina, koja je određena genetskim kodom, već isključivo na nivou glikozilacije. Stoga je u okviru ove teze ispitan uticaj gestacijske starosti na N-glikom membranskih proteina iz humane placente. Na kraju, imajući u vidu da je izmenjena glikozilacija proteina često spregnuta sa izmenjenom funkcijom, kao i da izmenjena funkcija jednog ili više proteina može biti uzrok bolesti, u okviru ove teze ispitane su i potencijalne promene u membranskom N-glikomu kod patoloških trudnoća, kao i onih komplikovanih usled razvijene patologije kod majki. Membranski glikoproteini su izolovani iz placenti prvog i trećeg trimestra, dobijenih od žena iz različitih starosnih grupa, a takođe i iz placenti trećeg trimestra žena sa patološkim trudnoćama.

Placenta je bogat izvor receptora za insulin (IR) i faktore rasta slične insulinu tip 1 i 2 (IGF1R, IGF2R), koji ujedno imaju važne funkcije za njen rast i razvoj. Ovi receptori su membranski glikoproteini i obilno su N-glikozilovani. U literaturi postoji samo jedan rad u kojem je detaljno opisana analiza N-glikoma IR izolovanog iz ćelijske kulture, dok sličnih informacija o N-glikanima IGFR nema. Zbog toga je cilj ove teze bio da se upotpune trenutna saznanja o N-glikanima kovalentno vezanim za IR i IGFR iz humane placente. Pored toga, cilj je bio da se ispita da li su promene u sadržaju N-glikana na pojedinačnim proteinima placente u korelaciji sa promenama u membranskom N-glikomu placente. U okviru ove teze, prateći logiku ispitivanja membranskog N-glikoma, ispitani su tip i sadržaj N-glikana koji ulaze u sastav IR, IGF1R i IGF2R, kao i uticaj starosti žena, gestacijske starosti placente i patologije na tip i sadržaj N-glikana koji ulaze u sastav IR, IGF1R i IGF2R.

2. Pregled literature

2.1. Sistem faktora rasta sličnih insulinu

Sistem faktora rasta sličnih insulinu (IGF) sačinjavaju signalni peptidi i odgovarajući specifični vezujući proteini i receptori. Šematski prikaz IGF sistema dat je na Slici 1, dok su struktura i funkcija pojedinačnih komponenti ovog sistema objašnjene u narednim poglavljima.

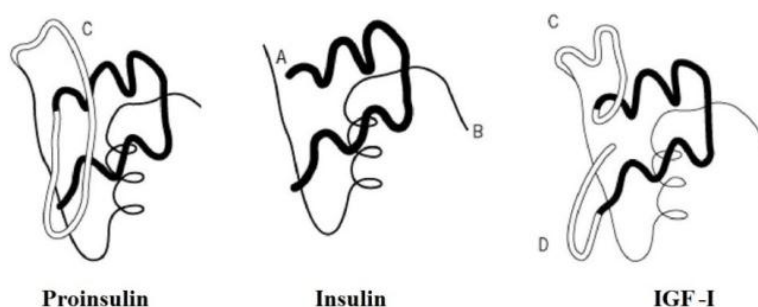


Slika 1. Grafički prikaz komponenti koje ulaze u sastav sistema faktora rasta sličnih insulinu. Slika je preuzeta sa sajta www.igfmutation.flinders.edu.au i prerađena.

2.1.1. Signalni peptidi IGF sistema

Faktor rasta sličan insulinu tipa I (IGF-I) i faktor rasta sličan insulinu tipa II (IGF-II) dele 50% sličnosti u sekvenci sa insulinom. Slično proinsulinu, zreli IGF-I i IGF-II peptidi se sastoje od domena B, C i A (na N-terminalnom kraju) i dodatnog D-

domena (na C-terminalnom kraju), kog nema u proinsulinu (Daughaday i Rotwein, 1989). Uporedni prikaz struktura nekih signalnih peptida IGF sistema dat je na Slici 2.



Slika 2. Šematski prikaz trodimenzionalne strukture proinsulina, insulina i IGF-I. Slika je preuzeta sa www.what-when-how.com i prerađena.

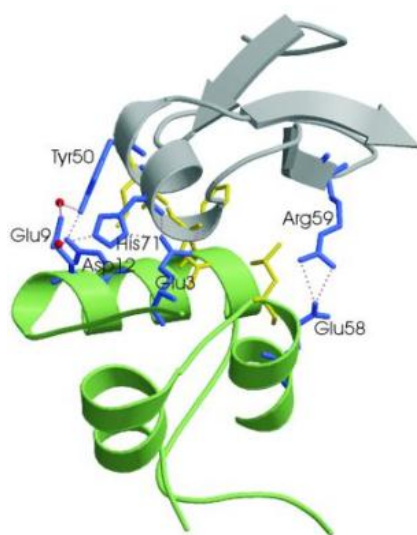
Gen koji kodira humani IGF-I nalazi se na hromozomu 12q. IGF-I je jednolančani polipeptid koji se sastoji od 70 aminokiselina, molekulske mase od 7,6 kDa (Zarilli i sar., 1994). U postnatalnom periodu glavni izvor IGF-I u cirkulaciji je jetra, dok je njegova proizvodnja pod kontrolom hormona rasta. Koncentracija IGF-I, kao i koncentracija hormona rasta, zavisi od pola, starosti, ishrane (Zarilli i sar., 1994).

Gen koji kodira humani IGF-II nalazi se na hromozomu 11p (Bell i sar., 1985), a njegova aktivnost je pod kontrolom genetskog imprintinga (Giannoukakis i sar., 1993). IGF-II je jednolančani polipeptid koji se sastoji od 67 aminokiselina, molekulske mase 7,5 kDa. Ekspresija IGF-II nešto je veća tokom embrionalnog života nego u postnatalnom periodu (O'Dell i Day, 1998).

2.1.2. Vezujući proteini za faktore rasta slične insulinu

U sklopu IGF sistema nalazi se nekoliko proteina, koji specifično i sa velikim afinitetom vezuju IGF peptide, a šest najzastupljenijih IGF vezujućih proteina su označeni od IGFBP-1 do IGFBP-6. Smatra se da je njihova glavna uloga da transportuju cirkulišuće IGF peptide do ciljnih tkiva, regulišući tako njihovu dostupnost i biološku aktivnost. Dva manje ispitana vezujuća proteina, otkrivena kasnije, označena su kao IGFBP-7 i IGFBP-8 (Kostecká i Blahovec, 2002).

Zreli IGFBP imaju dužinu od 216-289 aminokiselinskih ostataka. Sastoje se od tri domena, približno iste veličine: N-, C- i L-domena. Za razliku od N- i C- domena, koji dele visok stepen homologije, L-domen (engl. *linker*, jer povezuje N i C domene) se razlikuje između različitih IGFBP. Donedavno se smatralo da se IGF peptidi vezuju za N-terminalni domen, označen kao IGFBP domen. C-terminalni domen označen je kao tireoglobulinski domen tip 1, a prema novijim studijama i C-terminalni domen igra esencijalnu ulogu u visokoafinitetnom vezivanju IGF peptida za IGFBP. Hwa smatra da su potrebne dodatne studije da bi se rasvetlile interakcije između IGF peptida i IGFBP, koje se možda razlikuju između pojedinih IGFBP (Hwa i sar., 1999). IGFBP domen se nalazi i u proteinima srodnim IGFBP, koji vezuju IGF peptide sa niskim afinitetom (Hwa i sar., 1999). IGFBP-1, IGFBP-3, IGFBP-4 i IGFBP-5 vezuju oba IGF peptida sa istim afinitetom, dok je afinitet IGFBP-2 i IGFBP-6 mnogo veći za IGF-II nego za IGF-I (Bach i sar., 1993). Na Slici 3 dat je prikaz strukture kompleksa IGFBP-5 i IGF-I.



Slika 3. Prikaz strukture kompleksa IGF-I (zeleni boja) i N-terminalnog domena IGFBP-5 (siva boja). Isprekidanom linijom plave boje označene su vodonične veze, a žutom bojom hidrofobni ostaci. Slika je preuzeta iz literature (Zesławski i sar., 2001).

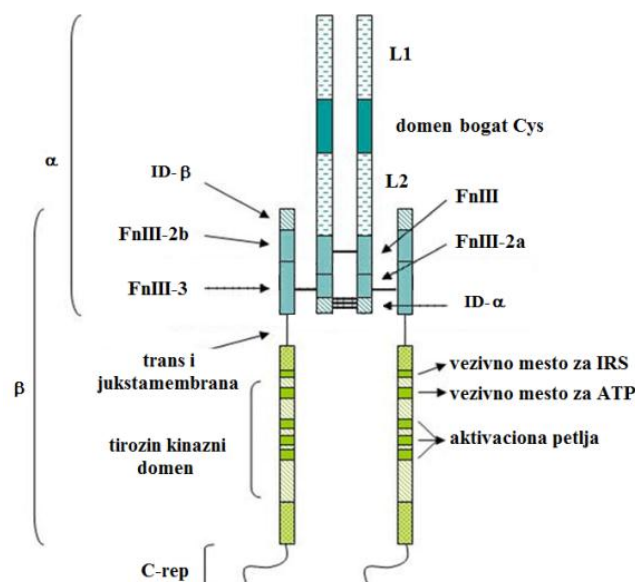
Većina IGF peptida iz humanog seruma cirkuliše vezana u ternarnom kompleksu sa IGFBP i ALS (engl. *acid labile subunit*, podjedinica nestabilna u kiselj sredini) (Boisclair i sar., 2001). Ovi kompleksi su toliko veliki da ne mogu da napuste krvotok, čime se produžava poluživot cirkulišućih IGF peptida (Boisclair i sar., 2001).

IGFBP podležu različitim tipovima post-translacionih modifikacija. IGFBP-3 i IGFBP-4 su N-glikozilovani (Firth i Baxter, 1999; Zhou i sar., 2003), dok su IGFBP-5 i IGFBP-6 O-glikozilovani (Graham i sar., 2007; Neumann i sar., 1998). IGFBP-1, IGFBP-3 i IGFBP-5 su fosforilovani u različitom stepenu (Jones i sar., 1993; Hoeck i Mukku, 1994; Graham i sar., 2007). Glavne opšte uloge IGFBP su produžetak poluživota IGF peptida u cirkulaciji i sprečavanje da se vežu za insulinski receptor (IR) (Duan i Xu, 2005), dok pojedinačni IGFBP imaju i dodatne, tkivno-specijalizovane uloge (Baxter, 2000).

2.1.3. Receptor za faktore rasta slične insulinu tip 1

Receptor za faktore rasta sličan insulinu tip 1 (IGF1R) je tetramerna transmembranska tirozin-kinaza, otkrivena 1986. godine (Ullrich i sar., 1986). Gen za humani IGF1R se nalazi na 15q hromozomu i kodira prekursorski protein, koji se sastoji od 1367 ostataka aminokiselina, u šta je uključena i signalna sekvenca od 30 aminokiselina (Ullrich i sar., 1986). Ovaj receptor je široko rasprostranjen u mnogim tipovima ćelija fetalnih i postnatalnih tkiva. Receptor se aktivira po vezivanju liganada: IGF-I i IGF-II (Baker i sar., 1993). IGF1R može vezati i insulin, ukoliko je insulin prisutan u koncentracijama većim od fizioloških. Nakon vezivanja liganda sledi spektar raznovrsnih ćelijskih odgovora, kao što su proliferacija i zaštita ćelija od programirane ćelijske smrti, to jest apoptoze. Kao rezultat, transdukcija signala putem IGF-1R je glavna putanja odgovorna za somatski rast fetusa kod sisara, dok se postnatalni somatski rast kontroliše udruženim dejstvom hormona rasta i IGF peptida (Adams i sar., 2000). Interesantno je da su hepatociti i zreli B limfociti jedine ćelije koje ne eksprimiraju IGF1R (Romano, 2003).

IGF1R se sastoji od dve identične α podjedinice i dve identične β podjedinice, koje su međusobno povezane disulfidnim vezama u $\alpha_2\beta_2$ strukturu (Kim i Accili, 2002). Struktura IGF1R prikazana je na Slici 4.



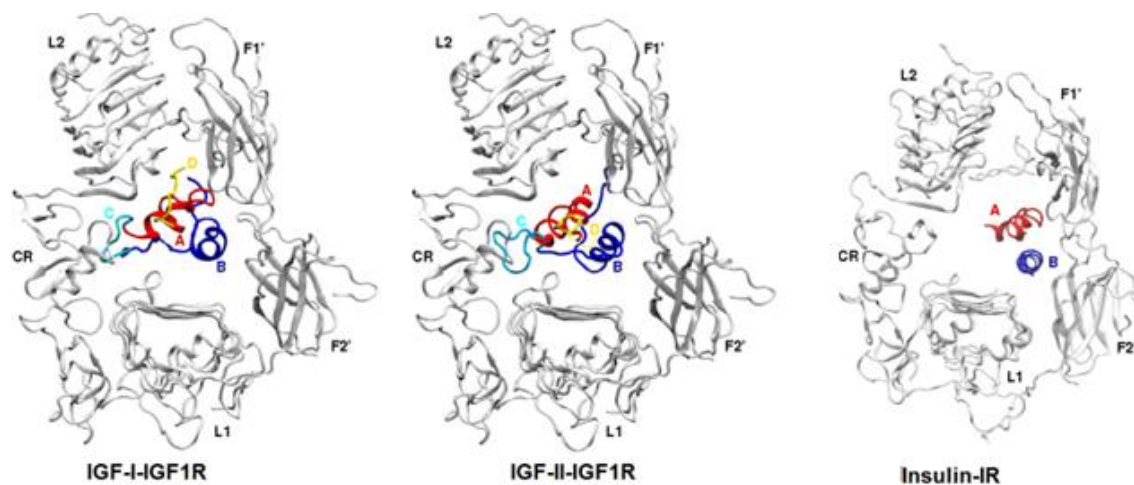
Slika 4. Grafički prikaz strukture IGF1R, odnosno raspodele domena u α i β podjedinicama receptora. Slika je preuzeta iz literature (Gatenby i sar., 2013) i prerađena.

Dok je α podjedinica postavljena potpuno ekstracelularno, β podjedinica sadrži kratki ekstracelularni domen, transmembranski domen i intracelularni domen, koji je ujedno i najveći deo β podjedinice. Intracelularni domen β podjedinice sastoji se od jukstamembranskog (domen tik uz membranu), tirozin-kinaznog i C-terminalnog domena. Nađene su i različite izoforme IGF1R, koje su najverovatnije posledica različite glikozilacije ili neke druge post-translacione modifikacije (Girnita i sar., 2014).

N-terminalni kraj ektodomena IGF1R sadrži dva homologa domena bogata Leu (L1 i L2), koji su razdvojeni regionom bogatim Cys. C-terminus ektodomena IGF1R se sastoji od tri fibronektinska domena tipa FnIII. Transmembranski segment je kratak. Intracelularni deo IGF1R sadrži katalitički domen tirozin-kinaze (TK). TK domen je smešten između jukstamembranskog regiona i C-terminusa, koji sadrži vezujuće mesto za fosfotirozin signalnih molekula (Gatenby i sar., 2013).

Vezivanje liganada za IGF1R (i za IR) prikazano je na Slici 5. Kada ligand nije vezan za receptor, ekstracelularni domen β podjedinice održava konformaciju u kojoj kinaza nije aktivna. Kada se ligand veže za IGF1R dolazi do autofosforilacije i aktivacije receptora (Adams i sar., 2000). Nakon autofosforilacije kinaznog domena, sledi autofosforilacija i drugih ostataka Tyr u β podjedinicama, koji predstavljaju vezujući motiv za signalne molekule koji su nishodno u signalnom putu. Signalne

putanje ovog receptora su: putanja PI3-kinaze i putanja MAP-kinaze. Supstrati IGF1R su: IRS proteini, Shc, 14.3.3, CRK, CSK, PI3-kinaza, SHP-2 fosfataza, Grb10 i drugi (Girnita i sar., 2014).



Slika 5. Prikaz vezivanja peptida IGF sistema za IGF1R i IR. A, B, C i D domeni u molekulima IGF-I, IGF-II i insulina prikazani su različitim bojama. Slika je preuzeta iz literature (Vashisth, 2015) i prerađena.

Signalna kaskada koju pokreće vezivanje liganda za IGF1R reguliše proliferaciju, diferencijaciju, adheziju, pokretljivost, metabolizam i preživljavanje većine ćelijskih tipova u embrionalnom i postnatalnom životu. Nasuprot tome, ekspresija i aktivnost IGF1R važni su za nastanak malignog fenotipa. Interesantno je da IGF1R u isto vreme može da doprinese prevođenju maligne ćelije u normalnu, zbog čega se već radi na lekovima za potencijalnu primenu u terapiji kancera, a koji bi ciljano delovali na IGF1R (Romano, 2003). U eksperimentima na miševima, u kojima je potpuno zaustavljena ekspresija IGF1R (isecanjem gena koji kodira IGF1R) po pravilu je dolazilo do smrti fetusa odmah po rođenju, čime je dokazana esencijalna uloga IGF1R u postnatalnom preživljavanju (Liu i sar., 1993). Sumirajući brojne uloge IGF1R, može se uočiti da IGF1R, u nekim ćelijskim tipovima, po aktivaciji pokreće diferencijaciju (npr. mioblasti, adipociti, i ćelije CNS). Izgleda paradoksalno da isti receptor propagira dva naizgled suprotna ćelijska programa: rast i proliferacija stoje nasuprot diferencijacije. Ovde stupa na scenu snaga ćelijskog konteksta, to jest proteina koji stoje nishodno od IGF1R na putu transdukcije signala. Naime IRS1 je glavni

medijator mitogenih signala, a ćelije koje ga nemaju doživljavaju da IGF1R aktivira Shc proteine, što vodi u program diferencijacije. Druga važna uloga IGF1R je kontrola ćelijske adhezije i pokretljivosti. I ovde je u pitanju dvostruka uloga IGF1R, to jest mogućnost da pokrene dva suprotstavljena programa, a ćelijski kontekst određuje ulogu IGF1R (Romano, 2003).

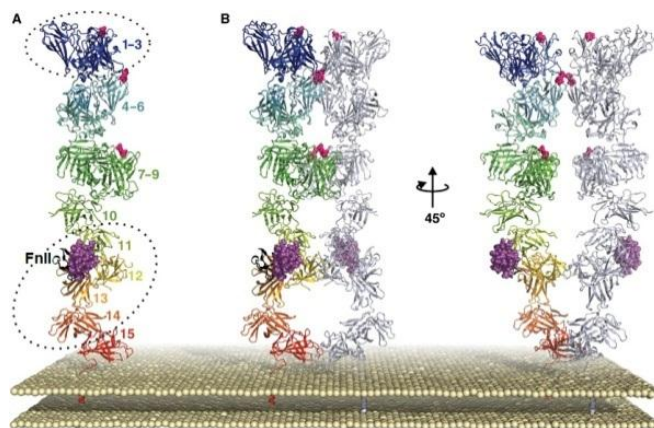
Ekstracelularni domen IGF1R sadrži 16 ostataka Asn u sekvenci Asn-X-Ser/Thr, koji su potencijalna mesta za N-glikozilaciju. Jedanaest mesta se nalazi na α podjedinici, a pet mesta na β podjedinici (Ullrich i sar., 1986). Molekulska masa α podjedinice je 80 kDa, a β podjedinice 71 kDa, bez glikana, a kada su glikozilovane 135 kDa i 90 kDa (Ullrich i sar., 1986). Za sada ne postoje literaturni podaci strukturne analize N-glikana prisutnih na IGF1R.

2.1.4. Receptor za faktor rasta sličan insulinu tip 2

Receptor za faktor rasta sličan insulinu tip 2 (IGF2R), poznat i kao katjon-nezavisni manoza-6-fosfatni receptor (jer vezuje manoza-6-fosfat, M6P) je transmembranski receptor molekulske mase od 270 kDa, čiji najveći deo čini ekstracelularni domen, dok su transmembranski i citoplazmatski domeni mnogo manji (Lobel i sar., 1988). Gen za humani IGF2R se nalazi na 6q hromozomu i kodira prekusorski protein, koji se sastoji od 2499 aminokiselina (Lobel i sar., 1988). Jedna od primarnih uloga IGF2R je transport lizozomskih enzima od *trans*-Goldžija do lizozoma, kao i ekstracelularnih lizozomskih enzima do lizozoma (Kornfeld, 1992). Kada IGF2R veže IGF-II, dolazi do degradacije ovog peptida (Kornfeld, 1992). Dugogodišnja je zagonetka ima li IGF2R ili nema ulogu u provođenju signala preko IGF-II, to jest da li je on uopšte signalni receptor, na šta upućuju novija istraživanja (Harris i sar., 2011). Kao i IGF-II, i IGF2R se najviše eksprimira tokom fetalnog razvoja, i njegov nivo opada u kasnijem dobu (Sklar i sar., 1992). Pretpostavljena struktura IGF2R prikazana je na Slici 6.

Ekstracelularni domen IGF2R sadrži vezivno mesto za ligande (npr. IGF-II, M6P), dok kratki citoplazmatski domen sadrži motive za koje se vezuju faktori neophodni za unutarćelijski transport IGF2R (Hille-Rehfeld, 1995). IGF2R sa najvećim afinitetom vezuje IGF-II, dok je njegov afinitet za IGF-I toliko nizak da pri fiziološkim

koncentracijama IGF-I neće doći do interakcije sa IGF2R (Tong i sar., 1988). Uloga IGF2R je da smanji efekat IGF-I i IGF-II. Serumski oblik IGF2R je manji od klasičnog IGF2R, zbog specifične proteolize ekstracelularnog domena receptora. Serumski oblik IGF2R može poslužiti i kao specifični IGF-II vezujući protein, to jest transporter za IGF-II. Neki autori smatraju da je serumski oblik IGF2R samo posledica glavnog mehanizma degradacije IGF2R (Clairmont i Czech, 1991).

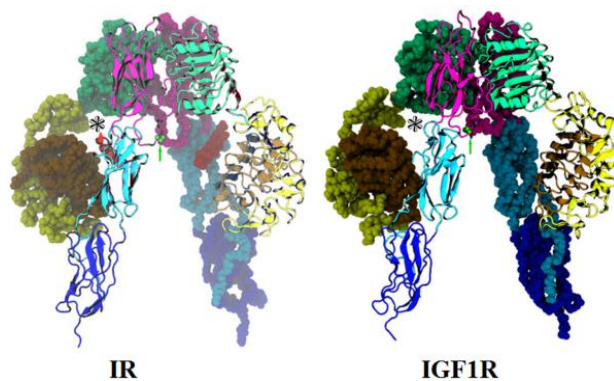


Slika 6. Pretpostavljeni model relativne organizacije ekstracelularnog domena (ektodomena) IGF2R. A) IGF2R monomer; B) dimer. Kuglicama roze boje označeno je vezivno mesto za Man-6-fosfat, a ljubičaste za IGF2R. Slika je preuzeta od Brown-a i saradnika (2008).

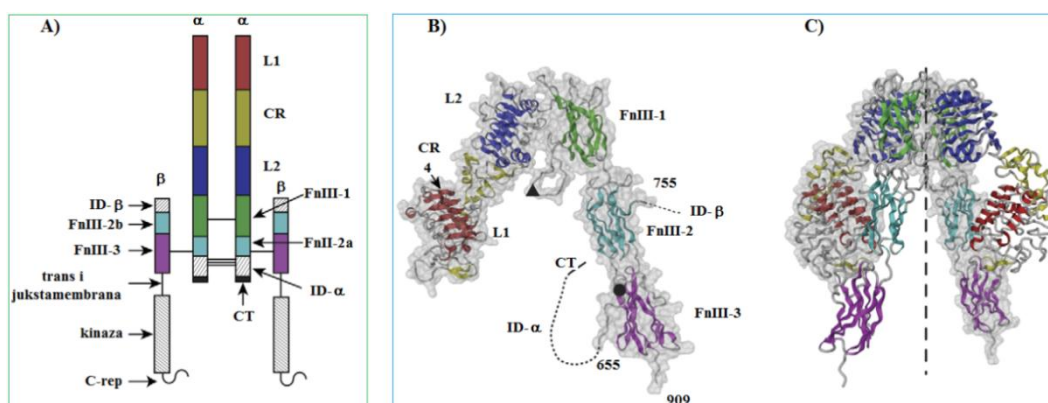
Ekstracelularni domen IGF2R sadrži 19 potencijalnih mesta za N-glikozilaciju, od kojih su bar dva mesta sigurno glikozilovana (Lobel i sar., 1987). Literaturni podaci strukturne analize N-glikana prisutnih na IGF2R trenutno ne postoje.

2.1.5. Insulinski receptor

Receptor za insulin (IR) je tetramerna transmembranska TK. Gen za humani IR se nalazi na 19p hromozomu i kodira prekursorski protein, koji se sastoji od 1382 aminokiseline (Seino i sar., 1989). IR i IGF1R su vrlo slične strukture, u pojedinim segmentima i do 70-80%, a najveća sličnost je u poslednjih 100 aminokiselina (Lou i sar., 2006). Uporedni prikaz struktura IR i IGF1R dat je na Slici 7, a na Slici 8 prikaz strukture IR.



Slika 7. Uporedni prikaz trodimenzionalnih struktura ektodomena IR i IGF1R. Strelicom zelene boje označen je položaj disulfidne veze unutar heterodimera. Zvezdicom je označeno jedno vezivno mesto. Slika je preuzeta od Vashisth-a (2015) i prerađena.



Slika 8. Prikaz strukture IR. A) Strukturalni domeni IR homodimera; B) trodimenzionalna struktura ektodomena monomera IR; C) trodimenzionalna struktura ektodomena homodimera IR. Trouglom je označen položaj disulfidnog mosta koji povezuje dve α podjedinice, a krugom disulfidna veza koja spaja α i β podjedinicu receptora. Brojevima su označeni N-terminusi α i β lanaca u ektodomenu prikazanog monomera. Slika je preuzeta iz literature (Lawrence i sar., 2007) i prerađena.

Kao i IGF1R, i IR se sastoji od dve α (135 kDa) i dve β podjedinice (95 kDa). Primarni translacioni proizvod iRNA za IR je linearna $\alpha\beta$ sekvenca, od koje proteolizom nastaju pojedinačne α i β podjedinice tek nakon formiranja disulfidnih veza između dva translaciona produkta. Na ovaj način nastaje $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer (Slika 8A). Oko 95% IR nalazi se u formi heterotetramera, od čega je 75% prisutno u plazminoj membrani (Hwang i Frost, 1999).

TK aktivnost IR je inhibirana sve do vezivanja liganda. Signalni put IR, kao i kod IGF1R, počinje vezivanjem liganda (insulin, IGF-I i IGF-II) za IR, odnosno aktiviranjem TK, što za posledicu ima autofosforilaciju receptora, a potom i aktivaciju proteinskih supstrata receptora (npr. IRS1, Shc, Gab1). Glavni supstrat je IRS1, koji se fosforiluje na ostacima Tyr. Posledica aktivacije IR je pokretanje metaboličkih puteva (Du i Wei, 2014).

Ektodomen IR postoji u dve forme koje nastaju alternativnom obradom iRNK, što ima za posledicu prisustvo ili odsustvo segmenta dugog 12 aminokiselinskih ostataka, koje kodira egzon 11. Forma IR koja ima ovaj peptidni segment na C-terminusu α podjedinice označena je kao forma IR-B, dok u IR-A ovaj peptid nedostaje. Smatra se da je IR-A visokoafinitetni receptor za IGF-II (Frasca i sar., 1999). IR-A i IR-B ne samo da imaju različit afinitet prema ligandima, već i različitu TK aktivnost i različit stepen internalizacije receptora. IR-A i IR-B pokazuju razlike u provođenju hormonskih signala unutar ćelije i razlike u tkivnoj distribuciji receptora (Uhles i sar., 2003). Izgleda da ovih 12 aminokiselinskih ostataka predstavljaju signal za sortiranje IR u različitim mikrodomenima plazmine membrane, odnosno u regionima plazmine membrane bogatim holesterolom, ali ne i kaveolinom (Uhles i sar., 2003).

Pored već pomenute velike sličnosti između IR i IGF1R, izgleda da u tkivima koja imaju visok sadržaj ova dva receptora, može doći do obrazovanja hibridnog receptora (HyR). HyR nastaju kombinovanjem $\alpha\beta$ dimera IGF1R i IR, i prema aktivnosti su sličniji IGF1R nego IR, jer imaju veći afinitet za IGF-I nego za insulin (Belfiore i sar., 2009).

IR je O-glikozilovan i N-glikozilovan (Hedo i sar., 1981; Herzberg i sar., 1985). Ima 18 potencijalnih mesta za N-glikozilaciju (14 na α i 4 na β podjedinici), od kojih je 16 i glikozilovano (Sparrow i sar., 2008). Detaljno je ispitana struktura N-glikana vezanih za IR, izolovanih iz CHO-K1 (Sparrow i sar., 2008).

2.2. Uloge IGF sistema u rastu i razviću, kao i u nekim bolestima

IGF sistem ima važnu ulogu u rastu, diferencijaciji i proliferaciji ćelija. Tako npr. insulin, IGF-I i IGF-II, u toku folikularne faze menstrualnog ciklusa, mogu delovati kao faktori preživljavanja folikula koji se nalaze u ranom razvojnem stadijumu (Louhio

i sar., 1999). Promene u IGF sistemu su u vezi sa brojnim patologijama, kao što je kancer. IGF2R kontroliše nivo IGF-II, olakšava aktivaciju inhibitora faktora rasta i reguliše unutarćelijski transport lizozomalnih enzima, što ga svrstava u potencijalne tumor-supresore. Uloga IGF2R u tumorogenezi potvrđena je i studijama na humanim kancerima, gde su u direktnu korelaciju dovedeni gubitak funkcije IGF2R i progresija tumorogeneze (Ghosh i sar., 2003). IR-A je uglavnom prisutan u fetalnim tkivima, ali je njegova ekspresija povećana kod tumora dojke i creva. Različite tumorske ćelije eksprimiraju IGF-II, koji je snažan aktivator IR-A, što za posledicu ima proliferaciju i preživljavanje kancerskih ćelija (Frasca i sar., 1999). Za kancere koji su zavisni od IGF1R već postoje lekovi koji su u kliničkim fazama ispitivanja. Takva su npr. antitela spram IGF-I i IGF-II, koja sprečavaju signaling preko IGF1R i HyR, ali ne ometaju signalni put IR. Zatim, postoje antitela spram ektodomena IGF1R, za koja se pokazalo da deluju na neke slučajeve kancera pluća. I, na kraju, tu je i grupa lekova koji za cilj imaju inhibiciju kinazne aktivnosti IGF1R. Iako su neki inhibitori dali pozitivne rezultate, dodatni problem predstavlja IR, zbog visokog stepena sličnosti sa IGF1R (Girnita i sar., 2014). U narednim poglavljima biće pojašnjene uloge IGF sistema koje su bitne za razumevanje rada u ovoj tezi.

2.2.1. IGF sistem i embrionalni razvoj

U humanoj placenti, citotrofoblasti proliferišu i diferenciraju se u dva podtipa: **ekstravilusne** trofoblaste, koji migriraju ka majčinskom endometriju gde remodeluju majčinske spiralne arterije, stvarajući krvne sudove niske otpornosti, uspostavljajući tako sistem snabdevanja placente i fetusa kiseonikom; i **sinciciotrofoblast**, koji predstavlja multinuklearni epitel koji deluje kao zaštitna barijera i membrana preko koje se odvija transport nutrijenata i gasova. Sinciciotrofoblast nema transkripcione aktivnosti zbog čega se tokom trudnoće održava zahvaljujući stalnoj proliferaciji i diferencijaciji citotrofoblasta. Ispod citotrofoblasta nalazi se mezenhimalno jedro placente, koje sadrži placentalne kapilare i različite ćelije, uključujući placentalne fibroblaste. Dakle, u prvoj polovini gestacije transformišu se trofoblasti, dok se značajni deo angiogeneze i vaskularizacije odigrava u drugoj polovini gestacije. Kraj gestacije karakteriše ekspanzija placente (Gude i sar., 2004).

Smanjen rast fetusa doveden je u vezu sa razvojnim anomalijama placente, zbog čega je predloženo da IGF sistem ima važnu ulogu u normalnom rastu i razvoju placente. IGF-I i IGF-II su prisutni u skoro svim ćelijama placente počev od šeste nedelje gestacije, gde doprinose proliferaciji i preživljavanju placentnih fibroblasta, migraciji i invaziji trofoblasta, dok IGF-I dodatno štiti trofoblaste i placentne fibroblaste od apoptoze. IGF-I reguliše i diferencijaciju citotrofoblasta u sinciciotrofoblast i ekstravilusne ćelije. Nivo IGF u krvi pupčane vrpce u direktnoj je korelaciji sa težinom novorođenčeta: nizak nivo IGF-I nađen je kod novorođenčadi koja su ispod prosečne težine za datu gestacijsku starost, a povišen nivo IGF-I nađen je kod novorođenčadi koja su iznad proseka težine za datu gestacijsku starost (Forbes i Westwood, 2008). Kod miševa je ciljanom eliminacijom *Igf1* došlo do embrionalnog zastoja rasta fetusa, koje se po rođenju manifestovalo kroz patuljast rast, a u kasnijem dobu kao zastoj u rastu i neplodnost (Liu i sar., 1993; Baker i sar., 1993). Funkcionalna inaktivacija *Igf2* takođe je uticala na embrionalni rast, ali ne i na postnatalni razvoj (DeChiara i sar., 1990). IGF1R je prisutan u svim ćelijama placente, pa promene u IGF1R takođe mogu uticati na rast fetusa. Miševi kod kojih je potpuno zaustavljena ekspresija IGF1R (isecanjem gena koji kodira IGF1R) imali su 60% nižu težinu od normalnih. Nasuprot tome, miševi kojima je nedostajao IGF2R imali su veću težinu na rođenju (Forbes i Westwood, 2008). Dvostruki nokauti za IGF1R i IGF2R rezultirali su embrionima normalne veličine, što je posledica odsustva degradacije IGF-II, koji svoje efekte ostvaruje vezivanjem za IR, održavajući tako normalan prenatalni rast. U odsustvu IGF-II, IGF1R i IGF2R, ovaj efekat ne postoji i miševi se opet rađaju sa trećinom normalne težine (Ludwig i sar., 1996).

2.2.2. IGF sistem i dijabetes

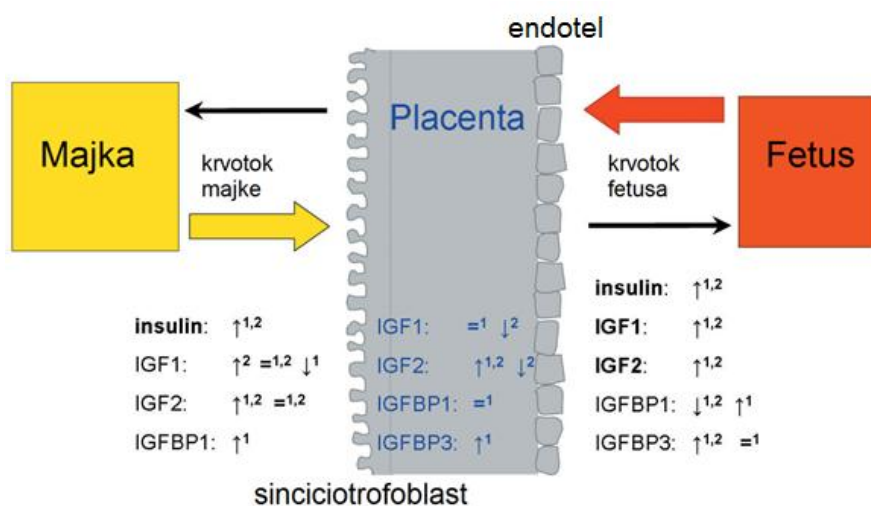
Zbog svoje pozicije placenta je izložena dejstvu hormona, citokina, faktora rasta i supstrata prisutnih u majčinoj i fetalnoj cirkulaciji, i nalazi se pod njihovim uticajem. Kod dijabetesa placenta prolazi kroz brojne strukturne i funkcionalne promene, čija priroda i stepen zavise od brojnih parametara uključujući kontrolu glikemije, način lečenja i period izloženosti lošoj metaboličkoj kontroli. Kada je placenta dugo izložena dislipidemiji i povećanim koncentracijama glukoze i insulina majke, prelazi se puferska

moć placente i dolazi do povećanog rasta placente i fetusa. Dijabetično okruženje fetusa, dakle, obuhvata mrežu različitih supstanci (hormona, citokina, nutrijenata) čije su koncentracije izmenjene u odnosu na fiziološko okruženje (Desoye i Hauguel-de Mouzon, 2007).

IR je bogato prisutan u placenti, gde se njegova lokacija menja u toku razvoja placente. U početku gestacije, IR se najvećim delom eksprimira na membrani sinciotrofoblasta, dok se na kraju gestacije uglavnom eksprimira na endotelu. Različita ekspresija IR tokom gestacije upućuje na prevođenje procesa koji zavise od insulina sa majke (na početku gestacije) na fetus (na kraju gestacije). Ova izmena praćena je i izmenom u funkciji IR, jer je ekspresija gena indukovana insulinom viša u trofoblastima prvog trimestra. Insulin majke ispoljava mitogeni efekat, dok fetalni insulin stimuliše metaboličke procese. Na početku trudnoće, insulin deluje na sinciotrofoblaste što može izmeniti sintezu i sekreciju hormona i citokina koji će potom delovati na majku. Kako gestacija napreduje, fetalni insulin preuzima kontrolu od majke i direktno ili indirektno deluje na endotel i tkivne makrofage. Na kraju gestacije insulin ima jači efekat na endotel nego na trofoblaste, što je važno za dijabetične trudnoće jer se pretpostavlja da fetalna hiperinsulinemija utiče na placentni endotel. Promena režima ishrane kod gestacijskog dijabetesa dovodi do smanjenja ekspresije IR na trofoblastima, dok se kod gestacijskog dijabetesa tretiranog insulinom broj IR u placenti povećava (Desoye i Hauguel-de Mouzon, 2007). Insulin/IGF sistem je snažan regulator razvoja i rasta, a u gestacijama komplikovanim dijabetesom povišen nivo insulina u krvi pupčane vrpce može biti signal da je došlo do fetalnih promena (Hiden i sar., 2009).

Izlaganje fetusa hiperglikemiji *in utero* dovodi do nagomilavanja masti i kongenitalnih malformacija (poput srčanih, mišićno-skeletnih i anomalija centralnog nervnog sistema), kao i do povećanog rizika od gojaznosti, dijabetesa tip 2, metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih bolesti u kasnijem životnom dobu, saglasno istraživanjima na životinjama (Schaefer-Graf i sar., 2000; Ryan i sar., 1995). Ekspresija *Ir*, *Igf1r* i naročito *Igf2r* u placenti pacova sa blažim oblikom dijabetesa bila je povećana u poređenju sa kontrolnom grupom (White i sar., 2015). Pojačana aktivacija signalnog puta IR, na eksperimentalnim životinjama, dovedena je u vezu sa respiratornim distres-sindromom novorođenčadi, poremećaja koji se često javlja kod majki koje su imale dijabetes (Ikeda i sar., 2011). Promene u transdukciji insulinskog signala nađene su u

placenta gojaznih žena i žena sa dijabetesom (Colomiere i sar., 2009). Primećene su i funkcionalne promene na IGF1R poreklom iz placente pacova sa dijabetesom, iako vezivanje liganda za ovaj receptor nije bilo izmenjeno (Hauguel-de Mouzon i sar., 1992). Na kraju, primećene su morfološke i funkcionalne promene u tkivu placente žena sa gestacijskim dijabetesom, najverovatnije kao posledica promena u distribuciji oligosaharida prisutnih na glikokonjugatima ćelijskih površina (Sgambati i sar., 2007). Uticaj IGF sistema majke i fetusa na placentu, kod normalne trudnoće i one praćene dijabetesom, šematski je prikazan na Slici 9.



Slika 9. Uzajamni odnos komponenti IGF sistema majke, fetusa i placente. Promene koncentracija pojedinačnih peptida i proteina IGF sistema, koje su izmerene kod žena sa dijabetesom tip 1 (na slici označen brojem 1) ili gestacijskim dijabetesom (označen brojem 2), prikazane su u poređenju sa odgovarajućim vrednostima karakterističnim za zdravu gestaciju. Slika je preuzeta od Hiden-a i sar. (2009) i preuređena.

2.2.3. IGF sistem i zastoje rasta fetusa *in utero*

Hipertenzivni poremećaji gestacije drugi su najčešći uzrok smrti trudnica u razvijenim zemljama. Hipertenzija je istovremeno i najčešća komplikacija koja se sreće tokom gestacije, i javlja se u 5-10% slučajeva (Vest i sar., 2014). Uzimajući u obzir povećanu učestalost hipertenzije i dijabetesa kod trudnica, kao i pomeranje starosne granice za majčinstvo, sadašnji procenat hipertenzivnih trudnoća je, najverovatnije, znatno viši. Hipertenzija tokom gestacije povezana je sa povećanim rizikom od

intracerebralnog krvarenja, prevremenog odvajanja placente od zida materice, fetalnog zastoja u rastu, prevremenog porođaja i smrti fetusa *in utero*. Hipertenzivni poremećaji gestacije se svrstavaju u četiri kategorije:

1. preeklampsija (PE) i eklampsija,
2. hronična hipertenzija,
3. PE kao posledica hronične hipertenzije,
4. gestacijska hipertenzija.

Glavni histopatološki nalaz u PE je plitka invazija trofoblasta i nepravilno remodelovanje majčinskih spiralnih arterija, koje ostaju sužene i otporne, što dovodi do smanjene uteroplacentalne perfuzije. Smanjena perfuzija kod PE povezuje se sa inflamacijom, oksidativnim stresom, pa čak i infarktom (Vest i sar., 2014). Ispitivanjem genske ekspresije u placentama dobijenim od žena sa PE došlo se do zaključka o aberantnoj ekspresiji gena, i pretpostavke da je hipoksija jedan od mogućih uzroka nekih tipova PE (Soleymanlou i sar., 2005). Još jedan mogući uzrok PE su genetski faktori (Morgan, 2010).

IUGR (engl. *intrauterine growth restriction*) je definisan kao nemogućnost fetusa da ispuni svoj genetski predodređen rast, i često je kombinovan sa PE. Sve je veći broj dokaza da je genetska predispozicija bitna i za razvoj IUGR (Yamada i sar., 2005). Nađeno je da je nivo iRNK, prepisanih sa *IGF-I* i *IGF1R*, kao i koncentracije IGF-I i IGF1R u tkivu placente veći u slučajevima kada su gestacije praćene IUGR, nego što je to slučaj sa zdravim placentama. Takođe je primećen i niži sadržaj ova dva proteina u placentama iz gestacija, koje su rezultovale rođenjem beba veće težine nego što je imaju zdrave bebe (Iñiguez i sar., 2010). Podaci novijeg datuma ukazuju da genetske varijacije na nivou *IGF-I* i *IGF1R* nemaju bitnu ulogu u nastanku IUGR (Muetze i sar., 2010). Imunohistohemijom je pokazano da su distribucija i lokalizacija IGF1R nepromenjeni kod IUGR u odnosu na normalne trudnoće (Forbes i Westwood, 2008).

2.3. Glikozilacija proteina

Post-translacione modifikacije mogu značajno doprineti fizičkim i biohemijskim karakteristikama proteina, kao i uticati na njihovu interakciju sa drugim molekulima (Walsh i sar., 2005). Glikozilacija predstavlja jednu od najčešćih post-translacionih modifikacija proteina. Smatra se da je više od polovine ukupnog broja poznatih proteina N-glikozilovano (Apweiler i sar., 1999). Veliki broj proteina je i O-glikozilovan. Glikozilacija je jedina post-translaciona modifikacija koja uvodi značajne strukturne promene u protein (Lauc i Zoldoš, 2010). Kod jednoćelijskih organizama, glikoproteini uglavnom služe samo kao strukturne komponente membrane, dok kod višećelijskih organizama oni zadobijaju mnogobrojne raznovrsne složene uloge, koje su potrebne za integraciju brojnih pojedinačnih ćelija u jedinstvenu funkcionalnu jedinicu (Varki, 1993; Lauc i Zoldoš, 2010).

Glikom obuhvata sve glikane koje sintetiše jedan organizam. Uobičajeno je da se saharid vezan za protein naziva glikan. Tipičan glikan je kompleksni molekul sastavljen od 10 do 15 monosaharidnih ostataka, koji su međusobno povezani na složen način. Za proteine se može kovalentno vezati najmanje 7000 različitih glikanskih determinanti, što čini glikoproteom nekoliko redova veličine kompleksnijim od samog proteoma (Moremen i sar., 2012). Za razliku od proteina i DNK, koji se sintetišu kao linearni molekuli, glikani su kompleksne razgranate strukture koje su definisane ne samo redosledom monosaharidnih jedinica, već i tačnim položajem glikozidne veze, njenom anomernom konfiguracijom (α ili β), brojem grana (antena) i pozicijom grananja. Broj izomera koji se može kreirati polazeći od samo 10 monosaharida: fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), glukuronska kiselina (GlcA), iduronska kiselina (IdoA), manoza (Man), sijalinska kiselina (SA, Sia) i ksiloza (Xyl), daleko prevazilazi broj mogućih linearnih izomera koji se mogu napraviti od istog broja aminokiselina (Moremen i sar., 2012). Naravno, najveći broj ovih struktura ne postoji u prirodi, ali informacija sačuvana u ovako velikom broju mogućih različitih struktura je ogromna (Lauc i Zoldoš, 2010):

Sastav oligomera	broj glikana	broj peptida
Dimer AA-----	-----11	-----1
Dimer AB-----	-----20	-----2
Trimer AAA-----	-----120	-----1
Trimer ABC-----	-----720	-----6
Tetramer AAAA---	-----1424	-----1
Tetramer ABCD----	-----34560	-----24
Pentamer AAAAA-	-----17872	-----1
Pentamer ABCDE--	--2144640	---120

Ako uzmemo primer jednog glikoproteina, to izgleda ovako: na konzervisanom ostatku Asn297 u teškom lancu IgG može se naći preko 30 različitih glikana (Harada i sar., 1987). S obzirom na to da jedan molekul IgG ima dva teška lanca, preko 900 glikoizomera može proizaći iz samo jednog mesta za glikozilaciju (Lauc i Zoldoš, 2010). Prosečan glikoprotein ima od 2 do 5 mesta za glikane, što ima za posledicu neizmernu raznovrsnost glikoproteoma. Evolucija glikana izgleda da je bila mnogo brža od evolucije proteina, pa je česta pojava da različite vrste imaju značajno različite saharide vezane za gotovo identične proteine (Royle i sar., 2008).

Za razliku od proteina, za koje je informacija o sekvenci zapisana u genetskom kodu, sekvenca glikana na glikoproteinima nije (direktno) genetski kodirana. Drugim rečima, geni nedvosmisleno određuju sekvence proteina (a time i njihove trodimenzionalne strukture), dok za strukturu glikana ne postoji templat. Ipak, struktura glikana jeste na neki način kodirana, jer postoji veoma kompleksna i dinamična mreža stotine gena, koji kodiraju ne samo enzime odgovorne za sintezu glikana, nego i sve ostale proteine koji su uključeni u proces glikozilacije, tzv. gliko-geneti (Lauc i Zoldoš, 2010). Preko 700 proteina - produkata gliko-gena je do sada identifikovano (Nairn i sar., 2008). Tu se ubrajaju glikozil-transferaze (njih oko 200), glikozidaze, enzimi uključeni u biosintezu aktiviranih monosaharida, transportera, itd., ali i protonske pumpe, razni transkripcioni faktori i organizatori Goldžijevog aparata, kao i svi proteini koji regulišu ekspresiju i aktivnost pomenutih enzima i proteina (Nairn i sar., 2008). Neki od ovih enzima su veoma specifični, to jest uključeni su u sintezu samo malog broja struktura na određenim proteinima, dok su drugi (npr. glikozil-transferaze iz endoplazmatskog retikuluma (ER) koje započinju sintezu N-glikana) odgovorni za glikanske strukture

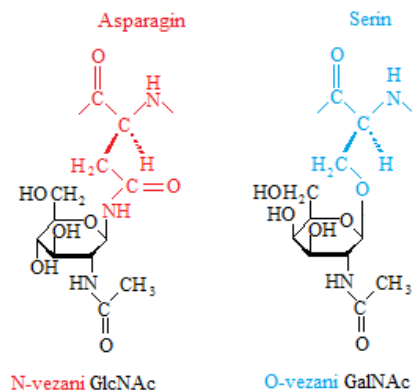
koje će nositi hiljade različitih glikoproteina (Lauc i Zoldoš, 2009). U svakom slučaju, složeni mehanizmi kojima se prepliću ekspresije stotine gliko-gena i koji rezultiraju u specifičnim glikanskim strukturama tek počinju da bivaju otkriveni (Nairn i sar., 2008).

2.3.1. Tipovi glikozilacije proteina

Glikozilacija proteina je svrstana u nekoliko tipova prema vrsti atoma iz aminokiselinskog ostatka proteina koji gradi kovalentnu vezu sa C atomom iz glikana:

1. N-glikozilacija: N-glikozidna veza se stvara između anomernog C atoma iz poslednjeg GlcNAc u glikanskom lancu i amino-grupe ostatka Asn iz proteina (Slika 10), u sekvenci Asn-X-Ser/Thr, gde je X bilo koja aminokiselina osim Pro. Pokazano je da se skoro dve trećine glikana javlja na ovoj sekvenci, ali se N-glikani mogu naći i na sekvenci Asn-X-Cys, ukoliko je cistein u redukovanoj formi (Spiro, 2002). N-glikozilovani proteini su komponente plazmine membrane ili su proteini koji se sekretuju iz ćelije - sekretovani proteini (Schwarz i Aebi, 2011).

2. O-glikozilacija: O-glikozidna veza se stvara između anomernog C atoma GalNAc i hidroksilne grupe Ser ili Thr (Slika 10) (ne postoji konsenzusna sekvencija za ovaj tip glikozilacije). O-glikozilacija se sreće i na membranskim, kao i na sekretovanim proteinima, ali i na unutarćelijskim proteinima. Najbolje izučeni tip O-glikozilacije je mucinski tip, kod kojeg se prvi ostatak ugljenog hidrata - α GalNAc dodaje na već uvijen protein. Dodavanje prvog ostatka GalNAc zavisi od primarne, sekundarne i tercijarne strukture (gliko)proteina. Dalje produžavanje lanca glikana (postepeno dodavanje jednog po jednog monosaharida u nizu) na mucinu katalizuju specifični enzimi - transferaze, a ceo proces je strogo regulisan. Lanci mucinskih glikana su obično kratki, sadrže 3-6 ostataka monosaharida (Van den Steen i sar., 1998). Mucini se transportuju do plazmine membrane ili se sekretuju iz ćelije. Drugi tip O-glikozilacije je modifikacija: GlcNAc- β -Ser/Thr, i susreće se na velikom broju citosolnih i jedarnih proteina (Moremen i sar., 2012). Ostali tipovi O-glikozilacije su: Xyl- β -Ser (heparin), Fuc- α -Ser/Thr (trombospondin), Man- α -Ser/Thr (α -distroglikan), Gal- β -Hyl (kolagen), Glc- α -Ser (faktori koagulacije) (Moremen i sar., 2012). N- i O-glikozilacija su najčešće modifikacije proteina.



Slika 10. Prikaz N- i O-glikozidne veze koja se stvara pri N- i O- glikozilaciji.

3. C-glikozilacija se odvija vezivanjem ostatka Man za ostatak Trp u ekstracelularnom proteinu. Predložena su dva signala za C-manozilaciju proteina: Trp-X-X-Trp (prvi ili oba Trp se manoziluju) i Trp-Ser/Thr-X-Cys (Spiro, 2002; Moremen i sar., 2012). Man- α -Trp susreće se kod RNaze 2, hijaluronidaze 1, itd. Ovaj tip glikozilacije najverovatnije ima ulogu u kontroli proteinske sekrecije, jer je pokazano da C-manozilacija hijaluronidaze 1 smanjuje njegovu sekreciju i enzimsku aktivnost (Goto i sar., 2014).

4. P-glikozilacija (fosfoglikozilacija) je enzimski katalizovan proces vezivanja saharidne komponente (GlcNAc, Man, Xyl, Fuc) za protein fosfodiesterarskom vezom, npr. GlcNAc- α -1-P-Ser (Spiro, 2002).

5. G-modifikacija (glipijacija) predstavlja vezivanje Man za fosfoetanolamin, koji je vezan za terminalnu -COOH proteina, strukture Pro-C-(O)-EtN-6-P-Man. Glipijacija je široko rasporostranjena kod eukariota (Spiro, 2002).

6. GPI-modifikacija predstavlja vezivanje glikozilfosfatidilinozitola za C-terminus proteina, u formi EtNP-6-Man α 1,2Man α 1,6Man α 1,4GlcNA α 1,6inozitol-fosfolipid. U zavisnosti od vrste i funkcionalnog konteksta postoje varijacije na bočni lanac vezan za glikansko jezgro. Lipidni ostatak neophodan je za ugradnju proteina vezanih za GPI u lipidne raftove - mikrodomene, koji služe za sortiranje brojnih signalnih molekula. Proteini vezani za GPI mogu postojati u različitim formama, u zavisnosti od tkiva u kojem se ekspimiraju (Saha i sar., 2015).

Iako je bilo reči o N-glikozilaciji proteina, ne treba zaboraviti ni ne-enzimsku modifikaciju N-atoma proteina, tj. glikaciju terminalne NH₂ grupe i amino-grupe Lys , kao i azota iz His, redukujućim šećerom. Ova modifikacija se naziva i Maillard-ova

reakcija. U toku starenja, ostaci šećera, koji su se vezali za ekstracelularne proteine se hemijski transformišu u tzv. napredne krajnje proizvode glikacije (engl. *advanced glycation endproducts*, AGEs) što dovodi do gubitka funkcija ovih proteina, njihove agregacije itd. Smatra se da su ove modifikacije odgovorne za neke komplikacije dijabetesa tip 2, ateroskleroze, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Ottum i Mistry, 2015).

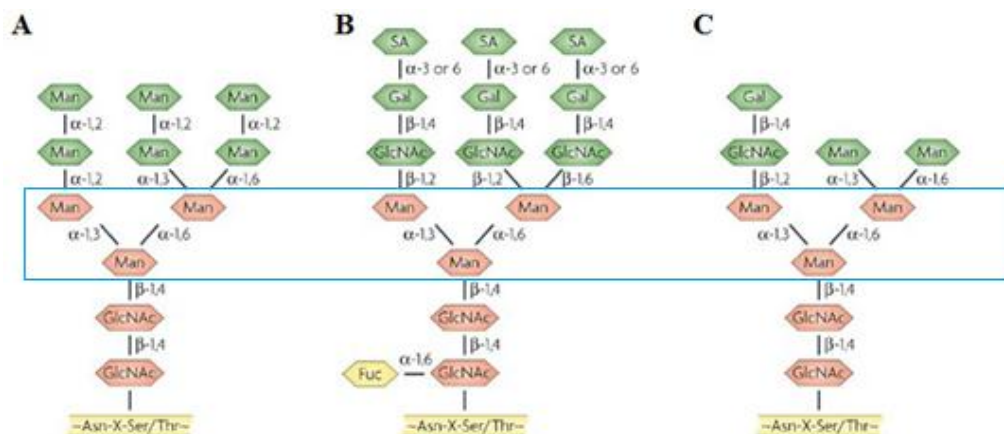
2.3.2. N-glikozilacija

N-glikozilacija proteina je, dakle, značajna post-translaciona modifikacija proteina, koja rezultira u kovalentnom vezivanju jednog oligosaharida za specifične ostatke Asn iz polipeptidnog lanca. Prvo se za protein veže jezgro N-glikana, koje je isto i kod prokariota i kod eukariota, a kod eukariota potom dolazi do dorade strukture N-glikana. Ovo procesovanje se odvija u koracima, kako protein sledi sekretornu putanju, dok se ne sintetiše glikoprotein specifičan za vrstu ili čak za određeni ćelijski tip (Schwarz i Aebi, 2011).

Više hiljada različitih N-glikana može biti vezano za humane proteine (Cummings, 2009). Svaka pojedinačna analiza pruža nam samo ograničen uvid u kompleksnost N-glikoma. Veliki broj glikoproteina poseduje više od jednog mesta za N-glikozilaciju, koja mogu biti zauzeta različitim N-glikanima i najčešće to i jesu. Povrh svega, na jednom istom ostatku Asn u jednom proteinu može se naći više različitih N-glikana, zastupljenih u različitim procentima (Sparrow i sar., 2008). Smatra se da približno 70% od svih Asn-X-Ser/Thr sekvona u membranskim receptorima i transporterima, kad se izlože lumenu ER, biva ko-translaciono modifikovano osnovnim N-glikanom (Apweiler i sar., 1999). Iako je maseni udeo N-glikana u glikoproteinu često relativno mali (5-10%), s obzirom da glikani imaju manju gustinu od proteina, glikan sačinjava značajan deo hidrodinamičke zapremine glikoproteina za koji je vezan. Uprkos različitom poreklu i odvojenim putevima biosinteze glikana i polipeptidnog lanca proteina, kad se jednom spoje u funkcionalni glikoprotein, on se ponaša kao jedinstvena biohemijska vrsta (Lauc i sar., 2010a).

U sastav N-glikana ulaze sledeće monosaharidne jedinice: GlcNAc, Man, Gal, Sia i Fuc. Uobičajeno je da se N-glikani dele na tri tipa, u zavisnosti od njihove

strukture. Na Slici 11 su prikazani tipovi N-glikana: visokomanozni, kompleksni i hibridni.



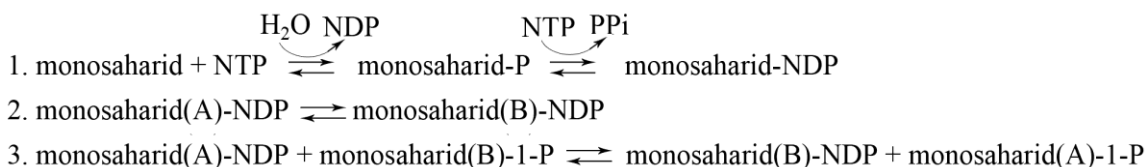
Slika 11. Tipovi N-glikana. A) visokomanozni; B) kompleksni; C) hibridni. Slika je preuzeta iz literature (Balzarini, 2007). Crvenom bojom označena je zajednička glikosekvenca N-glikana (jezgro ili engl. *core*), a plavim okvirom je označeno trimanozno jezgro.

2.3.2.1. Biosinteza N-glikana

N-glikozilacija proteina je ko/post-translaciona modifikacija, koja se odvija unutar ER i Goldžijevog aparata. Finalni proizvod prve faze N-glikozilacije proteina, koja se događa u ER, je protein sa kovalentno vezanim oligomanoznim glikanom: $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ili $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Ovaj proces, koji se naziva i jezgarna N-glikozilacija, odvija se u tri faze: u prvoj fazi se sintetise osnovni N-glikan (engl. *core*) na lipidnom nosaču, polazeći od aktiviranih monosaharida - nukleotidnih davalaca monosaharidnih gradivnih jedinica, serijom reakcija (u citoplazmi) katalizovanih glikozil-transferazama. Ovako nastaje oligosaharid vezan za lipid (engl. *lipid-linked oligosaccharide*, LLO). LLO se potom prenese sa citosolne na luminalnu stranu membrane ER, gde će služiti kao donor glikanskog dela u glikoproteinu. LLO se u ER-u dalje produžava dodatkom još nekoliko monosaharidnih jedinica, i nastaje $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -lipidni nosač. U drugoj fazi, koja se događa u lumenu ER, sintetisani N-glikan se, *en bloc*, prenosi sa lipidnog nosača na protein akceptor, dejstvom enzimskog kompleksa oligosaharil-transferaze (OST). Potom se u trećoj fazi enzimski uklone tri ostatka Glc sa N-glikana

na glikoproteinu, koji zatim produžava ka Goldžijevom aparatu na doradu N-glikana. U tekstu koji sledi biosinteza N-glikana je detaljnije opisana.

Monosaharidi se koriste kao gradivne jedinice za sintezu N-glikana tek nakon aktivacije, u toku koje se kovalentno vezuju za nukleotide: uridin-difosfat (UDP), guanozin-difosfat (GDP) ili citidin-monofosfat (CMP), pri čemu nastaju: UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc i CMP-Sia. Reakcije aktivacije monosaharida katalizuju enzimi kinaze (reakcija 1). Pored toga, jedan aktivirani monosaharid može se prevesti u drugi aktivirani monosaharid (reakcija 2 i 3).



Reakcije aktivacije monosaharida se odvijaju u citoplazmi. Negativna šarža sprečava nukleotidne monosaharide da prostom difuzijom uđu iz citosola u ER i Goldžijev aparat.

Prva faza N-glikozilacije podrazumeva sintezu oligosaharida na lipidnom nosaču - doliholu (Dol) (Slika 12). Dolihol je izoprenoidni alkohol koji se nalazi u membrani. On se prvo fosforiluje do dolihol-fosfata (Dol-P), a fosfo-grupu daje CTP. Sinteza N-glikana počinje na citosolnoj strani membrane ER tako što se GlcNAc prenosi sa UDP-GlcNAc na Dol-P, pri čemu nastaje Dol-P-P-GlcNAc. Ovu reakciju katalizuje GlcNAc-1-fosfotransferaza, enzim iz familije glikozil-transferaza. Potpuna inhibicija N-glikozilacije u ćelijskim kulturama postiže se upravo na ovom nivou, dejstvom antibiotika tunikamicina, koji kao analog UDP-GlcNAc inhibira GlcNAc-1-fosfotransferazu. Enzim je kodiran genom *ALG7*. Isecanje ovog gena je letalno za ćeliju, jer ne bi bila moguća sinteza nijednog N-glikoproteina.

U nastavku, u drugoj reakciji, katalizovanoj enzimom UDP-N-acetilglukozamin-transferazom (enzimski kompleks kodiran genima *ALG13* i *ALG14*), prenosi se ostatak GlcNAc sa UDP-GlcNAc na Dol-P-P-GlcNAc, i nastaje Dol-P-P-GlcNAc₂. Proizvod *ALG13* gena ima katalitički domen, ali nema transmembranski domen, dok *ALG14* protein ima transmembranski domen i služi kao membransko sidro koje regrutuje *ALG13* do citosolne strane ER, gde se odvija reakcija nastajanja Dol-P-P-GlcNAc₂ (Gao i sar., 2005).

strani membrane ER prenosom Glc sa UDP-Glc na Dol-P. Reakcije dodavanja Glc u lumenu ER katalizuju produkti gena *ALG6*, *ALG8* i *ALG10*. U reakciji nastaje $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, koji je prekursor svih N-glikana, čiji je put sinteze konzervisan kod eukariota.

Druga faza N-glikozilacije obuhvata prenos oligosaharida sa lipidnog nosača na polipeptidni lanac proteina u nastajanju - ko-translaciono. Prenos $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sa Dol-P-P na Asn-X-Ser/Thr omogućava enzimski kompleks OST, pri čemu se raskida visokoenergetska GlcNAc-P veza. Dol-P-P se potom defosforiluje do Dol-P, koji se iznova koristi u sintezi N-glikana.

Nakon prenosa $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ na Asn-X-Ser/Thr nascentnog proteina, započinje finalna obrada N-glikana, koja se takođe odvija u ER. Prvo se enzimski uklanjanjaju sva tri ostatka Glc. α -glukozidaza-I katalizuje hidrolizu α 1,2-glikozidne veze, dok α -glukozidaza-II potom uklanja dva unutrašnja ostatka Glc hidrolizom α 1,3-veze. Pre nego što napuste ER mnogi glikoproteini bivaju podvrgnuti i dejstvu α -manozidaze-I, koja sa središnje antene $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Asn-R}$ uklanja terminalni α 1,2-vezani ostatak Man, čime se dobija $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-Asn-R}$. Unutar ER se nalazi i protein sličan α -manozidazi-I, ali bez enzimске aktivnosti. Ovaj protein ima ulogu u prepoznavanju pogrešno uvijenih glikoproteina, koji potom bivaju označeni i degradirani unutar ER. Ovo je deo sistema za kontrolu kvaliteta novosintetisanih glikoproteina (lektini čaperoni).

Većina glikoproteina napušta ER i u Goldžijev aparat odlazi noseći N-glikane koji se sastoje od osam ili devet ostataka Man, u zavisnosti od toga da li su u ER bili podvrgnuti dejstvu α -manozidaze-I. Usled nepotpune obrade unutar ER neki N-glikani u *cis*-Goldžijevom kompleksu (kompartiment koji je blizu ER) zadržavaju jedan ostatak Glc: $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$. Pod dejstvom endoglikozidaze hidrolizuje se veza između dva ostatka Man povezana α 1,2-vezom, pa se iz sekvence N-glikana: $\text{Glc}\alpha$ 1,3 $\text{Man}\alpha$ 1,2 $\text{Man}\alpha$ 1,2 uklanja i terminalna Glc i preposlednja Man. Nastaje $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ izomer, različit od onog koji nastaje u ER pod dejstvom α -manozidaze-I. Uklanjanje ostataka α 1,2-vezane Man (ukupno njih 3) nastavlja se u *cis*-Goldžijevom kompleksu pod dejstvom α 1,2-manozidaze-I, stvara se $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, osnovni intermedijer na putu sinteze hibridnih i kompleksnih N-glikana. N-glikani koji se ne obrade do $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, kao i oni čija je obrada nepotpuna, nikad ne postanu hibridni

niti kompleksni glikani. Neki molekuli $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ izbegnu dalju modifikaciju, ili im se dodaju isključivo ostaci Man, tako da neki od zrelih membranskih ili sekretovanih glikoproteina nose N-glikane tipa $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$, označene kao **oligomanozni N-glikani**.

Biosinteza hibridnih i kompleksnih N-glikana započinje u srednjem Goldžijevom kompleksu dejstvom enzima N-acetilglukozaminil-transferaze-I (GlcNAcT-I ili, češće GnT-I). GlcNAcT-I katalizuje dodatak ostatka GlcNAc na Man (stvara se $\beta 1,2$ -glikozidna veza između GlcNAc i Man), koja je za centralnu Man u $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ vezana $\alpha 1,3$ -vezom. Po završetku ovog koraka, u većini N-glikana terminalne $\alpha 1,3\text{Man}$ i $\alpha 1,6\text{Man}$ bivaju uklonjene sa $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ dejstvom α -manozidaze-II, pri čemu nastaje $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Postoje utvrđena pravila redosleda dejstva glikozil-transferaza u Goldžijevom aparatu, pa tako enzim α -manozidaza-II ne može da deluje na N-glikan koji prethodno nije obrađen dejstvom GnT-I . Nepotpuno delovanje α -manozidaze-II može proizvesti $\text{GlcNAcMan}_4\text{GlcNAc}_2$ hibridne N-glikane. Sintaza paucimanoznih N-glikana (formule $\text{Man}_{3-4}\text{GlcNAc}_2$) odvija se iz $\text{GlcNAcMan}_{3-4}\text{GlcNAc}_2$ sa koga se uklanja periferni GlcNAc ostatak dejstvom heksozaminidaze koja po redosledu nastupa posle α -manozidaze-II. Paucimanozne strukture nađene su prvenstveno kod biljaka i beskičmenjaka, ali i kod ljudi sa nekim oblicima kancera (Balog i sar., 2012).

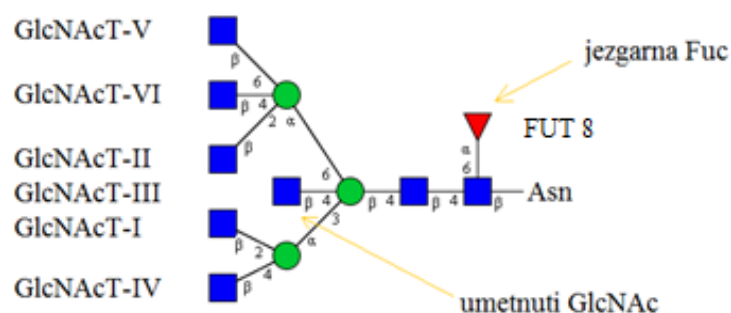
Nakon uklanjanja dva ostatka Man s kraja $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$, glikanu se dejstvom N-acetilglukozaminil-transferaze-II (GnT-II) dodaje drugi ostatak GlcNAc, koji se vezuje za C-2 Man (koja je vezana $\alpha 1,6$ -vezom za Man u jezgru glikana). Dobijeni proizvod ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) je prekursor svih biantenarnih kompleksnih N-glikana. Biantenarni znači da imaju dve antene, tj. grane. **Hibridni N-glikani** stvaraju se ukoliko na $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ nije delovala α -manozidaza-II, pa tako u zrelom glikoproteinu ostaju nemodifikovani periferni ostaci $\alpha 1,3\text{-Man}$ i $\alpha 1,6\text{-Man}$.

Kompleksni N-glikani prisutni u srednjem Goldžijevom aparatu imaju dve grane ili, bolje rečeno, dva ogranka započeta dodatkom dva ostatka $\beta\text{-GlcNAc}$. Dodatna, treća grana može biti započeta na poziciji C-4 Man, koja je vezana $\alpha 1,3$ -vezom za Man u samom jezgru glikana, dodavanjem ostatka $\beta\text{-GlcNAc}$ dejstvom N-acetilglukozaminil-transferaze-IV (GnT-IV). I četvrta grana može biti započeta na poziciji C-6 Man, koja je vezana $\alpha 1,6$ -vezom za Man u samom jezgru glikana,

dodavanjem ostatka β -GlcNAc dejstvom N-acetilglukozaminil-transferaze-V (GnT-V). Enzim GnT-V kodiran je genom *Mgat5*. Ovako započinju sinteze tri- i tetraantenarnih N-glikana (multiantenarni ili razgranati N-glikani). Sazrevanje ovih N-glikana odvijaje se prolaskom glikoproteina kroz *trans*-Goldžijev aparat.

N-acetilglukozaminil-transferaze GnT-IX i GnT-Vb katalizuju iste reakcije kao i GnT-V, to jest dodavanje β -GlcNAc na OH grupu C-6 atoma Man vezane α 1,6-vezom za Man u samom jezgru, ali mogu i da prenesu β -GlcNAc na C-6 Man vezane α 1,3-vezom za Man u jezgru. Grananje na Man vezanoj α 1,6-vezom može biti započeto i na C-4, dodavanjem β -GlcNAc ostatka pod dejstvom GnT-VI. Ostaci Man koji su vezani α 1,3 i α 1,6-vezama za Man u samom jezgru glikana (koja je β 1,4 vezana za unutrašnji ostatak GlcNAc (engl. *innermost*), a ovaj za Asn), predstavljaju trimanozno jezgro (označeno plavim pravougaonikom na Slici 11).

Kompleksni i hibridni N-glikani mogu nositi i **umetni GlcNAc**, koji se delovanjem GnT-III vezuje β 1,4-vezom za centralnu Man u trimanoznom jezgru (prikazano na Slici 13). U *in vitro* uslovima, prisustvo umetnutog GlcNAc inhibira dejstvo α -manozidaze-II i sprečava delovanje enzima GnT-II, GnT-IV i GnT-V. Sa druge strane, bi-, tri- i tetraantenarni kompleksni N-glikani sa umetnutim GlcNAc sintetišu se kada GnT-III deluje posle α -manozidaze-II i započinjanja grananja dejstvom GnT-II, GnT-IV i/ili GnT-V. Na Slici 13 prikazana su mesta dejstva enzima iz familije N-acetilglukozaminil-transferaza (Dennis i sar., 2002).



Slika 13. Šematski prikaz stvaranja razgranatih N-glikana dejstvom glikozil-transferaza (N-acetilglukozaminil-transferaze i α 1,6-fukozil-transferaza).

Dalje sazrevanje N-glikana se odvija u *trans*-Goldžijevom aparatu. U ovom kompartmentu, koji je najdalji od ER, a najbliži plazminoj membrani, može doći do

produžavanja lanca N-glikana, dodavanja ostataka L-Fuc i terminacije lanaca (engl. *capping*):

1. Dodatak α -L-Fuc na C-6 atom unutrašnjeg ostatka GlcNAc, ostatka vezanog za Asn, pri čemu se stvara α 1,6-glikozidna veza. Reakciju katalizuje α 1,6-fukozil-transferaza (FUT8), koja je kodirana genom *FUT8* (Slika 13). Ovaj ostatak Fuc se naziva jezgarna Fuc (engl. *core Fuc*), a sam proces jezgarnom fukozilacijom. Jezgarna fukozilacija je česta modifikacija humanih N-glikana, naročito kod biantenarnih struktura, pa mnogi glikoproteini nose ove ostatke.

2. Produžavanje započetih grana dodavanjem ostataka β -Gal na GlcNAc ostatke vezane za Man u glikoproteinu (engl. *chain elongation*). Ostvarena veza Gal β 1,4GlcNAc je u stvari LacNAc. Enzim iz familije galaktozil-transferaza (GalT) katalizuje ovaj transfer (Ram i Munjal, 1985). Grane se mogu i dalje produžiti dodatkom jednog ili više ponovaka LacNAc (-3Gal β 1,4GlcNAc β 1-)_n, pa se može reći da ovakvi N-glikani nose poli-N-acetilaktosamin (poliLacNAc). Produžavanje lanaca N-glikana poliLacNAc ograničeno je enzimom GnT-V. Kod mutantnih ćelijskih linija kojima je isključen GnT-V, gotovo da nema poliLacNAc na N-glikanima (Dennis i sar., 2002). Ovo bi značilo da samo multiantenarni N-glikani mogu nositi ponovke LacNAc. Druga opcija je da se β -Gal doda na C-3 GlcNAc, pri čemu nastaje Gal β 1,3GlcNAc, označen kao LacNAc tip 1. Kod nekih glikoproteina, umesto Gal, dodaje se β -GalNAc na GlcNAc, pri čemu nastaje GalNAc β 1,4GlcNAc ("LacdiNAc"). Takođe je pokazano da GnT-III suprimira produžavanje lanca N-glikana tako što GnT-IV i GnT-V, koji su potrebni da se N-glikan razgrana do tri- i tetraantenarne strukture, ne mogu delovati na glikane sa umetnutim GlcNAc ostatkom zbog sternih smetnji (Schachter, 1986).

3. Terminacija lanaca N-glikana dodatkom α -Sia, α -L-Fuc, ili sulfata.

Sia ostaci se po pravilu nalaze na neredukujućem kraju lanaca glikana, najčešće vezani α 2,3- ili α 2,6-vezom za pretposlednji ostatak Gal. Sia su nađene i kao linearni homopolimeri α 2,8-vezane Sia, na nekim glikoproteinima (Harduin-Lepers i sar., 2001). Enzimi koji katalizuju dodavanje ostataka Sia spadaju u familiju sijalil-transferaza (SiaT ili ST). Humane ST su funkcionalna familija koja ima najmanje 18 različitih enzima smeštenih u membrani Goldžijevog aparata. Uprkos fundamentalnoj ulozi koju ovi enzimi igraju u sintezi specifičnih sijalinizovanih struktura, malo je informacija o strukturi ovih enzima, mehanizmu njihovog delovanja i mehanizmima regulacije

njihove ekspresije. Geni koji kodiraju ST su različito eksprimirani u različitim tkivima, tipovima ćelija i, čak, u različitim ćelijskim fazama. ST se međusobno razlikuju i po supstratnoj specifičnosti. *In vitro* je pokazano da stvaranje jedne iste glikozidne veze sa Sia može biti katalizovano od strane više od jedne ST (Harduin-Lepers i sar., 2001). Neki članovi familije, čije su cDNK nađene i izolovane iz humane placente, su:

- ST6Gal-I formira strukturu Sia α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -,
- ST3Gal-III formira strukturu Sia α 2,3Gal β 1,3/ β 1,4GlcNAc β -,
- ST3Gal-IV formira strukturu Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -,
- ST8 Sia-II formira strukturu Sia α 2,8Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -.

Fukozilaciju N-glikana katalizuju fukozil-transferaze (Fuc-T ili FUT). Trinaest gena koji kodiraju FUT je identifikovano u humanom genomu. FUT1 i FUT2 su α 1,2-fukozil-transferaze, čijim dejstvom se dodaje ostatak α -L-Fuc na Gal u nizu Gal β 1,3/1,4GlcNAc-R. FUT1 je specifična za dodavanje terminalne Fuc na Gal zauzetu β 1,4 vezom (H antigen krvnih grupa), dok FUT2 dodaje Fuc na Gal u β 1-3 vezi sa GlcNAc. FUT3 je α 3/4-fukozil-transferaza, koja dodaje Fuc na ostatak GlcNAc, koji je vezan za Gal ili β 1,4-vezom (u ovom slučaju Fuc se vezuje α 1,3-vezom) ili β 1,3-vezom (u ovom slučaju Fuc se vezuje α 1,4-vezom), tako da je malo šire specifičnosti. Ne smeta mu ni ako je na terminusu lanca N-glikana već smeštena Sia u α 2,3 položaju ili čak Fuc u α 1,2 položaju. Strukture koje nastaju dejstvom FUT3 su sledeće:

- Gal β 1,4[**Fuca1,3**]GlcNAc β -R,
- Sia α 2,3Gal β 1,4[**Fuca1,3**]GlcNAc β -R,
- Fuca1,2Gal β 1,4[**Fuca1,3**]GlcNAc β -R,
- Gal β 1,3[**Fuca1,4**]GlcNAc β -R,
- Sia α 2,3Gal β 1,3[**Fuca1,4**]GlcNAc β -R,
- Fuca1,2Gal β 1,3[**Fuca1,4**]GlcNAc β -R.

FUT4 je α 3-fukozil-transferaza koja proizvodi Gal β 1,4[**Fuca1,3**]GlcNAc β 1,3Gal β 1-4GlcNAc-R. I FUT5, FUT6, FUT7 i FUT9 su α 3-fukozil-transferaze, gotovo iste specifičnosti. FUT8 je specifična po tome što katalizuje α 1,6-vezivanje Fuc sa GlcNAc ostatkom (koji je vezan za protein) (Becker i Lowe, 2003).

Sazrevanje glikoproteina u *trans*-Goldžijevom kompleksu, dakle dovodi do stvaranja tri(2,2,6)-antenarnih i tetra(2,4,2,6)-antenarnih kompleksnih N-glikana. Na nastale kompleksne N-glikane mogu se dodati raznovrsne oligosaharidne sekvence, na

primer kombinacije LacNAc i poliLacNAc, koje se završavaju ostacima Sia ili Fuc (Dennis i sar., 2002). Svi ovi procesi povećavaju raznovrsnost kompleksnih N-glikana koji se razlikuju u broju grana, sastavu, dužini, terminalnim monosaharidima i jezgarnim modifikacijama (Varki i sar., 2009).

U lumenu ER ćelija sisara, proces uvijanja polipeptida nalazi se pod kontrolom ER, odnosno čaperona, enzima i lektina. Njihova uloga je da naprave razliku između nativnih glikoproteina i glikoproteina koji su pogrešno uvijeni. Nativni glikoproteini se dalje transportuju do njihovih finalnih odredišta, dok se pogrešno uvijeni glikoproteini podvrgavaju procesu retrotranslokacije i degradacije. N-glikani pogrešno uvijenih glikoproteina bivaju odvojeni dejstvom citosolne peptidne N-glikozidaze F (PNGase F). Slobodni N-glikani ostaju u citosolu gde se dalje mogu transportovati do lizozoma radi degradacije (Harada i sar., 2015).

2.3.2.2. Regulacija biosinteze N-glikana

Glikozilacija je veoma važan aspekt ćelijskog života, o čemu govori podatak da čak 2% humanog genoma najverovatnije čine gliko-geni, geni koji kodiraju stotine glikozil-transferaza, glikozidaza, transportera, transkripcionih faktora i drugih proteina. Pojedini autori smatraju da je broj proteina posredno uključenih u glikozilaciju proteina i veći, ako se uzmu u obzir i regulatorni proteini, o kojima se zna veoma malo, i da se radi o bar 5% genoma. Po ovome sudeći, glikozilacija proteina je najkompleksniji biosintetski proces u višećelijskim organizmima (Zoldoš i sar., 2013).

Već je spomenuto da N-glikozilacija proteina (kao i glikozilacija uopšte) nije proces vođen templatom, kao što je to slučaj sa DNK, RNK i proteinima. N-glikozilacija se zasniva na balansu koji se postiže nivoom ekspresije i aktivnosti različitih enzima uključenih u proces (prvenstveno glikozil-transferaza i glikozidaza) i na dostupnosti monosaharidnih gradivnih jedinica, koja zavisi od dostupnosti nutrijenata i nivoa ekspresije enzima koji učestvuju u aktivaciji monosaharida (sintezi GDP-Man ili UDP-GlcNAc), kao i enzima koji su odgovorni za sintezu i interkonverziju monosaharida. Na ovaj način, u odsustvu strogog templata, jako se povećava kompleksnost procesa glikozilacije proteina, a time i molekulska heterogenost samih glikoproteina. Struktura nekog N-glikoproteina biće diktirana mnogobrojnim genima

koji kodiraju strukture svih proteina (ne samo glikozil-transferaza i glikozidaza) koji učestvuju u biosintezi N-glikana na tom proteinu. Genetski polimorfizmi pomenutih gena, zatim regulatorni mehanizmi same genske ekspresije, post-translacione modifikacije proteina produkata gliko-gena, i njihova aktivnost svi skupa određuju finalnu strukturu N-glikana. Dodatni mehanizmi regulacije uključuju i: promenjenu unutarćelijsku lokalizaciju proteina, kompeticiju između glikozil-transferaza za zajedničke donosioce monosaharida itd. (Zoldoš i sar., 2013). Poremećaji u sintezi N-glikana mogu nastati usled grešaka u aktivaciji, prezentaciji i transportu donosilaca monosaharida, usled grešaka na nivou sinteze enzima glikozil-transferaza i glikozidaza, kao i grešaka na nivou proteina koji kontrolišu promet gliko-komponenti unutar ćelije (Varki i sar., 2009).

Jedan primer iz literature slikovito objašnjava kompleksnost regulatornih mehanizama kod (N-)glikozilacije proteina. Recimo da postoji polimorfizam gena koji kodira jednu određenu glikozil-transferazu, što može uzrokovati 10% smanjenje njene aktivnosti, usled smanjenog afiniteta za aktivirani nukleotidni monosaharid. N-glikani koji nastanu će imati nešto niži sadržaj ovog specifičnog monosaharida, i ovo će se odraziti na sastav celog N-glikoma, koji će biti nešto izmenjen. Međutim, pretpostavimo da se kod ove iste osobe javi polimorfizam i drugih gena, koji kodiraju proteine na istoj biosintetičkoj putanji ili transmembranski transporter pomenutog nukleotidnog monosaharida (pa se smanji njegova koncentracija u Goldžijevom aparatu). Tada bi kombinovani efekat smanjene enzimske aktivnosti udružen sa smanjenom koncentracijom supstrata za taj enzim mogao biti upadljiv na nivou N-glikoma. Ili suprotno ovome, ova osoba bi mogla imati polimorfizam na genu koji kodira protonsku pumpu i time promenjen pH unutar Goldžijevog aparata, što bi moglo povećati aktivnost ove specifične glikozil-transferaze (ili smanjiti aktivnost konkurentske glikozil-transferaze) i poništiti efekat polimorfizma s početka priče (Zoldoš i sar., 2013).

O regulaciji procesa N-glikozilacije proteina se jako malo zna. Knežević i saradnici (2009) su uradili prvu veliku studiju varijabilnosti N-glikoma na nivou populacije, tako što su profilisali N-glikane vezane za proteine seruma (a kasnije i samo N-glikane vezane za IgG) u više hiljada uzoraka. Autori su ukazali na svojevrsni paradoks, koji se sastoji u tome da je varijabilnost serumskog N-glikoma na nivou populacije ogromna (Knežević i sar., 2009), a da je pri tome taj isti N-glikom

neverovatno stabilan kod jedne iste osobe u dužem vremenskom periodu (Gornik i sar., 2009). Istraživači iz ove grupe su pokazali i da je zastupljenost nekih N-glikana u serumskom N-glikomu genetski predodređena, a zastupljenost drugih je posledica uticaja faktora životne sredine (Lau i Zoldoš., 2010). Pokazano je i da je profil N-glikoma drugačiji kod dece nego kod odraslih, da serumski glikoproteini dece nose veliki udeo multiantenarnih kompleksnih N-glikana i da se N-glikom značajno menja sa nastupanjem puberteta (Pučić i sar., 2012).

Važan uzrok kompleksnosti i varijabilnosti N-glikoma je interakcija organizma sa okolinom. Biosinteza glikana zahteva mnogo gradivnih jedinica heksozamina, pa njihova dostupnost značajno utiče na strukturu glikana i sastav glikoma (Lau i sar., 2007). Promena pH u Goldžijevom aparatu (Rivinoja i sar., 2009), koncentracija kiseonika (Kunkel i sar., 1998) i drugi spoljašnji faktori takođe utiču na glikozilaciju proteina. Nivo ekspresije enzima na putanji biosinteze glikana i njihova aktivnost, takođe, nije unapred određena, već se menja shodno unutrašnjim i spoljašnjim faktorima (Zoldoš i sar., 2013).

Danas se zna da je epigenom ključni modulator interakcija između gena i okruženja (Jaenisch i Bird, 2003). Faktori spoljašnje sredine ne deluju samo direktno na enzimске procese, već i bivaju zapamćeni u epigenetskom ćelijskom sećanju. Epigenomski program (metilovanje DNK i histonski kod) se ustanovljava u ranim fazama intrauterinog i neonatalnog razvića, i u tom periodu je naročito osetljiv na spoljašnje uticaje: hemijske supstance, ishrana, ponašanje itd. Specifična ishrana (npr. gladovanje ili ishrana bogata folatima), duvanski dim, izlaganje aflatoksinu ili UV zračenju u ranoj fazi života je kritično za uspostavljanje šeme DNK metilacije, što će imati doživotne posledice na osobu. Na ovaj način faktori spoljašnje sredine utiču na biologiju i zdravlje organizma, a da ne menjaju sekvencu DNK (Zoldoš i sar., 2013). Dokazi, koji govore u prilog jakoj povezanosti između epigenetike i N-glikozilacije, se ubrzano prikupljaju, mada uglavnom govore o promenjenoj glikozilaciji proteina u kanceru. Pokazano je da je promena u stepenu metilovanja citozina unutar promotora nekih gliko-gena odgovorna za ekspresiju ugljenohidratnih antigena povezanih sa kancerom pankreasa, debelog creva, dojke (Kawamura i sar., 2008; Ide i sar., 2006, Serpa i sar., 2006). Dokazi koji potvrđuju epigenetsku regulaciju gliko-gena uključuju: *FUT7* kod leukocita (Syrbe i sar., 2004), *FUT4*, GDP-Fuc transporter i *FX* gene

uključene u regulaciju globalne fukozilacije (Moriwaki i sar., 2010) i transkripcioni faktor *HNF1α*, glavni regulator fukozilacije proteina humane plazme (Lauc i sar., 2010b).

Revolucionarno je otkriće da postoje mejotski stabilni epi-aleli, da se prenose na potomstvo, pa čak i na njihovo potomstvo. Transgeneracijsko epigenetsko nasleđe je postalo središte izučavanja epigenetike. Pojedini autori čak spekuliraju da je epigenetska regulacija glikozilacije proteina esencijalni evolutivni mehanizam, koji omogućava brzu adaptaciju kompleksnih organizama na faktore spoljašnje sredine i pomaže im da brže savladaju izazove patogenih mikroorganizama, sa brzom evolucijom (Zoldoš i sar., 2013).

U okviru regulacije N-glikozilacije pokazano je da povećani fluks UDP-GlcNAc unutar ćelije doprinosi porastu sinteze multiantenarnih N-glikana. Takođe je pokazano da receptori koji promovišu rast sadrže veći broj ostataka Asn koji su glikozilovani N-glikanima (od 8 do 16, poput IGFR) od receptora koji su zaduženi za zastoj u rastu (koji sadrže svega nekoliko N-glikana, poput GLUT4). Stoga je predloženo da fluks heksozamina može uticati na prevođenje ćelije iz faze rasta u fazu mirovanja (Lau i sar., 2007).

N-glikozilacija je, dakle, esencijalna za život i njeno kompletno odsustvo je letalno za embrion (Marek i sar., 1999). Mutacije enzima odgovornih za biosintezu jezgra N-glikana su retke, i dovode do ozbiljnih oboljenja. Ova su oboljenja nazvana urođeni defekti glikozilacije (engl. *congenital disorders of glycosylation*, CDG). Sve je veći broj bolesti za koje je poznato da nastaju kao posledica CDG. Njihov broj porastao je u periodu od 2003.-2010. godine sa 12 na 45, a veruje se da će se taj broj u budućnosti uvećavati.

Mutacije u genima uključenim u modifikacije antena N-glikana su uobičajene i uzrok su velikog dela fenotipskih varijacija koje postoje kod ljudi i viših organizama (Lauc i Zoldoš, 2010). Međutim, najveći deo varijabilnosti N-glikana kod čoveka potiče od jednonukleotidnog polimorfizma (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs). On individuuama ne daje vidljivo različit fenotip, ali ako se pojavi u specifičnoj kombinaciji sa drugim SNP kod jedne osobe, može imati značajne fenotipske efekte (Fareed i Afzal, 2013). Neke kombinacije individualnih SNP se mogu čak manifestovati kao specifični gliko-fenotipovi, koji mogu imati evolutivne prednosti ili nedostatke. Utvrđeno je

postojanje nekoliko prepoznatljivih gliko-fenotipova u evropskoj i kineskoj populaciji. Neki od ovih gliko-fenotipova koreliraju sa specifičnim patološkim stanjima, dok drugi nemaju posledica po zdravlje nosilaca (Li i sar., 2012). Skoro su započete GWAS (engl. *genome wide association studies*) studije N-glikoma humane plazme (Lauc i sar., 2010b; Huffman i sar., 2011) od kojih se očekuje da mapiraju regulatornu mrežu N-glikozilacije proteina plazme u skorij budućnosti (Zoldoš i sar., 2013).

2.3.2.3. Uloge N-glikana

Projekat sekvenciranja celokupnog humanog genoma predstavljao je veliko dostignuće nauke, ali su iz njega proizašle i neke neverovatne činjenice. Naime, utvrđeno je da je broj gena kod čoveka samo 5 puta veći od broja gena proste bakterije, kao i da je praktično jednak broju gena miša. Čovek je sigurno više nego 5 puta kompleksniji od bakterije, očigledno da proteini nisu jedini uzrok čovekove kompleksnosti (Gornik i sar., 2012). Ovo je mesto gde biologija i biohemija stupaju na scenu, sa glikozilacijom i ostalim post-translacionim modifikacijama proteina, sa epigenetskim mehanizmima, sa brojnim tipovima nekodirajućih DNK, nasleđivanjem stečenih osobina i drugim brojnim nepoznatim mehanizmima (Gornik i sar., 2012).

Pretpostavka da je funkcija svakog proteina određena njegovom strukturom, koja je definisana redosledom nukleotida u odgovarajućem genu, centralna je dogma biologije koja još uvek važi. U slučaju glikoproteina, to jest glikanske komponente glikoproteina, ova dogma mora da smesti i dodatne nivoe kompleksnosti koji leže između gena i glikana, o čemu je bilo govora u prethodnom odeljku. Većina membranskih proteina i sekretornih proteina je glikozilovana (Apweiler i sar., 1999). Glikan je rezultat osmišljenog i pažljivo regulisanog procesa kojim se proizvode razgranate oligosaharidne strukture na proteinu, koje će značajno uticati na njegovu strukturu i funkciju.

Termin **alternativna glikozilacija** se retko koristi da se opiše post-translaciona modifikacija proteina. Iako je dobro poznato da se na jednom istom ostatku Asn u proteinu može naći više različitih N-glikana, donedavno se smatralo da je to posledica odsustva genetskog templata i nedostatka stroge kontrole biosintetskog puta (Gornik i sar., 2012). Noviji radovi iz glikozilacije proteina ukazuju da ovo nikako nije slučajno.

Naime, sve je veći broj dokaza da glikozilacija igra bitnu ulogu u strukturi i funkciji glikoproteina. U tekstu koji sledi biće opisani pojedinačni primeri glikoproteina kod kojih glikani igraju važnu ulogu u funkciji, u nedostatku opštih zaključaka o biološkoj ulozi/svrsi glikozilacije proteina.

Najbolje proučen glikoprotein je humani IgG. N-glikozilacija IgG je striktno regulisana i vezivanje različitih N-glikana za ovaj protein ima veliki fiziološki značaj. Pokazano je da izlaganje B-limfocita različitim uticajima sredine ili citokinima specifično modifikuje N-glikane na IgG (Wang i sar., 2011). Kao što alternativnom obradom iRNK nastaju proteini sa različitim funkcijama (npr. IR-A i IR-B), tako i alternativnom N-glikozilacijom nastaju različite glikoforme IgG sa različitim efektornim funkcijama (Gornik i sar., 2012). IgG se sastoji od dva teška i dva laka lanca, i na svakom teškom lancu postoji jedan biantenarni N-glikan, kovalentno vezan za visoko konzervisani ostatak Asn297, koji je smešten u Fc regionu molekula. N-glikan u Fc regionu je strateški lociran tako da igra važnu ulogu u vezivanju IgG za Fc receptore, što bitno menja efektorne funkcije IgG (Barb i Prestegard, 2011). U radu Ferrara i sar. (2011) prikazana je direktna interakcija N-glikana sa Fc fragmenta IgG i glikana sa FcγRIII receptora. Fukozilacijom jezgra biantenarnog N-glikana IgG molekula menja se konformacija Fc regiona, što za posledicu ima drastično smanjenje afiniteta IgG za FcγRIIIa receptor (Masuda i sar., 2007). Ova interakcija je jako bitna, jer je FcγRIIIa receptor eksprimiran isključivo na NK ćelijama (engl. *natural killer*) i jer vezivanje IgG za FcγRIIIa pokreće ADCC (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*). Čak 95% od svih IgG molekula nosi fukozilovane N-glikane, što je sigurnosna sklopka koja sprečava pokretanje potencijalno destruktivnog ADCC mehanizma. Mala populacija IgG koja nema ovaj ostatak Fuc ipak je preko 100 puta efikasnija u inicijaciji ADCC (Lauc i sar., 2014). Interesantno je i da drugi glikoproteini humane plazme uglavnom nemaju fukozilovano jezgro (Knežević i sar., 2009). Postoji još jedna važna strukturna promena u N-glikanu IgG. Naime, dodatak α2,6-Sia na krajeve lanca N-glikana praktično izvrće ulogu IgG i pretvara ga iz pro-inflamatornog u anti-inflamatorni molekul (Kaneko i sar., 2006). Nekompletna galaktozilacija IgG može dovesti do aktivacije komplementa posredstvom manozo-vezujućeg proteina i tako postati deo patološkog mehanizma (Rademacher i sar., 1994).

Alternativne glikozilacije drugih proteina i pregled uticaja N-glikozilacije na aktivnost nekih enzima prikazani su u revijalnom radu Skropeta (2009). U radu Dennisa i saradnika opisana je važnost glikozilacije membranskih proteina, jer su upravo ovi proteini sredstvo kojim ćelije komuniciraju sa okruženjem (Dennis i sar., 2009a). Alternativna glikozilacija membranskih proteina je šansa za brzu reakciju ćelije na promenjene uslove okolne sredine, kao i za promene u osobinama same membrane (Dennis i sar., 2009b).

Glikozilacija transportera glukoze (GLUTs) je još jedan primer važne uloge glikozilacije u funkciji proteina. N-glikozilacija GLUT1 doprinosi formiranju strukture kompetentne za visoko afinitetni transport Glc (Bell i sar., 1993). U slučaju GLUT2 N-glikan je neophodan za usidrenje ovog proteina u plazminu membranu, putem njegove interakcije sa površinskim lektinom-galektinom 9 (Ohtsubo i sar., 2005). N-glikani vezani za GLUT4 su takođe neophodni za stabilnost i unutarćelijski transport ovog transportera (Haga i sar., 2011). Rezultati analize N-glikana GLUT1 i GLUT2 zdravih davalaca ukazali su na prisustvo nepotpuno sijalinizovanog tetraantenarnog N-glikana sa umetnutim ostatkom β 1,4-vezanog GlcNAc, koji je nastao dejstvom enzima GnT-IVa (Ohtsubo i sar., 2011). Ekspresija ovog enzima u zdravom pankreasu je velika, što značajno sprečava pojavu dijabetesa kod životinja na ishrani bogatoj lipidima. Pokazano je da su mnogi proteini supstrati ovom enzimu, recimo IGF1R i α podjedinica IR. Izgleda da su GLUT β ćelija pankreasa jedinstveni po tome što su im N-glikani, koje doraduje GnT-IVa, neophodni da bi im se produžio polужivot na površini ćelije (Ohtsubo i sar., 2005). Smanjenje broja GLUT na površini β ćelija pankreasa, usled epigenetskog utišavanja *HNF1 α* i posledičnog smanjenja ekspresije GnT-IVa, se predlaže kao mehanizam odgovoran za pojavu dijabetesa (Ohtsubo i sar., 2011).

Acetilholin-esteraza zadobija potpunu enzimsku aktivnost tek posle N-glikozilacije. Bez N-glikana se ne transportuje do plazmine membrane, što je čest slučaj i sa mnogim membranskim receptorima (Chen i sar., 2011). Alternativna glikozilacija utiče na aktivnost jonskih kanala u srčanim mišićnim ćelijama (Montpetit i sar., 2009). N-glikozilacija modulira funkciju E-kadherina kod kancera, dva N-glikana od tri su vitalna za tumor-supresivnu ulogu E-kadherina u progresiji ćelijskog ciklusa (Zhao i sar., 2008). Sijalinizacija i fukozilacija receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR), iz familije receptora tirozin-kinaza, ometa dimerizaciju receptora, a time i njegovu

aktivaciju (Liu i sar., 2011). N-glikozilacija GABA transportera učestvuje u aktivnosti preuzimanja GABA (Lo i sar., 2010). Glikozilacija humanog horionskog gonadotropina (hCG) na položaju Asn52 je značajna za asocijaciju u heterodimer i za signalnu transdukciju (De Beer i sar., 1996). Kompletna deglikozilacija IR rezultuje u gubitku sposobnosti za vezivanje insulina (Duronio i sar., 1986). Alternativna glikozilacija IR sprečava oligomerizaciju receptora na površini ćelije i ispoljavanje insulin-zavisne tirozin-kinazne aktivnosti (Hwang i sar., 2000). Funkcija integrina u ćelijskoj adheziji može se regulisati promenom N-glikozilacije (Janik i sar., 2010). Modifikacija N-glikana vezanog za receptor za nervni faktor rasta (Trk), koja je rezultat prekomerne ekspresije enzima GnT-III, ima za posledicu smetnje u oligomerizaciji receptora, kao i poremećaje u signalnoj transdukciji kao odgovor na NGF (Ihara i sar., 1997).

Generalno gledano, pravilna N-glikozilacija membranskih proteina igra ključnu ulogu u normalnom funkcionisanju ćelijske membrane (Dennis i sar., 2009b; Lau i sar., 2007). Čak i kad se istovremeno genetski utiša nekoliko glikozil-transferaza, ćelija uspeva da održi zastupljenost terminalnih saharida, što ukazuje na prisustvo unutrašnjeg glikomskog kompenzacionog sistema (Takamatsu i sar., 2010). Razumevanje kompleksnog međuzavisnog odnosa između strukture i funkcije proteina i njihovih glikana zahteva detaljne studije svih pojedinačnih glikoproteina.

2.4. Lektini

Lektini su proteini koji specifično prepoznaju i vezuju ugljene hidrate, pri čemu uglavnom ne ispoljavaju enzimsku aktivnost. Lektini se još nazivaju i aglutinini ili hemaglutinini, zbog svoje sposobnosti da umreže krvne ćelije. Široko su rasprostranjeni u biljnom i životinjskom svetu, gde se mogu naći u solubilnoj formi ili vezani za ćelijsku membranu. O animalnim lektinima se malo zna, njihove funkcije tek ulaze u istraživački fokus. Poznato je više animalnih lektina koji su aktivno uključeni u različite važne ćelijske aktivnosti: lektini koji kontrolišu sintezu i unutarćelijski transport glikoproteina, lektini koji učestvuju u ćelijskoj transdukciji signala, lektini koji učestvuju u urođenom imunom odgovoru itd. (Sharon, 2007). Galektini su animalni lektini koji vezuju laktozu (Gal β 1,4Glc) i LacNAc, ali je njihov afinitet mnogo veći spram multiantenarnih N-glikana sa većim brojem LacNAc ponovaka (poliLacNAc),

nešto slično afinitetu koju ima PHA-L. Razlika je u tome što galektinima ne smeta prisustvo Sia na terminusima N-glikana. Kod čoveka je do sada identifikovano 13 različitih galektina. Galektini su prisutni u različitim tkivima gde obavljaju brojne funkcije. Sekretovani izvan ćelije, galektini mogu formirati specifične rešetkaste strukture sa odgovarajućim glikokonjugatima. Galektini utiču na diferencijaciju ćelija, rast, apoptozu, adheziju, migraciju i invaziju. Tako se mogu naći i kao učesnici brojnih patoloških procesa, poput kancerogeneze (Rabinovich i Toscano, 2009). Pokazano je da su galektin-1, -3 i -13 eksprimirani na proteinskom nivou u normalnoj placenti čoveka (Vićovac i sar., 1998; Than i sar., 2004). Ekspresija galektina-1 u placenti smanjena je kod ranog gubitka trudnoće (Liu i sar., 2006), dok je ekspresija povećana kod trudnoće iskomplikovane preeklampsijom (Jeschke i sar., 2007).

Pokazano je da su neki animalni lektini uključeni u proces karcinogeneze i da doprinose proliferaciji i metastazi tumorskih ćelija (Sharon, 2008). Biljni lektini se često koriste u biohemiji kao analitičko sredstvo za karakterizaciju saharidnih struktura na površini ćelija (lektinska histohemija), kao i za profilisanje glikana vezanih za proteine (lektinska afinitetna hromatografija, lektinski blot, lektinski mikrorej).

2.4.1. Biljni lektini

Specifičnost i selektivnost biljnih lektina spram glikanskih struktura je različita. Dok jedni specifično vezuju monosaharide, drugi više vezuju disaharide, a nije retkost da lektini prepoznaju i čitave oligosaharidne strukture, npr. manozno jezgro N-glikana ili kompleksne N-glikane. Kod lektina je karakteristično da imaju tzv. prošireno vezujuće mesto, sastavljeno od dva ili više spojenih vezujućih mesta za monosaharide, pa u njega mogu da smeste monosaharid, disaharid ili trisaharid, sa ogromnim razlikama u afinitetu (Liener i sar., 1986). Kratak pregled specifičnosti biljnih lektina koji su korišćeni u ovoj tezi dat je u Tabeli 1. Iako se iz Tabele 1 može videti da neki lektini prepoznaju iste monosaharide, to ne znači da će oni vezivati iste glikanske strukture:

- **Lektini koji vezuju GlcNAc:** WGA lektin specifično prepoznaje GlcNAc, ali sa mnogo većim afinitetom vezuje disaharid $\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ (di-N-acetilhiotiobioza), i sa još većim afinitetom trisaharid $\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ (Nagata i Burger, 1974). Druga specifičnost WGA je Sia (Peters i sar., 1979; Monsigny

i sar., 1980). Sukcinilovani WGA (sWGA) ima istu specifičnost i afinitet za vezivanje GlcNAc kao i WGA, samo što ne vezuje Sia (Monsigny i sar., 1980).

- **Lektini koji vezuju Man:** LCA i Con A spadaju u grupu lektina koji vezuju Man/Glc. LCA sa najvećim afinitetom vezuje N-glikan kod koga je u jezgru α 1,6-vezom vezana L-Fuc (Kornfeld i sar., 1981; Tateno i sar., 2009). Ispitivanjem interakcija LCA sa mnogobrojnim sintetskim N-glikanima, kao i N-glikanima oslobođenim sa glikoproteina, ustanovljeno je da LCA sa najvećim afinitetom vezuje agalaktozilovan biantenarni N-glikan sa fukozom u jezgru (Debray i sar., 1981; Tateno i sar., 2009). Afinitet LCA je nešto manji ukoliko biantenarni glikan ima i Gal. Sia na krajevima lanaca mu ne smeta, isti je afinitet za asijalo i sijalo-formu biantenarnog glikana. Prisustvo umetnutog GlcNAc smanjuje afinitet LCA skoro hiljadu puta (Debray i sar., 1981). Do vezivanja glikana za LCA dolazi kada se GlcNAc veže na biantenarnom N-glikanu u položaju koji katalizuje GnT-IV. LCA, dakle, ne vezuje tri- i tetraantenarne N-glikane sa Fuc u jezgru (Tateno i sar., 2009). Izuzetak je triantenarni N-glikan sa Fuc u jezgru, koji ima GlcNAc u položaju koji dodaje GnT-V (Nakagawa i sar., 2008). Con A sa visokim afinitetom vezuje spoljašnja dva ostatka Man u trimanoznom jezgru (dva ostatka vezana α 1,3- i α 1,6 vezom za Man, koja je ostvarila vezu za GlcNAc), ukoliko nema sternih smetnji (Brewer i Bhattacharyya, 1986). Con A sa nešto manjim afinitetom vezuje agalakto biantenarni glikan, bez Fuc u jezgru (Debray i sar., 1981). Afinitet Con A za N-glikan znatno opada ako ovaj ima umetnuti GlcNAc (Brewer i Bhattacharyya, 1986; Naismith i Field, 1996). Con A ne toleriše N-glikane sa više od dve antene (Debray i sar., 1981). GNL lektin vezuje oligomanozne N-glikane, jer u njima prepoznaje Man α 1,3Man. Najveći afinitet GNL pokazuje prema Man α 1,3Man(β 1,4)GlcNAc (Shibuya i sar., 1988).

- **Lektini koji vezuju Gal:** RCA-I i ECL pripadaju porodici lektina koji vezuju Gal. Oni prvenstveno vezuju Gal u disaharidu Gal β 1,4GlcNAc (LacNAc). Iako slične saharidne specifičnosti, RCA-I i ECL imaju i nekih razlika. Tako npr. vezivanje ECL za Gal u nekom glikanu gotovo potpuno izostaje ako posle Gal dolazi terminalni ostatak Sia vezan α 2,3-ili α 2,6-vezama, dok RCA-I toleriše poneki ostatak Sia. Ova dva lektina imaju i različit stepen tolerancije prema GlcNAc umetnutom u glikan. Umetnuti GlcNAc povećava afinitet vezivanja glikana za RCA-I, a smanjuje za ECL (Itakura i sar., 2007). PHA lektini prepoznaju kompleksne N-glikanske strukture, sa veoma

različitom specifičnošću. Naime, PHA-E prepoznaje i vezuje terminalne ostatke Gal iz asijalo biantenarnih N-glikana koji imaju umetnuti GlcNAc, zbog čega se PHA-E često koristi za detekciju ovih N-glikana. PHA-L vezuje terminalne ostatke Gal iz tri- i tetranatenarnih N-glikana, koji ne smeju imati umetnuti GlcNAc. Prisustvo jezgarne Fuc ne utiče na vezivanje za ova dva PHA lektina (Cummings i Kornfeld, 1982), dok prisustvo Sia vezane za Gal može ometati vezivanje (Green i Baenziger, 1987).

- **Lektini koji vezuju Fuc:** U ovom radu su korišćena i dva lektina koja vezuju Fuc, UEA-I i AAL. UEA-I ima afinitet za vezivanje Fuc u terminalnom disaharidu, Fuc α 1,2Gal (Debray i sar., 1981; Baldus i sar., 1996). U poređenju sa drugim lektinima koji vezuju Fuc, AAL ima širok opseg afiniteta. Nasuprot UEA-I i AAA (*Anguilla anguilla agglutinin*), koji imaju visok afinitet ka Fuc α 1,2Gal terminalnim disaharidima, AAL podjednako dobro vezuje oligosaharide ili glikokonjugate koji nose Fuc vezanu α 1,3, α 1,4 i α 1,6 vezama. NMR studija visoke rezolucije slobodnog i Fuc α 1,6GlcNAc-O-Me vezanog za AAL pokazala je da je samo ostatak Fuc vezan za AAL protein, dok GlcNAc slobodno rotira u rastvoru (Wimmerova i sar., 2003).

- **Lektini koji vezuju Sia:** SNA je specifičan za ostatke Sia u sledećim sekvencama: Sia α 2,6Gal ili Sia α 2,6GalNAc (koja se sreće u O-glikanima). SNA vezuje i Sia α 2,3Gal, ali veoma slabo, te se može reći da ovaj lektin ima izrazit afinitet ka α 2,6-vezanoj terminalnoj Sia (Shibuya i sar., 1987). MAL-II je specifičan za Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc (Geisler i Jarvis, 2011).

Tabela 1. Biljni lektini i njihova specifičnost.

Naziv lektina	Skraćenica	Specifičnost	Referenca
lektin pšenične klice	WGA	GlcNAc, Sia	Nagata i Burger, 1974
sukcinilovani lektin pšenične klice	sWGA	GlcNAc	Ganguly i Fossett, 1984
lektin ricinusa - tip I	RCA-I	Gal β 1,4GlcNAc	Itakura i sar., 2007
lektin kore zove	SNA	Sia α 2,6Gal/GalNAc	Shibuya i sar., 1987
lektin koralnog drveta	ECL	Gal β 1,4GlcNAc	Wu i sar., 2007
lektin vresa - tip I	UEA-I	Fuc α 1,2Gal β 1,4GlcNAc	Loris i sar., 1998
lektin sočiva	LCA	agalakto biantenarni glikani sa Man α 1,6(Man α 1,3)Man β 1,4GlcNAc β 1(Fuc α 1,6)Asn	Kornfeld i sar., 1981
lektin tropskog pasulja	Con A	oligomanozni i biantenarni glikani sa Man α 1,6(Man α 1,3)Man	Brewer i Bhattacharyya, 1986
lektin pasulja - eritroaglutinin	PHA-E	asijalo galakto biantenarni glikani sa GlcNAc β 1,4Man β 1,4GlcNAc	Cummings i Kornfeld, 1982
lektin pasulja - leukoaglutinin	PHA-L	asijalo galakto tri-/tetraantenarni glikani	Cummings i Kornfeld, 1982
lektin amurske makije - tip II	MAL-II	Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc	Geisler i Jarvis, 2011
lektin narandžaste ljuspaste gljive	AAL	Fuc α 1,6GlcNAc; Fuc α 1,3(Gal β 1,4)GlcNAc; Fuc α 1,4(Gal β 1,3)GlcNAc	Wimmerova i sar., 2003
lektin visibabe	GNL	oligomanozni glikani sa Man α 1,3Man	Shibuya i sar., 1988

3. Materijal i metode

3.1. Hemikalije

Natrijum-dihidrogenfosfat monohidrat; dinatrijum-hidrogenfosfat dihidrat; saharoza; glacijalna sirćetna kiselina (HAc); Coomassie brilliant blue R-250, CBB; ultra-čista voda miliQ; mangan-hlorid; D-manoza, Man; D-laktoza monohidrat, Lac; Tween 20; polietilen-glikol, PEG; mikrofilteri sa porama od 10 kDa (Merck KGaA, Darmštat, Nemačka); β -merkaptetanol; deterdžent NP 40 (BDH-Merck Laboratory Supplies, Pul, Velika Britanija); koktel inhibitora proteaza; 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonska kiselina, HEPES; Triton X-100; natrijumdodecil-sulfat, SDS; bromfenolplavo; akrilamid; N,N-metilen-bisakrilamid; amonijum-persulfat, APS; N, N, N', N'-tetrametilendiamin, TEMED; standardi za elektroforezu - colorburst; nitrocelulozna membrana sa porama veličine 0,45 μm - Whatman Protran; boja Ponceau S; goveđi serumski albumin, BSA; fuksin; aktivni ugalj; natrijum-perjodat; amonijum-acetat; amonijum-hidrogenkarbonat; natrijum-acetat; limunska kiselina; dimetilsulfoksid, DMSO; hloramin T; plavi dekstran 2000; mertiolat; natrijum-metabisulfit; N-acetilglukozamin, GlcNAc; fukoza, Fuc; fetuin; asijalofetuin; ovalbumin; celulozna membrana, crevo za dijalizu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka); goveđi imunoglobulin G, IgG (INEP, Zemun, Srbija); natrijum-hlorid; kalcijum-hlorid; magnezijum-hlorid; hlorovodonična kiselina; glicerol (Zorka Pharma, Šabac, Srbija); glicin (VWR Prolabo BDH chemicals, Leven, Belgija); metanol (Centrohem, Stara Pazova, Srbija); natrijum azid (Fisher Scientific, Lafboro, Velika Britanija); tris(hidroksimetil)-aminometan (ICN Biomedicals, Costa Mesa, Kalifornija, SAD); kalijum-metabisulfit; natrijum-cijanoborohidrid (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD); 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina, APTS (Molecular Probes, Judžin, Kalifornija, SAD); obrano mleko u prahu (Marvel, Dablin, Irska); rekombinantni humani insulin (Novo, Kopenhagen, Danska); rekombinantni humani faktor rasta sličan insulinu tipa I bez aminokiselina 1-3, des(1-3)IGF-I; rekombinantni humani faktor rasta sličan insulinu tipa II, IGF-II (GroPep, Adelaide, Australija); natrijum-jodid (izotop ^{125}I) (Isotope, Budimpešta, Mađarska); smola Sefadeks G-50 (GE Healthcare, Upsala, Švedska); tečni azot (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija); bicinhoninska kiselina - komplet za određivanje koncentracije proteina, BCA komplet (Abcam, Kembridž, Velika Britanija); reagens za hemiluminiscenciju, ECL Pierce

(Thermo Fisher Scientific, Rokford, Illinois, SAD); rendgenski filmovi MXB 100 NIF 13 x 18; razvijatelj; fiksir; kasete za razvijanje filmova (Kodak, Ročester, Njujork, SAD), avidin D obeležen peroksidazom, HRP-avidin D (Vector Laboratories, Burlingem, Kalifornija, SAD).

3.2. Lektini

Biotinilovani lektini: SNA, LCA, PHA-E, PHA-L, MAL-II (Vector Laboratories, Burlingem, Kalifornija, SAD).

Lektini kovalentno vezani za agarozu: AAL, GNL, RCA-I, PHA-E, PHA-L, SNA, LCA, ECL, UEA-I, WGA, sWGA (Vector Laboratories, Burlingem, Kalifornija, SAD), MAL-II (EY Laboratories, San Mateo, Kalifornija, SAD), Con A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka). Specifičnost lektina pregledno je data u Tabeli 1 (Odeljak 2.4.1.).

3.3. Antitela i enzimi

Monoklonsko mišje antitelo spram humanog IR; monoklonsko mišje antitelo spram goveđeg IGF2R (Calbiochem, Merck KGaA, Darmštadt, Nemačka); monoklonsko mišje antitelo spram humanog IR (GroPep Limited, Adelaide, Australija); poliklonsko zečije antitelo spram humanog IGF1R (Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD); monoklonsko mišje antitelo spram humanog IGF1R; HRP-obeležena sekundarna ovčija antitela spram mišjih antitela (BioSource International, Kamarilo, Kalifornija, SAD); HRP-obeležena sekundarna magareća antitela spram zečijih antitela (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rokford, Illinois, SAD); peptidna N-glikozidaza F, PNGaza F (New England Biolabs, Ipsvič, Masačusets, SAD); sijalidaza iz *Arthrobacter ureafaciens* (Roche, Indijapolis, Indijana, SAD); ribonukleaza B iz goveđeg pankreasa, RNaza B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka); α -L-fukozidaza iz goveđeg bubrega (Prozyme, San Leandro, Kalifornija, SAD).

3.4. Aparati i prateće komponente

Blender Moulinex D56 (SEB, Lion, Francuska); homogenizer Ultra-Turrax (Janke & Kunkel KG, Štaufen, Nemačka); homogenizer TRI-R (TRI-R Instruments, Njujork, Njujork, SAD); centrifuga Eppendorf 5804R; centrifuga minispin plus; centrifuga za ploču sa 96 mesta, Eppendorf 5810 (Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka); centrifuga Heraeus Cryofuge 5000S; ultracentrifuga Sorvall WX80; rotor za ultracentrifugu tip T 1250; reakciona ploča MicroAmp Optical sa 96 mesta; folija za ploču od 96 mesta, Easy Peel Heat Sealing Foil; mašina za foliju za ploču sa 96 mesta; inkubator Heraeus sa termostatom na 60 °C (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD); ultracentrifuga Optima L-90K; rotor za ultracentrifugu tip Ti 50.2 (Beckman Coulter, Breja, Kalifornija, SAD); analitička vaga Tehnica 200A (Tehnica, Železniki, Slovenija); inkubator sa termostatom na 37 °C (Sutjeska, Beograd, Srbija); spektrofotometar Wallac 1420 Multilabel Counter Victor 3V (PerkinElmer, Voltam, Masačusets, SAD); termošejker TS-100C (Biosan, Riga, Letonija); kombinovani pH-konduktometar Inolab pH-cond 720 (WTW, Vajlhajm, Nemačka); tehnička vaga MK-200B (CHYO, Kjoto, Japan); magnetna mešalica (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italija); mini Protean tetracell jedinica za elektroforezu i elektrotransfer (Biorad, Pariz, Francuska); Vorteks (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italija); mini mućkalica, kinetor (LKB Vertriebes GmbH, Beč, Austrija); frakcioni kolektor (Pharmacia-LKB, Upsala, Švedska); ploča za PCR sa 96 mesta (Thermo-Fast 96, *non-skirted*, Abgene, Epsom, Velika Britanija); silikonska guma za reakcionu ploču, Septa Mat (E&K Scientific Products, Santa Klara, Kalifornija, SAD); Vorteks za ploču od 96 mesta (Heidolph Titramax 100, Švabah, Nemačka); 96-PCR termoblok (Biorad, Pariz, Francuska); DNK sekvenator ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD); frakcioni kolektor 2112 Redirac (LKB-Produkter AB, Broma, Švedska); gama brojač Wallac 1470 Wizard (PerkinElmer Life Sciences, Turku, Finska); mikrotitar ploče sa 96 mesta; polistirenske epruvete (Spektar, Čačak, Srbija); liofilizator Hetosicc CD18-3 (Heto, Birkerod, Danska).

3.5. Uzorci

Početni tkivni materijal (placente) sakupile su kolege iz Instituta za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije i Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front“ Beograd. Placente (ukupno 210) su sakupljane na osnovu nekoliko parametara: gestacijske starosti, starosti trudnica i patologije trudnoće.

Od sakupljenih placenti, 160 su bile placente prvog trimestra, koje su dobijene posle željenog prekida normalne trudnoće. Imajući u vidu malu količinu placentnog tkiva prvog trimestra, napravljeno je četrnaest zbirnih uzoraka. Sedam zbirnih uzoraka je dobijeno spajanjem placenti žena starosti 17-30 godina (**PPTm**; prosečna starost 25 godina; n=80). Preostalih sedam zbirnih uzoraka je dobijeno spajanjem tkiva placenti žena starosti 30-45 godina (**PPTs**; prosečna starost 36 godina; n=80).

Od sakupljenih placenti trećeg trimestra, 30 placenti je dobijeno od zdravih žena koje su imale normalnu trudnoću i čije su bebe imale normalnu težinu po rođenju. Težina beba kretala se od 2800-4000 g (prosečna težina iznosila je 3300 g). Žene u ovoj grupi su bile podeljene na osnovu starosti na mlađu grupu (**PTTm**, starost 22-30 godina; prosečna starost 27 godina; n=15), i stariju grupu (**PTTs**, starost 35-47 godina; prosečna starost 40 godina; n=15).

Od sakupljenih placenti trećeg trimestra, 6 placenti je bilo poreklom od žena kojima je dijagnostifikovan *diabetes mellitus* tip 1 (DMT1). Žene u ovoj grupi su bile starosti 27-40 godina (prosečna starost 32 godine), i sve su porođene između 34. i 38. nedelje trudnoće. U nekim slučajevima došlo je do smrti fetusa *in utero*, pojave anti-fosfolipidnih antitela, nefropatije, retinopatije (R kategorija DMT1), dok su neke žene imale lakši oblik DMT1, bez vaskularnih i renalnih oštećenja. Sve žene su bile višegodišnji dijabetičari, i na adekvatnoj terapiji, a jedna žena je imala ugrađenu insulinsku pumpu, dok je druga odlučila da prestane sa terapijom u trećem mesecu trudnoće.

Od sakupljenih placenti trećeg trimestra, 14 placenti je dobijeno od žena kojima je dijagnostifikovana preeklampsija sa zastojem rasta fetusa *in utero*. Žene u ovoj grupi bile su starosti 26-46 godina (prosečna starost 33 godine). Sve žene su bile između 32. i 35. nedelje trudnoće, sa prosečnom gestacijskom starošću od 32,6 nedelja. Težina novorođenčadi kretala se između 880 g i 2050 g (prosečna težina 1434 g). Dijagnoza

kod žena ove grupe postavljena je pre 34. nedelje trudnoće. Sve žene su imale krvni pritisak veći od 160 sa 110 mmHg i proteinuriju, zbog čega im je postavljena dijagnoza ranog oblika teške preeklampsije (Bolte i sar., 2001). U dva slučaja primećen je i „HELLP“ sindrom.

Sve placente su odmah po dopremanju u laboratoriju dobro isprane pod mlazom hladne česmenske vode, a potom u ledeno hladnom PBS puferu (50 mM fosfatni pufer, 150 mM NaCl, 0,1% NaN₃ (*m/v*), pH 7,5). Pupčana vrpca, amnion, vezivno tkivo, kao i veći krvni sudovi su odstranjeni makazama. Preostalo placentno tkivo je iseckano, a komadići stavljeni u svež PBS, da bi se dodatno isprali ostaci krvi. Komadići tkiva su ocedeni laganim pritiskanjem tkivne mase i uprosečen uzorak je spakovan u plastične kivete, koje su naglo zamrznute potapanjem u sud sa tečnim azotom. Tako spakovani uzorci čuvani su na -80 °C.

3.6. Izolovanje plazminih membrana i membranskih proteina iz placentnog tkiva

Membranski proteini humane placente izolovani su metodom diferencijalnog centrifugovanja (Masnikosa i sar., 2006). Tkivo placente je delimično otopljeno kratkotrajnim potapanjem kiveta u mlakoj vodi, nakon čega je preneto u staklenu čašu. Tkivo je isečeno makazama na manje komade, pa je dodat ledeno hladan rastvor za homogenizaciju (0,25 M saharoza) u količini koja je 4-5 puta veća od količine tkiva. Da bi se sprečila degradacija proteina smeši je dodat koktel inhibitora proteaza u količini od 200 µl na 100 g tkiva. Prilikom obrade terminskih placenti, tkivna smeša je prvo homogenizovana u Moulinex blenderu u trajanju od 10 s, nakon čega je prenetu u čašu. Zbirni uzorci placenti prvog trimestra homogenizovani su u Ultra-Turrax homogenizeru, u trajanju od po 60 s, jer je količina tkiva bila izuzetno mala. Dalja obrada homogenata bila je ista, nezavisno od toga da li je placentno tkivo bilo poreklom iz prvog ili trećeg trimestra trudnoće. Fina homogenizacija izvedena je na TRI-R homogenizeru sa teflonskim klipom u staklenoj kiveti, u trajanju od po 10 s. Tkivni homogenat potom je centrifugovan na 600 x g, u toku 20 minuta na 10 °C, u centrifugi Cryofuge (za placente trećeg trimestra), odnosno u centrifugi Eppendorf 5804R (za placente prvog trimestra). Dobijeni talog sa ostacima nehomogenizovanog tkiva je odbačen, a supernatant je dalje

centrifugovan na 42 000 obrtaja u minuti (oko 200 000 x g) u trajanju od 70 minuta, na 10 °C u ultracentrifugi Beckman Coulter, u rotoru tipa Ti 50.2. Dobijeni supernatant, koji predstavlja citosol, je odvojen i zamrznut na -80 °C. Talog ćelijskih membrana je ispran hladnim HBS puferom (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1% NaN₃ (m/v), pH 7,5) u koji je dodato 25 µl koktela inhibitora proteaza. Ispiranje membrana je urađeno njihovom ponovnom homogenizacijom pomoću TRI-R homogenizera, uz dodavanje veće zapremine HBS pufera. Tako dobijena suspenzija membrana u HBS puferu je centrifugovana na 42 000 obrtaja u minuti u trajanju od 40 minuta, na 10 °C u Beckman Coulter ultracentrifugi. Dobijeni supernatant iznad ispranih membrana je odbačen, a talog suspendovan u hladnom HBS puferu uz dodatak 25 µl koktela inhibitora proteaza, na TRI-R homogenizeru. Potom je usledila solubilizacija membranskih proteina nejonskim deterdžentom Tritonom X-100, čija je finalna koncentracija u smeši bila 1%. Solubilizacija je trajala 1 h na magnetnoj mešalici. Potom je suspenzija membrana centrifugovana na 42 000 obrtaja u minuti u trajanju od 90 minuta, na 10 °C u Beckman Coulter ultracentrifugi. Suspenzije membrana placenti prvog trimestra su, zbog male zapremine, u ovom poslednjem koraku centrifugovane na 42 000 obrtaja u minuti (oko 200 000 x g) u trajanju od 90 minuta, na 10 °C u ultracentrifugi Sorvall WX80, opremljenoj rotorom tipa T 1250. Po završetku poslednjeg ultracentrifugovanja, u oba slučaja, talog u kom se nalaze nesolubilni delovi membrane je odbačen. Supernatant u kome se nalaze solubilizovani membranski proteini (solubilizat) je odvojen i razliven u alikvote od po 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml i 3 ml. Alikvoti su odmah smešteni u zamrzivač na -80 °C, gde su čuvani do upotrebe. Ceo postupak izolovanja membranskih proteina izveden je na temperaturi od 8 ± 2 °C. Koncentracija proteina u uzorcima solubilizata određena je pomoću BCA kompleta po uputstvu proizvođača. Apsorbanca je merena na spektrofotometru Wallac 1420. Prinos izolovanih membranskih proteina kretao se od 0,6 do 6,5 mg po mililitru solubilizata. Solubilizati korišćeni za DSA-FACE (engl. *DNA-sequencer adapted fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*) analizu (Odeljak 3.15.) su liofilizovani radi lakšeg transporta.

3.7. Obeležavanje liganada izotopom ^{125}I

Rekombinantni humani peptidi: insulin, des(1-3)IGF-I (u daljem tekstu samo desIGF-I) i IGF-II su obeleženi radioaktivnim izotopom ^{125}I , metodom sa hloraminom T, do specifične aktivnosti od oko 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Insulin je obeležen po metodi preuzetoj iz literature (Nikolić i sar., 1989), dok su druga dva liganda obeležena po uputstvu proizvođača - procedura za jodovanje IGF molekula, No 3001; GroPep, Adelaide, Australija. Obeleženi ligandi (^{125}I -ligandi) izdvojeni su gel filtracijom na koloni Sefadeksa G-50, a kao eluent je korišćen fosfatni pufer (50 mM fosfatni pufer, 150 mM NaCl, 0,25% BSA (*m/v*), pH 7,4). Sakupljene su vršne frakcije, koje su potom spojene u pul, koji je zatim delimično razblažen u istom ovom puferu.

Na ovaj način su dobijeni koncentrovani rastvori ^{125}I -insulina, ^{125}I -desIGF-I i ^{125}I -IGF-II, koji su u daljim eksperimentima korišćeni za obeležavanje odgovarajućih IR i IGFR iz placentnih solubilizata. Obeležavanje receptora je izvedeno jednostavnim mešanjem i inkubiranjem solubilizata sa koncentrovanim rastvorima ^{125}I -liganada u toku 24 h na 4 °C. Zapremine koncentrovanih rastvora ^{125}I -liganada, koji su inkubirani sa solubilizatima su varirale u zavisnosti od koncentracije membranskih proteina u solubilizatima i koncentracije ^{125}I -liganada u rastvoru, pa i od tipa eksperimenta. Tako je za lektinsku afinitetnu hromatografiju koncentrat ^{125}I -liganda razblaživan do zapremina u kojima je radioaktivnost bila 30 000 cpm, 300 000 cpm ili 500 000 cpm, što je, opet, bilo uslovljeno zapreminom lektin-agaroznog gela u koloni i tipom eksperimenta. Za testove vezivanja u epruveti korišćena su razblaženja koncentrata ^{125}I -liganda od 100 000 cpm/0,1 ml. Rastvori ^{125}I -liganada (radioligandi) su korišćeni tri sedmice od obeležavanja, sa izuzetkom ^{125}I -IGF-II, koji je korišćen u roku od dve sedmice.

3.8. Testovi vezivanja insulina za IR u epruveti

Za praćenje vezivanja ^{125}I -insulina za IR iz solubilizata korišćen je jednostavan test vezivanja u epruveti (Masnikosa i sar., 2008). U polistirenske epruvete redom je pipetirano po 0,1 ml: HBS pufer, rastvor BSA (6% BSA u 50 mM fosfatnom puferu (*m/v*)), uzorak eluata sa lektinske kolone i razblaženi rastvor ^{125}I -insulina

(radioaktivnosti od 100 000 cpm). Sadržaj epruveta je dobro izmešan na Vorteks mešalici i ostavljen da se inkubira 24 h na 4 °C. Po završetku inkubacije u smešu je dodato 0,1 ml rastvora goveđeg IgG (koncentracije 3 mg/ml u 50 mM HBS), smeša je izmešana na Vorteksu, a potom je dodat i 1,5 ml ledeno hladnog rastvora PEG (20% (m/v) u 50 mM fosfatnom puferu, 150 mM NaCl, pH 7,5). Posle stajanja od 20 minuta u frižideru, iz inkubacione smeše su istaloženi kompleksi ^{125}I -insulin-IR centrifugovanjem na 3000 x g, u trajanju od 45 minuta na 12 °C. Supernatant je odstranjen usisavanjem na vakuumu, a radioaktivnost taloga je merena na gama brojaču. Jednostavni test vezivanja u epruveti sa ^{125}I -insulinom odrađen je na frakcijama dobijenim lektinskom afinitetnom hromatografijom (Odeljak 3.9.). U testovima je procenjeno i nespecifično vezivanje ^{125}I -insulina. U tim slučajevima su sve komponente reakcione smeše bile iste kao i u uzorcima, samo što su uzorci bili zamenjeni odgovarajućim puferom za eluciju.

3.9. Lektinska afinitetna hromatografija

Lektinska afinitetna hromatografija (LAH) solubilizata placenti izvedena je na tri različita načina, u zavisnosti od namene: i) uz prethodnu inkubaciju solubilizata sa ^{125}I -ligandom, na kolonama napunjenim sa 2 ml lektin-agaroze; ii) uz prethodnu inkubaciju solubilizata sa ^{125}I -insulinom na mini kolonama napunjenim sa 0,2 ml lektin-agaroze; iii) bez prethodne inkubacije solubilizata sa ^{125}I -ligandom, na kolonama napunjenim sa 2 ml lektin-agaroze.

U prvoj eksperimentalnoj postavci LAH, uzorci su bili pojedinačni solubilizati placenti prvog i trećeg trimestra (u zapremini koja je uvek sadržavala 0,5 mg membranskih proteina), koji su pre nanošenja na kolone bili inkubirani sa 300 000 cpm ^{125}I -liganda, dok su kolone bile napunjene sa 2 ml lektin-agaroznih gelova. Krajnja zapremina inkubacione smeše solubilizata i rastvora ^{125}I -liganda podešavana je na 1 ml pomoću odgovarajućeg pufera iz Tabele 2, a inkubacija je trajala 24 h na 6 ± 2 °C, ukoliko nije drugačije naglašeno. Nakon isteka inkubacionog perioda, smeša je recirkulisana kroz lektin-agarozni gel (napakovan u kolonu) u toku 1 h na sobnoj temperaturi. Kolone sa gelom su potom ispirane rastvorima za ispiranje (Tabela 2), dok očitana radioaktivnost eluiranih frakcija nije pala ispod 500 cpm, posle čega su eluirane odgovarajućim rastvorima za eluciju (Tabela 2). Frakcije zapremine 1 ml su sakupljane

u epruvete i radioaktivnost je merena na gama brojaču. Eksperimentom je bilo obuhvaćeno šest različitih lektina, kovalentno vezanih za agarozne gelove: AAL, LCA, PHA-L, Con A, GNL i SNA.

Tabela 2. Lektini, puferi i rastvori za ispiranje i eluciju upotrebljavani pri LAH.

Poreklo	Lektin	Pufer za ispiranje	Rastvor za eluciju
pšenične klice	WGA	HBS _a *	0,5 M GlcNAc, pH 3,0
pšenične klice	sWGA	HBS _a	0,5 M GlcNAc, pH 3,0
ricinus	RCA-I	HBS _a	0,2 M Lac, pH 3,0
kora zove	SNA	HBS _b	0,5 M Lac, pH 3,0
seme koralnog drveta	ECL	HBS _b	0,2 M Lac, pH 3,0
vres	UEA-I	HBS _b	0,1 M Fuc, pH 3,0
sočivo	LCA	HBS _c	0,1 M Man
tropski pasulj	Con A	HBS _d	AcBS pH 5,0
pasulj	PHA-E	HBS _e	0,1 M HAc, pH 3,0
pasulj	PHA-L	HBS _c	0,1 M HAc, pH 3,0
amurska makija	MAL-II	PBS _a	0,1 M Gly, pH 3,5
narandžasta ljuspasta gljiva	AAL	HBS _a	0,1 M Fuc u HBS _a
visibaba	GNL	HBS _c	0,5 M Man, pH 4,0

*HBS_a: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,08% NaN₃ (*m/v*), 0,1% Triton X-100 (*v/v*); HBS_b: HBS_a, 0,1 mM Ca²⁺; HBS_c: HBS_a, 0,1 mM Ca²⁺, 0,1 mM Mn²⁺; HBS_d: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,08% NaN₃ (*m/v*), 1 mM Ca²⁺, 1 mM Mg²⁺, 1 mM Mn²⁺, 0,1% Triton X-100 (*v/v*); HBS_e: HBS_c, pH 8,0; PBS_a: 10 mM fosfatni pufer, 150 mM NaCl, pH 7,2-7,4, 0,08% NaN₃ (*m/v*), 0,1% Triton X-100 (*v/v*); AcBS: 50 mM natrijum-acetat, 1 M NaCl, pH 5,0, 0,08% NaN₃ (*m/v*), 0,1% Triton X-100 (*v/v*).

U eksperimentalnoj postavci u kojoj su uzorci bili solubilizati dobijeni iz placenti žena kojima je dijagnostifikovan dijabetes ili preeklampsija, u 24-satnu pre-inkubaciju je ulazilo 1 mg membranskih proteina solubilizata i 500 000 cpm ¹²⁵I-liganda. Eksperimentom je bilo obuhvaćeno jedanaest lektina vezanih za agarozu (2 ml

gela u koloni): WGA, sWGA, RCA-I, SNA, ECL, UEA-I, LCA, Con A, PHA-E, PHA-L i MAL-II.

U trećoj eksperimentalnoj postavci LAH, testirana je mogućnost rada sa 10 puta manjom zapreminom lektin-agaroznog gela u koloni (0,2 ml gela u tzv. mini kolonama) i 10 puta manjom količinom membranskih proteina iz solubilizata (0,05 mg), inkubiranom sa 10 puta manjom koncentracijom 125 I-insulina (30 000 cpm). Na mini kolonama su hromatografisani solubilizati izolovani iz placenti žena sa preeklampsijom, paralelno sa serijom kontrolnih uzoraka (solubilizati iz placenti zdravih žena). Pri tome su korišćeni sledeći lektini, imobilizovani na agaroznom gelu: AAL, GNL, LCA, PHA-E, PHA-L, Con A i SNA.

LAH je korišćena i u eksperimentima koji su bili dizajnirani tako da se pojedinačne receptorske glikoforme (iz uzoraka solubilizata) prvo vežu za imobilizovane lektine na koloni, potom eluiraju pomoću rastvora specifičnih saharida, da bi se, na kraju, specifične glikoforme identifikovale kao IR, IGF1R ili IGF2R pomoću imunoblota. Pošto su receptori identifikovani na kraju eksperimenta, upotrebom anti-receptorskih antitela, nije bilo potrebno preinkubirati solubilizate sa 125 I-ligandima, pa su u ovim eksperimentima solubilizati direktno nanošeni na lektinske kolone. U prvoj seriji ovih eksperimenata korišćene su AAL-, LCA-, PHA-L-, SNA- i Con A-agarozna, na kojima su hromatografisani zbirni uzorci placenti trećeg trimestra i placenti prvog trimestra (5 mg membranskih proteina u odgovarajućim zapreminama solubilizata).

U odvojenom setu eksperimenata hromatografisani su solubilizati poreklom od žena sa dijabetesom (paralelno sa kontrolnim solubilizatima), pri čemu su korišćeni sledeći lektini imobilizovani na agarozu: RCA-I, WGA, LCA, Con A, PHA-E, PHA-L i SNA. Na lektin-agarozne gelove u kolonama je nanošeno po 0,1 ml solubilizata (oko 1 mg membranskih proteina). Svi eksperimenti su dalje izvedeni na isti način: posle recirkulacije uzoraka nanetih na kolonu, u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi, kolone su ispirane odgovarajućom zapreminom pufera za ispiranje. Vezane glikoforme receptora eluirane su odgovarajućim rastvorima za eluciju (Tabela 2), hvatane su frakcije od po 1 ml. Frakcije glikoproteina eluirane sa PHA-L-, SNA-, RCA-I-, WGA-, PHA-E- i Con A-agaroze neutralisane su 2 M rastvorom Trisa (70 μ l/ml za frakcije eluirane sa PHA-L- i SNA-agaroze, odnosno 20 μ l/ml za frakcije sa Con A-agaroze).

Frakcije sa AAL- i LCA-agaroze nije bilo potrebno neutralisati, jer su eluirane rastvorima čija je pH vrednost neutralna (Tabela 2). Specifično eluirane frakcije sa rednim brojem 2-6 (to jest frakcije sa najvećim očekivanim sadržajem IR i IGFR) su sakupljene u jedan, zbirni uzorak (ukupna zapremina 5 ml), koji je kvantitativno prenet u crevo za dijalizu. Uzorak je dijalizovan prvo naspram destilovane vode (u trajanju od 1 h), a potom i naspram rastvora za dijalizu (150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100 (v/v)) preko noći. Uzorci su potom koncentrovani na mini i mikrokoncentratoru sa porama dimenzija 10 kDa, do krajnje zapremine od oko 0,2 ml. Tako su dobijeni koncentrovani uzorci glikoproteina, poreklom iz placenti prvog i trećeg trimestra, kao i iz placenti dijabetičnih majki, koji su eluirani sa pojedinačnih lektinskih kolona. Ovi uzorci su kasnije ispitivani imunoblotom (Odeljak 3.13), koji je usledio nakon elektroforeze pomenutih glikoproteina u neredukujućim uslovima (Odeljak 3.10.).

Na kraju je koncipiran i eksperiment koji je trebalo da pokaže vezivanje glikoformi IR za lektine SNA, WGA i Con A. I u ovom slučaju su lektini bili imobilizovani na agarosi, na koje je naneto po 10 mg solubilizata iz reprezentativne zdrave placente trećeg trimestra. Kolone su isprane i eluirane pod uobičajenim uslovima (Tabela 2). Za razliku od prethodno opisanih LAH, gde je prisustvo IR u eluiranim frakcijama ispitivano imunoblotom, ovde je to urađeno jednostavnim testom vezivanja ¹²⁵I-insulina u epruveti (Odeljak 3.8.).

3.10. Elektroforetsko razdvajanje proteina i elektrotransfer

Membranski proteini iz solubilizata, kao i iz frakcija eluiranih sa lektinskih kolona, su razdvajani SDS PAG elektroforezom (SDS-poliakrilamid gel elektroforeza na 4% gelu za koncentrovanje i 8% gelovima za razdvajanje, ukoliko nije drugačije naglašeno), po proceduri preuzetoj iz literature uz manje modifikacije (Nedić i Masnikosa, 2009). Svi uzorci su, pre nanošenja na elektroforetske gelove, razblaživani puferom za uzorke (PZU). U zavisnosti od koncentracije membranskih proteina u uzorcima, oni su razblaživani 2 puta koncentrovanim PZU (25% 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (v/v), 4% SDS (m/v), 20% glicerol (v/v), 0,1% bromfenolplavo (m/v)) ili 5 puta koncentrovanim PZU (12,5% 2 M Tris-HCl pH 6,8 (v/v), 10% SDS (m/v), 30% glicerol (v/v), 0,25% bromfenolplavo (m/v)). Elektroforeza je tekla ili u neredukujućim ili u

redukujućim uslovima (uz dodatak 10% β -merkaptetanola (v/v) za 2 puta koncentrovani PZU, ili 25% β -merkaptetanola (v/v) za 5 puta koncentrovani PZU). Uzorci su po potrebi razblaživani HBS puferom (podešavanje da u svim uzorcima na jednom elektroforetskom gelu bude identična koncentracija proteina) i kuvani 5 minuta na 95 °C. Elektroforeza je tekla pri naponu od 200 V, u Tris-HCl puferu (25 mM Tris-HCl, 0,19 M glicin, 0,1% SDS (*m/v*), pH 8,3). Nakon završetka elektroforeze proteini na gelovima su bojeni ili podvrgavani elektrotransferu na nitroceluloznu membranu, pri naponu od 100 V u trajanju od 1 h u Tris-HCl puferu (25 mM Tris-HCl, 0,19 M glicin, 20% metanol (v/v), pH 8,3). Nakon elektrotransfera proteina na membrane, ove su bojene rastvorom Ponceau S boje (0,1% Ponceau S (*m/v*), 5% HAc (v/v)), pa su odbojene TBST puferom (10 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20 (v/v), pH 7,4). Nitrocelulozne membrane predviđene za imunoblot (Odeljak 3.13.) blokirane su potapanjem u rastvor mleka (5% mleko u prahu u TBST puferu (*m/v*)), u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Membrane koje su ispitivane lektinskim blotom (Odeljak 3.14.) su nakon elektrotransfera blokirane rastvorom BSA (3% BSA u TBST), preko noći na 4 °C uz mućkanje.

3.11. Bojenje gelova Coomassie brilliant blue bojom

Proteini na gelovima su detektovani bojenjem CBB bojom. Nakon elektroforeze, gelovi su potapani u rastvor za bojenje (0,1% CBB R250 (*m/v*), 40% metanol (v/v), 10% HAc (v/v)), u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Gelovi su potom obezbojavani rastvorom za obezbojavanje (20% metanol (v/v), 10% HAc (v/v)) uz mućkanje i izmenu rastvora.

3.12. Bojenje gelova Schiff-ovim reagensom

U cilju detekcije glikoproteina, pojedini gelovi su bojeni Schiff-ovim reagensom. Prvo su (gliko)proteini na gelu fiksirani rastvorom za fiksiranje (10% etanol (v/v), 5% HAc (v/v)), u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja vodom, gelovi su inkubirani u rastvoru natrijum-perjodata (natrijum-perjodat 0,5% (*m/v*)) u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja gelova usledila je inkubacija sa Schiff-

ovim reagensom (0,15% fuksin (*m/v*), 0,3% HCl (*v/v*), 0,3% kalijum-metabisulfit (*m/v*)) u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Gelovi su potom ispirani u česmenskoj vodi, što je dovelo do razvijanja boje. Po završenom bojenju, gelovi su ispirani destilovanom vodom, čime je zaustavljeno dalje razvijanje boje.

3.13. Imunoblot

Posle blokiranja u rastvoru mleka (Odeljak 3.10.), nitrocelulozne membrane su inkubirane u rastvoru odgovarajućih primarnih antitela u TBST puferu, preko noći na 4 °C uz mućkanje. Korišćena su sledeća razblaženja primarnih antitela:

- monoklonsko mišje antitelo spram humanog IR (Calbiochem) - 1:3000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*)
- monoklonsko mišje antitelo spram goveđeg IGF2R (Calbiochem) - 1:2000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*)
- monoklonsko mišje antitelo spram humanog IR (GroPep) - 1:200 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*)
- poliklonska zečija antitela spram humanog IGF1R (Cell Signaling) - 1:1000 u 5% BSA u TBST puferu (*m/v*)
- monoklonsko mišje antitelo spram humanog IGF1R (BioSource) - 1:400 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*).

Posle ispiranja 6 puta po 5 minuta TBST puferom, membrane su inkubirane u rastvoru sekundarnih antitela u TBST puferu, u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Korišćena su sledeća razblaženja sekundarnih antitela:

- ovčija HRP-obeležena antitela spram mišjeg IgG - 1:5000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*)
- magareća HRP-obeležena antitela spram zečijeg IgG - 1:10 000 u 1% mleku u TBST puferu (*m/v*).

Nakon ispiranja 6 puta po 5 minuta TBST puferom, i na kraju destilovanom vodom, membrane su inkubirane u rastvoru za hemiluminiscenciju, prema uputstvu proizvođača. Za razvijanje i fiksiranje filmova korišćeni su komercijalni reagensi: razvijanje 5 minuta u razvijaču, ispiranje 1 minut u rastvoru sirćetne kiseline (1% HAc

(v/v)) i fiksiranje 10 minuta u fiksiru. Filmovi su nakon toga ispirani pod mlazom česmenske vode u trajanju od 10-15 minuta, pa osušeni na vazduhu.

3.14. Lektinski blot

Nitrocelulozne membrane namenjene lektinskom blotu su blokirane u rastvoru 3% BSA (Odeljak 3.10.), da bi potom bile inkubirane u rastvorima različitih lektina kovalentno obeleženih biotinom (0,2-1,0 µg lektina/ml TBST pufera), u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Sledeći biotinizirani lektini su upotrebljeni za karakterizaciju glikanske komponente membranskih proteina iz solubilizata: LCA, PHA-E, PHA-L, SNA i MAL-II. Membrane su ispirane 4 puta po 5 minuta TBST puferom, a potom inkubirane sa HRP-avidinom D (0,05 µg HRP-avidina D/ml TBST pufera) u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja membrana 4 puta po 5 minuta TBST puferom, trojni kompleksi glikoproteina, biotiniziranih lektina i HRP-avidina D su detektovani pomoću rastvora za hemiluminiscenciju (kao i kod imunoblota, Odeljak 3.13.). Hemijska desijalinizacija uzoraka solubilizata (inkubacija sa 0,12 M rastvorom HCl u trajanju od 1 h na 80 °C) je prethodila njihovoj inkubaciji sa biotiniziranim PHA-E i PHA-L lektinima.

Specifičnost biotiniziranih lektina proveravana je inhibicijom tih lektina odgovarajućim saharidima i/ili specifičnim glikoproteinima koji nose takve saharide. Kao pozitivne kontrole za vezivanje pojedinačnih lektina za membranske glikoproteine iz placente poslužili su glikoproteini čiji su N-glikani poznati. U cilju inhibicije vezivanja biotiniziranih lektina za glikoproteine iz placente korišćeni su: D-Lac (za SNA), D-Man (za LCA), fetuin (za MAL-II), humani IgG (za PHA-E) i asijalofetuin (za PHA-L). Lektini su inkubirani sa odgovarajućim saharidom ili glikoproteinom 1 h na sobnoj temperaturi. BSA je korišćen kao negativna kontrola u svim slučajevima. Humani IgG je korišćen kao pozitivna kontrola za SNA, LCA i PHA-E, ali i kao negativna kontrola za MAL-II i PHA-L. Kao negativna kontrola za SNA i MAL-II korišćeni su i hemijski desijalinizovani uzorci solubilizovanih membranskih proteina.

3.15. Elektroforetsko razdvajanje ugljenih hidrata na DNK sekvenatoru

Postupak analize ugljenih hidrata na DNK sekvenatoru (DSA-FACE) urađen je po prilagođenoj metodi iz literature (Laroy i sar., 2006; Vanhooren i sar., 2008). Liofilizovani solubilizati su resuspendovani u miliQ destilovanoj vodi, tako da koncentracija proteina bude 10 mg po mililitru, u zapremini od 5 μ l. U bunarčiće na ploči od 96 mesta pipetirano je po 5 μ l uzorka i 2 μ l rastvora SDS (5% SDS u 0,01 M rastvoru NH_4HCO_3 , pH 8,3). Kontrolni serum je prvo razblaživan u destilovanoj vodi u odnosu 2 prema 3. Ploča je potom zatvorena folijom, a uzorci su denaturisani zagrevanjem na 95 °C u toku 5 min, da bi odmah zatim bili ohlađeni na 4 °C u toku 15 min. Reakcionoj smeši je dodato 3 μ l rastvora enzima PNGase F (0,44 μ l rastvora PNGase F u 100 μ l 0,01 M NH_4HCO_3 , pH 8,3, 3,33% NP40). Ploča je potom zatvorena folijom i inkubirana u termobloku 3 h na 37 °C, pa ohlađena na 4 °C. Reakcija u bunarčićima je zaustavljena dodatkom 100 μ l destilovane vode u svaki od njih. Od svakog pojedinačnog uzorka, dobijenog na opisani način, preneto je po 6 μ l u bunarčiće na novoj, čistoj ploči, dok je ploča sa preostalom zapreminom uzoraka dobro zatvorena i zamrznuta na -20 °C. Alikvoti uzoraka (6 μ l) na novoj ploči su osušeni u termobloku, u toku 1 h na 60 °C, pa je ploča ohlađena na 4 °C. Uzorci (sad već sadrže slobodne N-glikane skinute sa glikoproteina iz membrana placente) su, potom, kovalentno obeležavani dodatkom 1 μ l boje APTS. Boja je uvek bila sveže pripremana, i to mešanjem jednakih zapremina 0,02 M rastvora APTS (u 1,2 M rastvoru limunske kiseline) i 1 M NaCNBH_3 (u DMSO). Ploča sa uzorcima N-glikana je poklopljena folijom, sadržaj u bunarčićima je mešan u toku 5 minuta, usledilo je kratko centrifugovanje (da se uzorci spuste sa zida bunarčića na dno), praćeno inkubiranjem u toku 16 h na 37 °C. Po isteku inkubacije ploča sa uzorcima je ohlađena na 4 °C, a reakcija obeležavanja N-glikana bojom je zaustavljena dodatkom 100 μ l destilovane vode u sve bunarčiće.

U bunarčiće za uzorke na još jednoj novoj ploči pipetirano je redom po: 0,25 μ l 0,1 M rastvora amonijum-acetata pH 5,0, 0,2 μ l sijalidaze (same ili u kombinaciji sa 0,2 μ l enzima α -fukozidaze), 2,55 μ l destilovane vode i 2 μ l rastvora N-glikana obeleženog APTSom (ostatak obeleženog glikana zamrznut je na -20 °C). Ploča je ponovo zatvorena folijom, promešana na Vorteksu, centrifugovana, a potom inkubirana 16 h na

37 °C. Reakcija je zaustavljena dodatkom 40 µl destilovane vode, a reakciona smeša promešana na Vorteksu i centrifugovana. Na ovaj način smo dobili uzorke desijalinizovanih APTS-obeležanih N-glikana. Alikvoti ovih uzoraka zapremine od 10 µl korišćeni su za DSA-FACE analizu na ABI 3130 sekvenatoru opremljenom kapilarom dužine 36 cm napunjenom poliakrilamidnim linearnim polimerom tipa POP7.

Da bi se procenila zastupljenost pojedinačnih N-glikana, integraljene su površine ispod N-glikanskih maksimuma tako tako što je zbir površina ispod svih maksimuma računat kao 100% (ukupna površina). Tako je udeo površine bilo kog maksimuma u ukupnoj površini predstavljen relativnom zastupljenošću tog maksimuma, koja odlikava relativnu zastupljenost N-glikana eluiranog/eluiranih u datom maksimumu u odnosu na ukupne N-glikane iz uzorka (Fang i sar., 2010b).

3.16. Analiza i obrada podataka

Za analizu i obradu dobijenih podataka korišćeni su sledeći programi: Gene Mapper verzija 3.7 (za DSA-FACE rezultate - u fabrički datim podešavanjima za analizu AFLP - engl. *amplified fragment length polymorphism*), Image Master TotalLab verzija 2.01 (za obradu imunoblotova i lektinskih blotova) i SPSS 10 (za statističku obradu dobijenih podataka).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Membranski N-glikom

Kao što je već rečeno, membranski proteini su u najvećem broju slučajeva glikozilovani. N-glikozilacija membranskih proteina zauzima bitno mesto u formiranju njihove trodimenzionalne strukture i ostvarivanju njihove funkcije (Odeljak 2.3.2.3). Najbitnije uloge ćelijske membrane su: transdukcija signala koje prenose hormoni i faktori rasta, kontakt sa drugim ćelijama, adhezija za ekstracelularni matriks, ćelijska migracija, transport jona i nutrijenata u i van ćelije, odbrana ćelije od mikroorganizama itd. Membranski proteini su ključni nosioci ovih uloga. U poslednjoj deceniji se u literaturi pojavio veći broj studija koje su pokazale značajno učešće N-glikana na membranskim proteinima u ostvarivanju navedenih funkcija, o čemu govore i brojni revijalni radovi (Takahashi i sar., 2004; Marth i Grewal, 2008; Janik i sar., 2010; Petrescu, 2012; Gornik i sar., 2012). Na primeru nekoliko membranskih receptora (EGFR, Trk i IR) pokazano je da, u ćelijama u kojima je potpuno blokirana sinteza N-glikana, receptori ne dospevaju na površinu ćelije, to jest ostaju u citoplazmi (Takahashi i sar., 2004). Valjana N-glikozilacija integrina im omogućava pravilno obavljanje osnovne aktivnosti: adhezije ćelija za komponente ekstracelularnog matriksa, laminin i fibronektin (Janik i sar., 2010). Novija istraživanja otkrivaju mehanizme direktne povezanosti između metaboličkog fluksa heksoza i dužine poluživota receptora za faktore rasta (IGF1R, EGFR, PDGFR, FGFR) na površini ćelije, koji zavise od stepena razgranatosti N-glikana vezanih za ove receptore (Lau i sar., 2007).

Sistematsko profilisanje N-glikoma humanog seruma u zdravlju i bolesti je već godinama u toku, i obrađeno je više hiljada uzoraka (Knežević i sar., 2009; Knežević i sar., 2010; Novokmet i sar., 2014). Izmenjena N-glikozilacija je dovedena u vezu sa određenim oboljenjima (Dall'Olio i sar., 2013). Odavno je poznato da kancerske ćelije po pravilu sekretuju glikoproteine sa izmenjenom glikozilacijom (Glavey i sar., 2015). Takvi proteini mogu biti solubilni ali i membranski. Ovo je polje na kome se mnogo radilo i radi, u potrazi za potencijalnim biomarkerima (Kirwan i sar., 2015). Postavlja se pitanje koji je razlog zbog kojeg je glikozilacija membranskih proteina ovoliko dugo bila van fokusa istraživanja. Jedan od razloga je njihova mala rastvorljivost. Naime, dok je jedan deo membranskih proteina moguće rastvoriti u određenim deterdžentima, postoje i oni koji se nalaze u domenima membrana koji se ne mogu solubilizovati

(Kalipatnapu i Chattopadhyay, 2005). Nekompatibilnost deterđženata sa brojnim analitičkim metodama, posebno onima za određivanje strukture glikana, verovatno predstavlja glavni uzrok nedostatka literaturnih podataka, koji se tiču glikozilacije membranskih proteina. U početku izrade ove doktorske teze, u literaturi gotovo da nije bilo podataka o ukupnom membranskom N-glikomu bilo kojeg tkiva ili ćelijske linije. Takođe su i informacije o tipu i strukturi N-glikana vezanih za pojedinačne membranske proteine bile sporadične.

Iz navedenih razloga, prvi cilj ove teze je bio profilisanje membranskog N-glikoma jednog humanog tkiva, odnosno dobijanje informacije o tome koji su tipovi N-glikana najčešće prisutni u membranskim glikoproteinima. Kao model-tkivo odabrana je humana placenta, najviše zbog njene dostupnosti, kao i zbog činjenice da su procesi rasta i proliferacije u placenti relativno brzi, i u nekim segmentima podsećaju na tumorogenezu (Murray i sar., 1999).

Knežević i saradnici su pokazali da su individualne varijacije u N-glikomu humanog seruma izrazite (Knežević i sar., 2009). Pokazano je i da se N-glikozilacija serumskih proteina menja sa starošću (Vanhooren i sar., 2007; Knežević i sar., 2010; Vanhooren i sar., 2010; Ding i sar., 2011; Gudelj i sar., 2014). U svetlu ovih saznanja, postavljena su još dva cilja ove teze: ispitivanje da li je membranski N-glikom placentе podložan individualnim varijacijama i da li zavisi starosti žena (Odeljak 4.1.1.).

Placenta raste i razvija se u cilju ispunjenja zahteva fetusa, pa se njena struktura i funkcija znatno menjaju tokom gestacije (Gude i sar., 2004). Znajući da su proteini nosioci bioloških funkcija placentе, pretpostavljeno je da bi tokom gestacije moglo doći do promena u ekspresiji i/ili funkcionisanju membranskih proteina. Ove promene ne bi mogle biti na nivou aminokiselinske sekvence proteina, koja je određena genetskim kodom, već isključivo na nivou glikozilacije. Stoga je definisan i jedan od najbitnijih ciljeva ove teze, a to je ispitivanje uticaja gestacijske starosti na N-glikom membranskih proteina iz humane placentе (Odeljak 4.1.2.). Na kraju, imajući u vidu da je izmenjena glikozilacija proteina često spregnuta sa izmenjenom funkcijom, kao i da izmenjena funkcija jednog ili više proteina može biti uzrok bolesti, jedan od ciljeva ove teze je ispitivanje potencijalnih promena u membranskom N-glikomu kod patoloških trudnoća, kao i onih komplikovanih patologijom majki (Odeljak 4.1.3.).

Solubilizati su izolovani iz placenti prvog i trećeg trimestra, koje su dobijene od

žena različite starosti, a takođe i iz placenti trećeg trimestra žena sa patološkim trudnoćama. Prilagođena metoda kapilarne elektroforeze (DSA-FACE) omogućila je da se stekne uvid u sastav i strukturu N-glikana, koji su enzimski oslobođeni sa membranskih proteina iz ispitivanih solubilizata. Uzorci analizirani DSA-FACE metodom paralelno su ispitivani i metodom lektinskog blota.

4.1.1. Uticaj starosti žena na membranski N-glikom humane placente

U ovom odeljku opisana je analiza membranskog N-glikoma iz placenti koje su dobijene od žena različite starosne dobi. Placente su bile iz prvog ili iz trećeg trimestra trudnoće. U tu svrhu, uzorci (n=44) su podeljeni u nekoliko grupa na osnovu starosti žena i gestacije:

1. PPTm, solubilizati iz placenti prvog trimestra žena mlađe dobi (17-30 godina, prosečna starost 25 godina). Sakupljene placente (n=80) sortirane su u uprosečene zbirne uzorke (n=7);

2. PPTs, solubilizati iz placenti prvog trimestra žena starije dobi (30-45 godina, prosečna starost 36 godina). Sakupljene placente (n=80) sortirane su u uprosečene zbirne uzorke (n=7);

3. PTTm, solubilizati iz placenti trećeg trimestra žena mlađe dobi (22-30 godina, prosečna starost 27 godina). Ukupan broj uzoraka je 15;

4. PTTs, solubilizati iz placenti trećeg trimestra žena starije dobi (35-47 godina, prosečna starost 40 godina). Ukupan broj uzoraka je 15.

Postupak dobijanja solubilizata iz humanih placenti i formiranje grupe uzoraka detaljno je opisan u Odeljcima 3.5. i 3.6. Membranski N-glikom je primarno profilisan metodom DSA-FACE (Odeljak 4.1.1.1.), dok je lektinski blot (Odeljak 4.1.1.2.) služio za potvrdu dobijenih rezultata.

4.1.1.1. Profil membranskog N-glikoma humane placente određen pomoću DSA-FACE

DSA-FACE je pre više od decenije prilagođena za ispitivanje profila N-glikana (engl. *N-glycan fingerprint*) solubilnih glikoproteina (Callewaert i sar., 2001). Prednosti

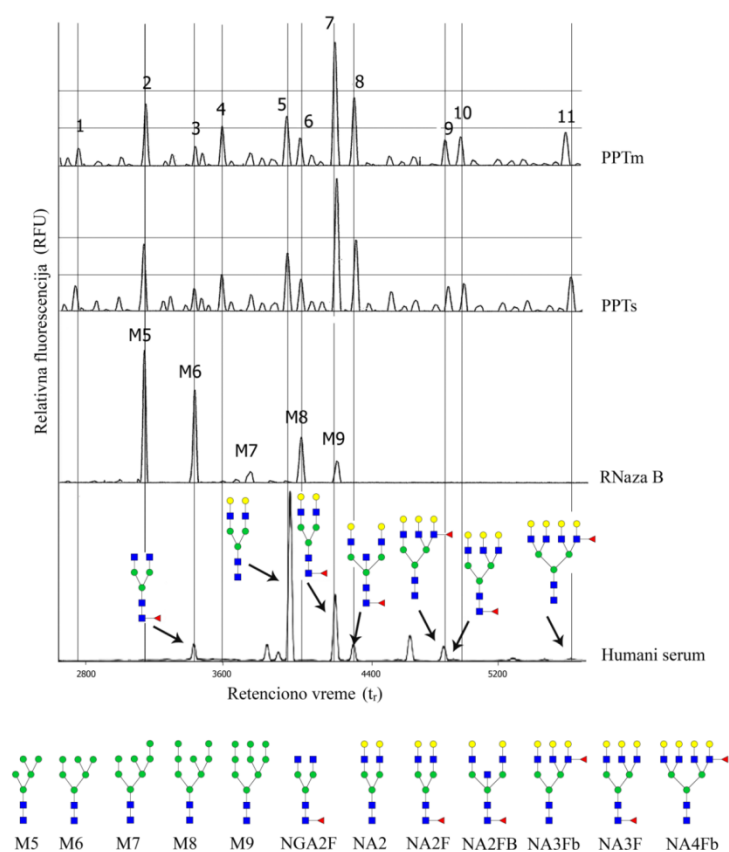
ove metode u odnosu na druge metode za ispitivanje glikozilacije su što je brza i protočna i što prisustvo deterdženta ne ometa njeno izvođenje. Metoda je osetljiva, pouzdana i može da razdvoji čak i izobarne stereoizomere glikana (Vanhooren i sar., 2008). Jedan uzorak analizira se za nešto više od 7 minuta, a u jednom DSA-FACE ciklusu istovremeno se analizira 96 uzoraka, odnosno, onoliko koliko ima mesta na jednoj ploči sa bunarčićima. Istovremenom analizom većeg broja uzoraka, greške i pomeranja koja mogu nastati pri zasebnim analizama svode se na minimum. Postupak analize N-glikana se sastoji iz nekoliko koraka: i) enzimska hidroliza celokupnog N-glikana sa proteina (deglikozilacija peptidnom PNGazom F); ii) fluorescentno obeležavanje hidrolizom oslobođenih N-glikana (kovalentnim vezivanjem APTS boje za redukujuće krajeve svih N-glikana); iii) hidroliza ostataka Sia sa svih APTS-glikana (desijalinizacija enzimom sijalidazom); iv) razdvajanje negativno naelektrisanih APTS-glikana kapilarnom elektroforezom na DNK sekvenatoru. Rezultati se dobijaju u formi tzv. **DSA-FACE profila**, koji predstavlja svojevrsni elucioni dijagram (elektroforegram), gde se na x-osi nalaze retenciona vremena svih eluiranih APTS-N-glikana (t_r), dok su na y-osi predstavljene relativne vrednosti intenziteta fluorescencije tih glikana (RFU). APTS-obeleženi N-glikani detektuju se kao maksimumi na određenim t_r . Glikani manje molekulske mase i jednostavnije strukture se kraće vreme zadržavaju na koloni, pa se sa nje brže eluiraju, i imaju manja t_r , dok se N-glikani većih masa i/ili veće razgranatosti eluiraju na većim t_r . Površina ispod glikanskog maksimuma predstavlja se kao relativna zastupljenost datog N-glikana u odnosu na zbir površina ispod svih maksimuma eluiranih N-glikana u ispitivanom uzorku, koji je normalizovan na 100% (Liu i sar., 2007). Za kalibraciju DSA-FACE metode su korišćeni:

1. **RNaza B.** Sastav i struktura N-glikana RNaze B određena je tehnikama ^1H NMR i MS. N-glikani RNaze B su oligomanoznog tipa i sadrže od pet do devet Man ostataka. U zavisnosti od broja Man ostataka, oni su označeni kao: M5 ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$), M6 ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$), M7 ($\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$), M8 ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) i M9 ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) (Fu i sar., 1994).

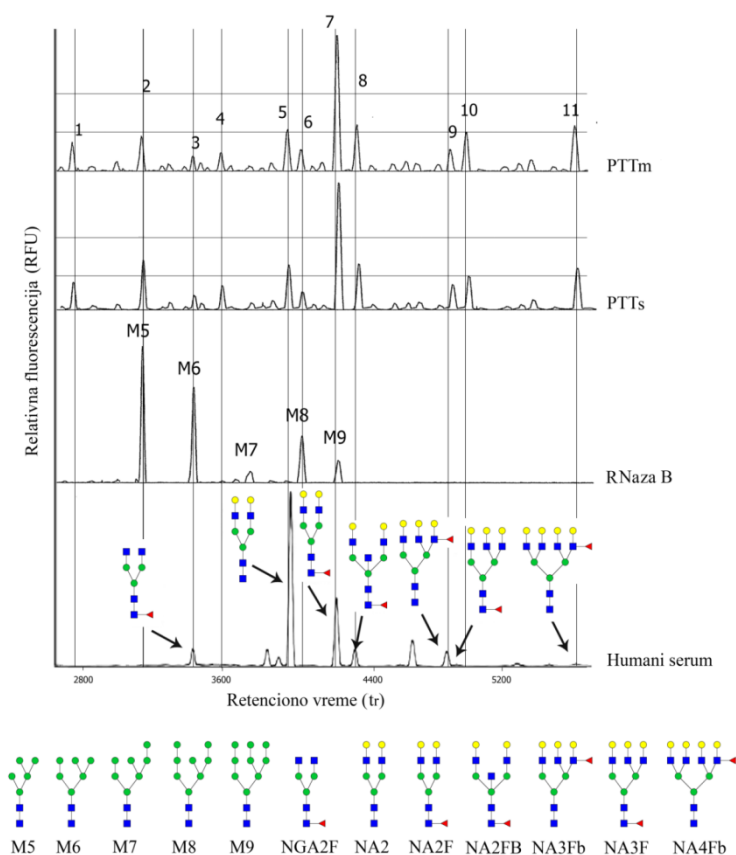
2. **Humani serum.** Sa izuzetkom serumskog albumina, svi najzastupljeniji proteini seruma su glikozilovani, pa serum raspolaže najraznovrsnijim N-glikanima. Prvo je profilisan N-glikom iz reprezentativnog humanog seruma zdrave osobe (kontrolni serum) primenom DSA-FACE metode. U nezavisnom eksperimentu su, iz

istog uzorka seruma enzimski odvojeni N-glikani sa proteina i razdvojeni u frakcije primenom HPLC metode, a zatim su frakcije podvrgnute analizi N-glikana primenom MS (Laroy i sar., 2006; Liu i sar., 2007). Frakcije sa HPLC, koje sadrže N-glikane poznate, tačno određene strukture, puštane su na kapilarnoj koloni u pojedinačnim DSA-FACE eksperimentima u cilju određivanja njihovih t_r .

Prilikom svake analize N-glikana iz solubilizata, paralelno su analizirani i N-glikani iz RNaze B i kontrolnog seruma. Reprezentativni primeri DSA-FACE profila prikazani su na Slikama 14 i 15.



Slika 14. Tipičan DSA-FACE profil desijalinizovanih APTS-obeđenih N-glikana membranskih proteina poreklom iz placenti prvog trimestra mlađih (PPTm) i starijih žena (PPTs). Na slici su prikazani i N-glikani RNaze B, kao i kontrolnog humanog seruma. Strukture glikana skinutih sa proteina humanog seruma prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (www.functionalglycomics.org). Plavi kvadrat predstavlja GlcNAc; zeleni krug predstavlja Man; crveni trougao predstavlja Fuc; žuti krug predstavlja Gal.



Slika 15. Tipičan DSA-FACE profil desijalinizovanih APTS-obeležanih N-glikana sa membranskih proteina poreklom iz placenti trećeg trimestra mladih (PTTm) i starijih žena (PTTs). Na slici su prikazani i N-glikani iz RNaze B, kao i kontrolnog humanog seruma. Strukture glikana prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (videti i legendu ispod Slike 14).

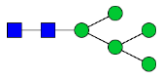
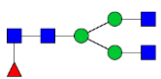
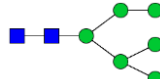
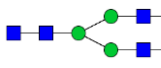
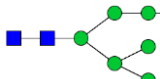
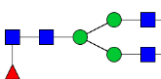
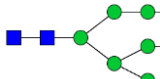
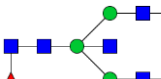
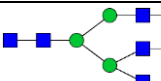
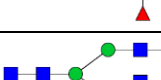
Na Slikama 14 i 15 uočava se da se DSA-FACE profil desijalinizovanih APTS-obeležanih N-glikana sastoji od jedanaest maksimuma. U tekstu koji sledi, desijalinizovani APTS-obeleženi N-glikani, enzimski otcepljeni sa membranskih glikoproteina iz uzoraka solubilizata humane placentе, biće nazivani **N-glikani**. Iako su svi uzorci poreklom od zdravih žena podvrgnuti DSA-FACE analizi N-glikana, prikazana su samo četiri tipična eluciona profila, jer uzorci iz iste grupe (placentе iste gestacijske starosti od žena koje pripadaju istoj starosnoj grupi) daju veoma slične profile. Maksimumi N-glikana se međusobno razlikuju po svojim intenzitetima i t_r . Uzimajući u obzir veliku raznovrsnost N-glikana sa različitim proteinima, koji su identifikovani i literaturno opisani (Harvey i sar., 2008; Adamczyk i sar., 2012; Trbojević Akmačić i sar., 2015) sasvim je izvesno da je broj N-glikana na

membranskim proteinima placente daleko iznad jedanaest. Unutar jednog maksimuma na DSA-FACE profilu, na istom t_r , eluira se veći broj (izomera) N-glikana. Ova činjenica je poznata i iz literature (Prien i sar., 2009). Zato je tačnije govoriti o DSA-FACE kao o metodi za profilisanje N-glikana, na kojoj će se pokazati otisak najzastupljenijih N-glikana iz određenog biološkog uzorka.

DSA-FACE je razvijena kao metoda za brzu i jednostavnu detekciju razlika u tipu i zastupljenosti N-glikana između ispitivanih uzoraka (Laroy i sar., 2006). DSA-FACE nije metoda kojom je moguće nedvosmisleno utvrditi strukture N-glikana (Vanhooren i sar., 2008). Međutim, t_r je veoma osetljivo na promenu strukture N-glikana, te se čak i glikani iste mase, ali različite strukture (npr. razgranatosti), eluiraju na različitim t_r . Takođe, vrednosti t_r su vrlo reproducibilne. Prema tome, čak i ne poznavajući strukture N-glikana, koje se eluiraju u okviru svakog pika na DSA-FACE sa 100%-tnom tačnošću, postoji veoma velika verovatnoća da pikovi sa identičnim t_r sadrže iste N-glikanske strukture. U ovoj tezi su za poređenje t_r N-glikana membranskih proteina iz uzoraka placente sa t_r definisanih N-glikanskih struktura korišćeni N-glikani RNaze B i oni iz kontrolnog humanog seruma. U Tabeli 3 dat je uporedni prikaz struktura N-glikana humanog seruma i RNaze B, koji se eluiraju na istim t_r kao i glikanski maksimumi uzoraka solubilizata placente. Podaci u Tabeli 3 su dobijeni iz DSA-FACE profila prikazanih na Slikama 14 i 15. Strukture najvećeg broja detektovanih N-glikana iz uzoraka placente (čak sedam od jedanaest DSA-FACE maksimuma) se mogu pretpostaviti na osnovu poklapanja njihovih t_r sa onima od N-glikana iz kontrolnog seruma. **Max3** (N-glikan eluiran u maksimumu 3) iz uzoraka, NGA2F (biantenarni agalakto-glikan sa Fuc u jezgru) iz humanog seruma i M6 imaju isto t_r . Pošto NGA2F i M6 imaju po osam monosaharidnih jedinica, najverovatnije je da ih i N-glikan iz max3 ima toliko. Dakle, moguće je da se u max3 eluira upravo NGA2F. Prateći istu logiku, t_r **max5** i t_r NA2 iz humanog seruma se poklapaju, pa je vrlo verovatno da je u max5 eluiran NA2 (sa devet monosaharidnih jedinica). **Max7** iz uzoraka, NA2F (biantenarni glikan sa jezgarnom Fuc) i M9 imaju isto t_r . T_r **max8** iz uzoraka poklapa se sa t_r NA2FB (biantenarni glikan sa Fuc u jezgru i umetnutim GlcNAc ostatkom). T_r **max9** poklapa se sa t_r antenarno fukozilovanog triantenarnog glikana (NA3Fb). T_r **max10** poklapa se sa t_r triantenarnog glikana sa jezgarnom Fuc (NA3F). Dalje, t_r **max11** poklapa se sa t_r antenarno fukozilovanog tetraantenarnog

glikana (NA4Fb).

Tabela 3. Uporedni prikaz N-glikana iz humanog seruma i RNaze B, čija se t_r poklapaju sa t_r maksimuma N-glikana poreklom iz uzoraka solubilizata placente prvog i trećeg trimestra mlađih i starijih žena. Strukture glikana prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (videti i legendu ispod Slike 14).

Placentni solubilizat	Humani serum	RNaza B
Max1	-	-
Max2	-	 M5
Max3	 NGA2F	 M6
Max4	-	-
Max5	 NA2	-
Max6	-	 M8
Max7	 NA2F	 M9
Max8	 NA2FB	-
Max9	 NA3Fb	-
Max10	 NA3F	-
Max11	 NA4Fb	-

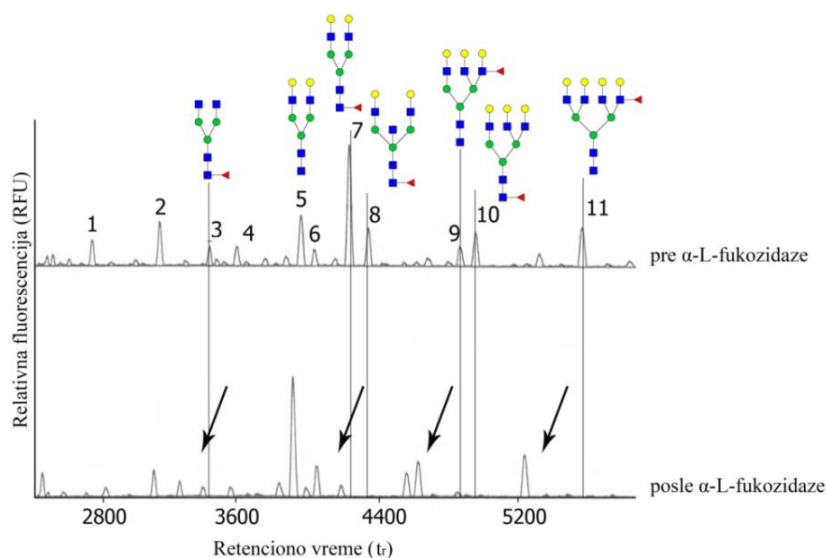
Strukture na maksimumima 1, 2, 4 i 6 se ne mogu pretpostaviti na osnovu N-glikana iz kontrolnog seruma, jer tih t_r tamo nema. Ipak, t_r **max2** poklapa se sa t_r M5, koji sadrži sedam monosaharidnih jedinica, iz čega se može zaključiti da max2 takođe ima sedam monosaharidnih jedinica. Kandidat za strukturu iz max2 je biantenarni agalakto-glikan

bez Fuc u jezgru - NGA2 (max3 bez Fuc). Za **max6** možemo pretpostaviti da sadrži deset monosaharidnih jedinica, jer se njegov t_r i t_r M8, koji sadrži deset monosaharidnih jedinica, poklapaju. I, na kraju, iz Tabele 3 se vidi da se t_r max1 i max4 ne mogu dovesti u vezu ni sa jednim od t_r N-glikana iz kontrolnog seruma ili iz RNaze B. Ipak, t_r **max1** manje je od t_r max2, koje odgovara t_r M5. S obzirom da se u DSA-FACE manji N-glikani eluiraju ranije, može se zaključiti da max1 najverovatnije sadrži manje od sedam monosaharidnih jedinica, odnosno to bi mogla da bude paucimanozna struktura formule $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

DSA-FACE metoda ima i svoja ograničenja kao i nedostatke. Glavni nedostatak metode je što se sijalinizovani glikani ne mogu analizirati ovom metodom, a poznato je da se Sia nalazi na završecima mnogih N-glikanskih lanaca (Odeljak 2.3.2.1.). Naime, razdvajanje N-glikana u DSA-FACE se zasniva na razlikama u njihovoj masi/obliku, jer su svi istog naelektrisanja, koje potiče od trostruko negativno naelektrisane APTS fluorescentne boje na redukujućem kraju. Negativno naelektrisanje Sia na neredukujućem kraju nekih N-glikana bi dovelo do povećanja negativne šarže i do njihovog bržeg kretanja pri elektroforezi, u odnosu na glikane iste mase ali manje šarže, što bi činilo zavisnost t_r od mase glikana nepouzdanim i onemogućilo tumačenje rezultata. Zato se svi ostaci Sia uklanjaju sa APTS-glikana pre analize DSA-FACE, dejstvom enzima sijalidaze. Ovo, međutim, ima za posledicu gubitak informacije o broju i položaju Sia na završecima lanaca N-glikana (Vanhooren i sar., 2008; Fang i sar., 2010a). Analiza sijalinizovanih N-glikana nije laka ni kada se primenjuju druge metode, jer se Sia delimično raspada i prilikom MALDI jonizacije uzoraka (Keck i sar., 2005; Morelle i sar., 2006). Zbog toga je sadržaj Sia u uzorcima solubilizata ispitivan alternativnom metodom - lektinskim blotom, o kome će biti reči u Odeljku 4.1.1.2. Drugo ograničenje metode DSA-FACE je to što ona ne daje direktnu informaciju o strukturi N-glikana, već je moguće samo njihovo profilisanje. Ipak, određene informacije o strukturi N-glikana se mogu dobiti kombinovanjem DSA-FACE sa **digestijom** različitim enzimima - egzoglikozidazama (Vanhooren i sar., 2008).

Gotovo sve pretpostavljene strukture N-glikana iz uzoraka placente, osim N-glikana max5, sadrže L-Fuc (Slike 14 i 15). Ukoliko bismo mogli dokazati prisustvo Fuc na N-glikanima iz placente, to bi značilo potvrdu pretpostavljenih struktura. Fuc se često nalazi vezana $\alpha 1,6$ -glikozidnom vezom za unutrašnji ostatak GlcNAc (Fuc u

jezgru), odnosno GlcNAc koji je vezan za ostatak Asn u proteinima (Odeljak 2.3.2.1.). Fuc se može završavati lanac N-glikana, kad je Fuc vezana α 1,2 vezom za Gal iz sekvence Gal β 1,4GlcNAc, ili α 1,3-glikozidnom vezom za GlcNAc iz ove sekvence (antenarna Fuc). Da bi se utvrdilo prisustvo Fuc u ispitivanim N-glikanima, uzorci solubilizata su tretirani α -L-fukozidazom (Liu i sar., 2007). Ovaj enzim katalizuje hidrolizu α -glikozidnih veza između Fuc i ostatka lanca N-glikana (veze mogu biti α 1(2,3,4,6)), a najveću aktivnost ima spram Fuc u jezgru N-glikana (www.prozyme.com). Na Slici 16 dat je primer DSA-FACE profila desijalinizovanih APTS-obeležanih N-glikana poreklom iz uzoraka PTTs pre i posle dejstva α -L-fukozidaze. Na osnovu rezultata prikazanih na Slikama 14 i 15, i u Tabeli 3, pretpostavljeno je da se u max3, max7, max8 i max10 nalaze N-glikani koji sadrže jezgarnu Fuc, kao i da se u max9 i max 11 nalaze N-glikani koji sadrže antenarnu Fuc.



Slika 16. Reprezentativni DSA-FACE profili solubilizata pre i posle dejstva fukozidaze. Strukture glikana prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (videti i legendu ispod Slike 14).

Sa Slike 16 se može videti da je usled dejstva α -L-fukozidaze kod većine maksimuma došlo do određenog pomeranja t_r ka nižim vrednostima, što ukazuje na eluciju N-glikana manjih masa. Pomeranje maksimuma uzrokovano je dejstvom α -L-fukozidaze, što je potvrda prisustva α -vezane Fuc u N-glikanima ispitivanih uzoraka. Na kraju, bilo bi moguće primeniti fukozidazu visoke specifičnosti, koja bi delovala gotovo isključivo na jezgarnu Fuc ili na antenarnu Fuc. Ukoliko bi tada došlo do pomeranja

samo nekih maksimuma, ovo bi predstavljalo još jači dokaz u prilog predloženih struktura ispitivanih N-glikana iz placenti (Liu i sar., 2007).

Integraljenjem površina ispod glikanskih maksimuma je ustanovljeno da je max7 najzastupljeniji u svim ispitivanim uzorcima solubilizata. To znači da najzastupljeniji N-glikan, oslobođen sa membranskih proteina iz humane placente, ima t_r identičan NA2F (asijalo biantenarni glikan sa Fuc u jezgru). Kao što je već spomenuto, vrlo su retki literaturni podaci o membranskom N-glikomu i novijeg su datuma (Horvat i sar., 2012; Horvat i sar., 2013; Liu i sar., 2013). Sva tri navedena rada opisuju N-glikom tumorskih ćelijskih linija ili tumorskog tkiva, nijedan se ne odnosi na zdravo tkivo. U vreme kad je osmišljavana ideja o izradi ove teze postojao je samo jedan rad o membranskom N-glikomu, i taj se odnosio na glikom dve kancerske ćelijske linije (Naka i sar., 2006). Rezultati izloženi u ovoj tezi, dakle, prvi su literaturni podaci o membranskom N-glikomu humane placente (Robajac i sar., 2014), pa nije bilo moguće porediti ih sa rezultatima slične vrste. Horvat i saradnici su N-glikane oslobađali PNGazom sa celih HeLa ćelija, koje su bile zarobljene u poliakrilamidnom gelu, dok je N-glikom profilisan HPLC metodom, nakon obeležavanja N-glikana fluoroformom 2-aminobenzamidom. Pik disijalo biantenarnih N-glikana sa Fuc u jezgru-A2F činio je 28,92% ukupnih N-glikana iz uzorka, dok je pik tetraantenarnih N-glikana činio 12,83% (Horvat i sar., 2013). Rezultati dobijeni u ovoj tezi pomoću DSA-FACE (prikazani u Tabeli 4) pokazuju da je zastupljenost biantenarnih glikana sa Fuc u jezgru (NA2F) $24,43 \pm 1,14\%$ u PPT, odnosno $28,01 \pm 1,31\%$ u PTT uzorcima (prikazano na Slici 25). Što se tiče tetraantenarnih N-glikana, rezultati ove teze daju sledeće vrednosti zastupljenosti: $6,65 \pm 0,92\%$ u PPT, odnosno $11,06 \pm 1,03\%$ u PTT uzorcima (prikazano na Slici 25). Ovo predstavlja više nego dobro slaganje, s obzirom na drugi tip ćelija i drugu metodu profilisanja N-glikana.

NA2F je opisan i kao najzastupljeniji N-glikan na DSA-FACE profilu membrana tumorskih ćelijskih linija dojke (Liu i sar., 2013). A2F je opisan kao najzastupljeniji N-glikan jednog membranskog proteina iz humane placente - $\alpha_5\beta_1$ integrina (Nakagawa i sar., 1996). Disijalo biantenarna struktura sa Fuc u jezgru (A2F) je bogato zastupljeni N-glikan i hormona β -hCG iz humane placente (humani horionski gonadotropin). NA2F i NA2 su takođe najzastupljeniji N-glikani vezani za glikoproteinsku slobodnu alfa podjedinicu iz humane placente (Nemansky i sar., 1998).

Vrednosti relativnih intenziteta svih pojedinačnih maksimuma sa DSA-FACE profila prikazane su u Tabeli 4.

Tabela 4. Vrednosti relativnih intenziteta N-glikanskih maksimuma PPT i PTT uzoraka mlađe (m) i starije (s) grupe. Vrednosti relativnih intenziteta date su zajedno sa vrednostima standardne devijacije (sd).

	PPTm ± sd	PPTs ± sd	PTTm ± sd	PTTs ± sd
max1	4,7 ± 1,4	4,5 ± 0,4	6,2 ± 0,4	6,5 ± 0,6
max2	11,6 ± 3,4	11,2 ± 1,3	7,3 ± 0,8	7,7 ± 1,4
max3	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,3	4,1 ± 1,3	3,5 ± 0,3
max4	7,6 ± 2,4	7,3 ± 0,7	5,0 ± 0,9	5,3 ± 1,0
max5	11,5 ± 1,4	11,5 ± 0,6	9,9 ± 1,1	9,2 ± 1,0
max6	6,1 ± 0,9	6,4 ± 0,8	5,4 ± 0,7	5,3 ± 0,8
max7	24,3 ± 1,5	24,6 ± 0,7	28,5 ± 1,5	27,5 ± 1,0
max8	14,1 ± 3,1	13,6 ± 1,6	9,0 ± 1,2	9,9 ± 1,2
max9	4,8 ± 1,6	4,8 ± 0,5	5,2 ± 0,8	5,6 ± 1,7
max10	4,8 ± 0,9	5,2 ± 0,5	8,3 ± 0,6	8,4 ± 1,2
max11	6,6 ± 1,2	6,7 ± 0,6	11,0 ± 1,1	11,1 ± 1,1

Da bi se ispitao uticaj starosti žena na profil N-glikana iz njihovih placenti, za međusobno poređenje su uzimani podaci dobijeni za žene iz dve različite starosne grupe (mlađa i starija grupa), vodeći računa da budu iste gestacijske starosti. Dakle, statistički su obrađena dva seta podataka: 1) PPTm naspram PPTs i 2) PTTm naspram PTTs. Između podataka nije nađena statistički značajna razlika, odnosno starosna dob žena ne utiče na kvalitativnu ili kvantitativnu promenu zastupljenosti N-glikana vezanih za membranske proteine humane placente. Uticaj gestacijske starosti je posebno ispitan i biće opisan u Odeljku 4.1.2.

Za razliku od ćelijske membrane, brojni su literaturni podaci koji opisuju promene u serumskom N-glikomu pod uticajem različitih faktora (Knežević i sar., 2009; Knežević i sar., 2010). Iz studija serumskog N-glikoma, urađenih na značajnom broju uzoraka (blizu 2000), može se zaključiti da on počinje da se menja tek u srednjim godinama (Knežević i sar., 2010). Analiza serumskog N-glikoma ispitanika starosti do

68 godina pokazala je da se sadržaj biantenarnih N-glikana (fukozilovanih, agalakto-, digalakto- i disijalo-) menja sa godinama, i to značajnije kod žena nego kod muškaraca (Knežević i sar., 2010). Koristeći DSA-FACE profile serumskih N-glikana, utvrđeno je da se kod ljudi starijih od 50 godina povećava sadržaj NGA2F i NGA2FB glikana, i smanjuje sadržaj NA2F glikana (Vanhooren i sar., 2007; Vanhooren i sar., 2010).

Ako se uporede DSA-FACE profili N-glikana iz seruma (Vanhooren i sar., 2007) i iz humane placente (Robajac i sar., 2014), redosled zastupljenosti N-glikana iz seruma je: NA2>NA2F>NGA2F, a iz placente: NA2F>NA2FB. Mašinerija za N-glikozilaciju jeste ista u svim ćelijama, ali nije ista ekspresija gliko-gena, niti je ista aktivnost glikozil-transferaza (Odeljak 2.3.2.2.), što može biti uzrok razlika. Drugim rečima, sasvim je moguća tkivna specifičnost N-glikozilacije. U ćeliji se mogu vezati različiti N-glikani za proteine koji će biti sekretovani (takvi su serumski proteini) i za membranske proteine, koji će služiti (između ostalog) za međućelijske interakcije. Pored toga, u ovoj tezi je sakupljen relativno mali broj uzoraka (190 placenti raspoređeno u 44 uzorka solubilizata). Važno je podsetiti se da je sakupljanje placenti ograničeno još i reproduktivnim razdobljem žene. Tako su placentе korišćene u ovoj tezi dobijene od žena starosti do 45 godina (samo je jedna imala 47 godina), što je ispod starosne granice ljudi kod kojih su uočene promene u glikozilaciji serumskih glikoproteina.

Rezultati predstavljeni u ovoj tezi, dakle, ukazuju da starost žena nije bila od uticaja na N-glikanski profil solubilizovanih desijalinizovanih membranskih proteina iz humane placente.

4.1.1.2. Lektinski blot N-glikozilovanih membranskih proteina iz humane placente

Lektini su široko zastupljeni među tehnikama ispitivanja glikanskih struktura. Lektinska histohemija, odnosno bojenje ćelija i tkiva rastvorima obeleženih lektina (fluorescentno ili biotinom) daje informacije o prisustvu i raspodeli specifičnih glikana na površini ćelije, ali i u citoplazmi (Sgambati i sar., 2007; Jones i Aplin, 2009; Marini i sar., 2011; Aplin i Jones, 2012). Za razliku od lektinske histohemije, lektinski blot može dati informacije o opsegu molekulskih masa glikoproteina, nosilaca glikana za koje se

vezuju obeleženi lektini. Lektinska afinitetna hromatografija će biti detaljno opisana u odeljku 4.2.

Već smo u prethodnom odeljku napomenuli da je osnovni nedostatak DSA-FACE metode to što su informacije o sijalinizovanim N-glikanima izgubljene. Ipak, podatak o relativnoj zastupljenosti sijalo N-glikana je izuzetno bitan. Naime, brojni autori upućuju na promene upravo u sadržaju terminalne Sia na lancima N-glikana glikoproteina, koje nastaju kao posledica mnogih patofizioloških stanja kao što su: starenje (Knežević i sar., 2010; Mehdi i sar., 2012), tumorigeneza (Büll i sar., 2014), životni stil (Knežević i sar., 2010). U ovoj tezi je prisustvo sijalo N-glikana na glikoproteinima iz membrana placenti ispitivano lektinskim blotom, lektinima koji specifično prepoznaju ostatke Sia. Pored toga, svi uzorci koji su analizirani sa DSA-FACE, analizirani su i pomoću širokog spektra lektina različitih saharidnih specifičnosti (Tabela 1, Odeljak 2.4.1.) u lektinskom blotu.

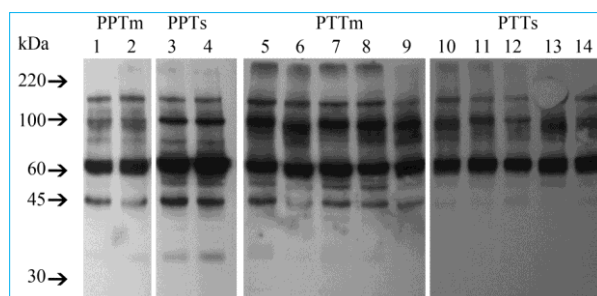
Membranski (gliko)proteini iz uzoraka solubilizata razdvojeni pomoću SDS-PAGE preneti su na nitroceluloznu membranu, koja je potom inkubirana sa odgovarajućim lektinom, kovalentno vezanim za biotin (detaljniji opis dat je u Odeljku 3.14.). Glikoproteini sa vezanim biotinilovanim lektinom na nitroceluloznoj membrani se vizualizuju vezivanjem HRP-avidina D. Intenzitet lektin-reaktivne glikoproteinske trake je srazmeran zastupljenosti detektovanog glikana u tom glikoproteinu. Denzitometrijska analiza glikoproteinskih traka omogućila je poređenje njihovih intenziteta u ispitivanim uzorcima. Naime, denzitometrijska analiza omogućava da se zatamnjenje traka numerički izrazi u vidu arbitrarnih denzitometrijskih jedinica (ADU).

Važno je naglasiti da su u ovom radu isti uzorci solubilizata membrana placenti analizirani i DSA-FACE metodom i lektinskim blotom (Odeljak 4.1.1.). Priprema uzorka za DSA-FACE je uključivala korak uklanjanja N-glikana sa glikoproteina i obeležavanje oslobođenih N-glikana, pre nego što su razdvajani kapilarnom elektroforezom. Pri lektinskom blotu razdvajaju se glikoproteini elektroforezom, prenose na membranu i detektuju obeleženim lektinima. Prvo je na uzorcima rađena DSA-FACE analiza, a zatim su, na osnovu struktura najzastupljenijih N-glikana u uzorcima, za lektinski blot odabrani lektini čija se saharidna specifičnost ili selektivnost podudara sa saharidnim ostacima detektovanim na N-glikanima putem DSA-FACE.

Detaljna specifičnost lektina prikazana je u Tabeli 1 (Odeljak 2.4.1.). Lektini korišćeni u blotovima su: LCA, PHA-E, PHA-L, SNA i MAL-II.

Da bi se ispitao uticaj starosnog doba na membranski N-glikom, ADU vrednosti dobijene denzitometrijskom analizom traka sa lektinskih blotova su podvrgnute statističkoj obradi. Poređene su po dve grupe uzoraka placenti žena iste gestacijske starosti, ali različite starosne grupe, to jest uzorci PPTm sa uzorcima PPTs, odnosno uzorci PTTm sa uzorcima PTTs.

Prema rezultatima dobijenim pomoću DSA-FACE jezgarna L-Fuc je bila prisutna u skoro svim N-glikanima oslobođenim sa membranskih glikoproteina iz placenti (Tabela 3), zbog čega je proveravano njeno prisustvo i određivan sadržaj lektinskim blotom sa LCA. LCA se vezuje za Man iz trimanoznog jezgra biantenarnih N-glikana, ali do vezivanja značajnog afiniteta dolazi samo ako je u jezgru N-glikana prisutna α 1,6-vezana L-Fuc (Tabela1, Odeljak 2.4.1). LCA blotom su detektovani membranski glikoproteini iz humane placenti koji imaju biantenarne N-glikane sa L-Fuc u jezgru (Slika 17).

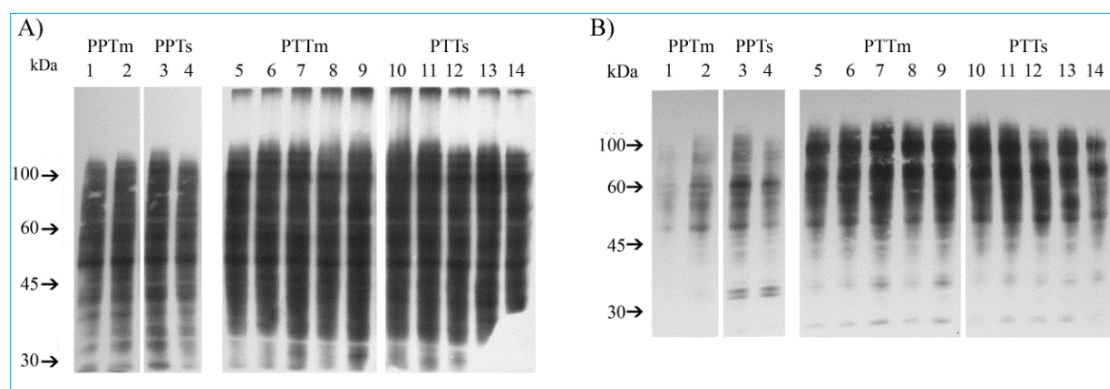


Slika 17. Lektinski blot uzoraka solubilizata sa biotinilovanim LCA. PPTm, uzorci iz placenti prvog trimestra mladih žena; PPTs, uzorci iz placenti prvog trimestra starijih žena; PTTm, uzorci iz placenti trećeg trimestra mladih žena; PTTs, uzorci iz placenti trećeg trimestra starijih žena. Markeri masa označeni su strelicama sa strane.

LCA blotom je potvrđeno prisustvo biantenarnih N-glikana sa jezgarnom Fuc u svim ispitivanim uzorcima. Statističkom obradom podataka utvrđen je manji sadržaj LCA-reaktivnih glikoproteina u PPTm nego u PPTs uzorcima ($p < 0,01$). Znači da kod placenti prvog trimestra, uzorci iz mlađe starosne grupe imaju manje LCA-reaktivnih glikoproteina nego oni iz starije grupe. Nasuprot tome, kod placenti trećeg trimestra, uzorci iz mlađe starosne grupe imaju više LCA-reaktivnih glikoproteina nego oni iz

starije grupe ($p < 0,01$). Ako se podsetimo prethodnog odeljka, putem DSA-FACE nije nađeno da starost žena utiče na zastupljenost biantenarnih N-glikana sa jezgarnom Fuc (Odeljak 4.1.1.1.). Razlog ovom neslaganju treba tražiti u različitim principima dve metode.

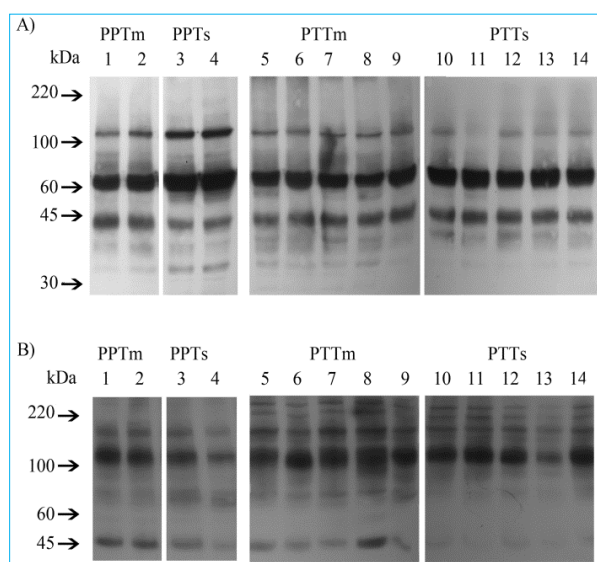
Poznato je da oba lektina iz pasulja, PHA-E i PHA-L, vezuju terminalne ostatke Gal i da su specifični za kompleksne N-glikane. Naime, PHA lektini će vezati ostatke Gal, koji se nalaze u okviru lanca N-glikana kompleksnog tipa ukoliko su oni sterno dostupni. PHA-E vezuje biantenarne N-glikane sa umetnutim GlcNAc (NA2B) i gotovo uopšte ne vezuje triantenarne i tetraantenarne N-glikane. PHA-L vezuje pretežno multiantenarne N-glikane (NA3 i NA4), a ne vezuje glikane koji imaju umetnuti GlcNAc (Tabela 1, Odeljak 2.4.1.). Prisustvo Sia, vezane za Gal na krajevima lanaca N-glikana, ometa vezivanje PHA lektina za Gal (Green i Baenziger, 1987). Stoga su alikvoti solubilizata korišćeni za PHA-E i PHA-L lektinski blot podvrgnuti hemijskoj desijalinizaciji (Odeljak 3.14.). Reprezentativni lektinski blotovi sa PHA-E i PHA-L prikazani su na Slici 18. Prisustvo biantenarnog N-glikana sa umetnutim ostatkom GlcNAc, koji je detektovan u DSA-FACE (NA2FB, Tabela 3), je potvrđeno PHA-E blotom u svim ispitivanim uzorcima solubilizata (Slika 18A). PHA-L blotom je potvrđeno i prisustvo multiantenarnih N-glikana (Slika 18B), koji su detektovani kao maksimumi 9, 10 i 11 na DSA-FACE profilu (NA3Fb, NA3F, NA4Fb, Tabela 3).



Slika 18. Lektinski blot uzoraka solubilizata sa biotinilovanim A) PHA-E i B) PHA-L. PPTm, uzorci iz placenti prvog trimestra mlađih žena; PPTs, uzorci iz placenti prvog trimestra starijih žena; PTTm, uzorci iz placenti trećeg trimestra mlađih žena; PTTs, uzorci iz placenti trećeg trimestra starijih žena. Marker masa označeni su strelicama sa strane.

Statističkom analizom denzitometrijskih podataka dobijenih iz PHA-E i PHA-L blotova nisu uočene razlike između uzoraka iz placenta mlađih i starijih žena, ni za jednu gestacijsku grupu (prvi i treći trimestar). Ovaj rezultat je potvrdio rezultate DSA-FACE analize, gde je takođe utvrđeno da starost žena ne utiče na zastupljenost nijednog pojedinačnog N-glikana.

Priprema uzoraka N-glikana za DSA-FACE podrazumeva njihovu desijalinizaciju (Odeljak 3.15), pa se procena sadržaja Sia u ispitivanim uzorcima mora raditi drugom metodom. U ovom radu je prisustvo i zastupljenost sijalo-glikoproteina u placenti ispitivano lektinskim blotom. Sia se nalazi uvek na kraju lanca N-glikana, i najčešće je vezana $\alpha 2,6$ - ili $\alpha 2,3$ -glikozidnom vezom (Odeljak 2.3.2.1.). Za blot su odabrana dva lektina specifična za Sia: SNA, koji je specifičan za $\alpha 2,6$ -Sia i MAL-II, koji je specifičan za $\alpha 2,3$ -Sia (Tabela 1, Odeljak 2.4.1.). Reprezentativni lektinski blotovi sa MAL-II (A) i SNA (B) su prikazani na Slici 19.



Slika 19. Lektinski blot uzoraka solubilizata sa biotinilovanim A) MAL-II i B) SNA. PPTm, uzorci iz placenta prvog trimestra mlađih žena; PPTs, uzorci iz placenta prvog trimestra starijih žena; PPTm, uzorci iz placenta trećeg trimestra mlađih žena; PPTs, uzorci iz placenta trećeg trimestra starijih žena. Markeri masa označeni su strelicama sa strane.

MAL-II blotovima (Slika 19A) je ukazano na prisustvo membranskih glikoproteina, čiji se N-glikani završavaju $\alpha 2,3$ -vezanom Sia. Statistička analiza MAL-

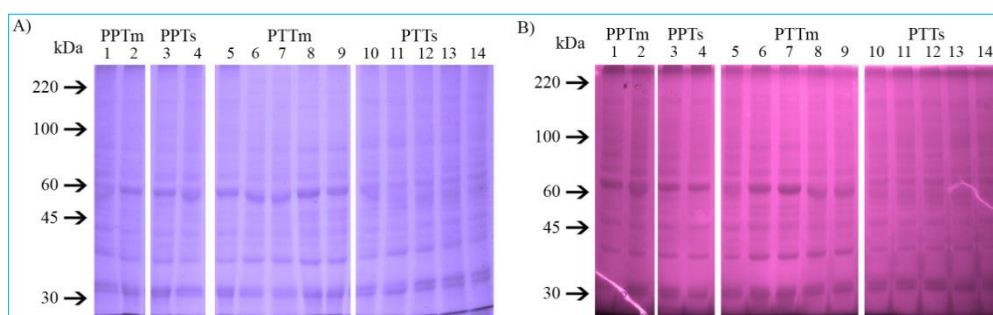
II-reaktivnih glikoproteinskih traka upućuje na veći sadržaj α 2,3-vezane Sia u PPTs, nego u PPTm uzorcima ($p < 0,01$). Nasuprot tome, PTTs i PPTm uzorci se nisu razlikovali po svom sadržaju α 2,3-Sia. To znači da starost žena ne utiče na stepen α 2,3-sijalinizacije glikoproteina u placentama trećeg trimestra, dok u prvom trimestru gestacije postoji korelacija između starosti žena i sadržaja α 2,3-sijalo-glikoproteina u njihovim placentama.

Uzorci PPT su imali sličan sadržaj SNA-reaktivnih glikoproteina, bez obzira na starost žena (Slika 19B), dok je nešto veći sadržaj α 2,6-sijalo-glikoproteina nađen u PPTm uzorcima u odnosu na PTTs uzorke ($p < 0,05$). Za definitivne zaključke o uticaju starosti žena na stepen α 2,6-sijalinizacije njihovih membranskih proteina iz placente trebalo bi eksperiment uraditi sa većim brojem uzoraka.

Rezultati lektinskog blota, dakle, potvrdili su prisustvo i terminalne α 2,3-Sia i terminalne α 2,6-Sia na membranskim glikoproteinima iz humane placente. Poznato je da humana placenta sadrži enzime ST koji mogu dodati Sia na Gal iz sekvence Gal β 1,4GlcNAc u položaju α 2,6- (ST6) i α 2,3- (ST3) (Odeljak 2.3.2.1.). Pokazano je da je placentna ST3 zastupljenija u odnosu na ST6 (Van den Eijnden and Schiphorst, 1981). Dva proteina iz humane placente, enzim β -glukocerebrozidaza (Takasaki i sar., 1984) i membranski protein - transferinski receptor sadrže gotovo isključivo α 2,3-vezanu Sia (Orberger i sar., 1992). Neki autori su čak predložili da je α 2,3-Sia opšta odlika svih glikoproteina iz humane placente. Međutim, placentni membranski protein α 5 β 1 integrin može sadržati i α 2,3- i α 2,6-vezanu Sia, pri čemu samo 20% molekula nosi α 2,6-Sia (jedan isti molekul proteina ne može istovremeno sadržavati i α 2,3- i α 2,6-vezanu Sia). I na kraju, α 2,6-Sia se može naći samo na krajevima biantenarnih lanaca (Nakagawa i sar., 1996). Sve je više autora koji sugerišu da postoji povezanost nivoa Sia na serumskim glikoproteinima i hronične inflamacije (engl. *inflammaging*), ali i starenja (Dall'Olio i sar., 2013). Interesantno bi bilo ispitati da li je to slučaj i sa membranskim glikoproteinima, odnosno da li se sa starenjem menja stepen sijalinizacije pojedinačnih membranskih proteina (kao što su receptori i jonski kanali). Ovakavo istraživanje je teško izvesti, zbog zahteva za uzorcima zdravih tkiva. Rezultati o sadržaju sijalo-glikoproteina u uzorcima iz humane placente, koji su dobijeni pomoću MAL-II i SNA blota i predstavljeni u ovoj tezi, imaju preliminarni značaj, zbog malog broja uzoraka.

4.1.1.2.1. Provera lektinske specifičnosti

Lektinski blot je spora metoda, a drugi nedostatak je što se mogu porediti samo intenziteti traka iz uzoraka sa istog gela, čime se ograničava broj uzoraka koji se mogu međusobno porediti (do 30). Na kraju, uvek postoji mogućnost nespecifičnog vezivanja lektina i za druge proteine prisutne u uzorku. Zbog toga su svi lektinski blotovi urađeni u ovom radu rigorozno proveravani. U tom cilju, izvedeno je nekoliko različito dizajniranih eksperimenata. Poređenje sadržaja pojedinih tipova N-glikana među uzorcima bilo je izvedeno posredno, poređenjem intenziteta njihovih glikoproteinskih traka nakon vezivanja biotinilovanih lektina. Da bi ovakvo poređenje između uzoraka bilo pouzdano, neophodno je da svi uzorci imaju identičnu koncentraciju proteina prilikom nanošenja na SDS-PAGE. Zato su gelovi bojeni CBB bojom nakon svake elektroforeze (Chevalier, 2010). Dodatno, gelovi su bojeni i Schiff-ovim reagensom, koji specifično boji samo glikoproteine (Roth i sar., 2012). Duplikati uzoraka solubilizata, koji su analizirani lektinskim blotovima, dakle, razdvojeni su na SDS-PAGE, po dva gela u paru, koji su onda nezavisno bojeni, jedan gel CBB bojom, a drugi gel Schiff-ovim reagensom (kao što je opisano u Odeljcima 3.11. i 3.12.). Primeri tipičnih obojenih gelova prikazani su na Slici 20.



Slika 20. Bojenje membranskih proteina A) CBB bojom i B) Schiff-ovim reagensom. PPTm, uzorci iz placenti prvog trimestra mlađih žena; PPTs, uzorci iz placenti prvog trimestra starijih žena; PTTm, uzorci iz placenti trećeg trimestra mlađih žena; PTTs, uzorci iz placenti trećeg trimestra starijih žena. Marker masa označeni su strelicama sa strane.

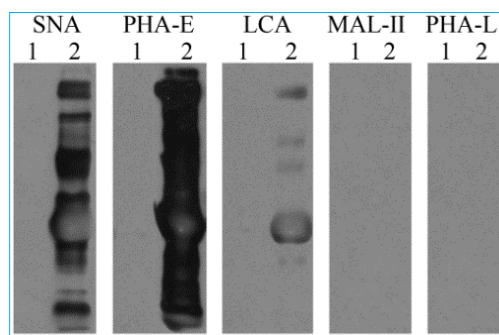
Svi gelovi su podvrgnuti denzitometrijskoj analizi posle bojenja, a dobijeni podaci

potom i statističkoj obradi, koja je pokazala da nema značajnih razlika u sadržaju detektovanih proteina (Slika 20A) i glikoproteina (Slika 20B) između ispitivanih uzoraka. To znači da je sadržaj (gliko)proteina (bar onih najzastupljenijih, koji se uočavaju na gelovima) sličan u svim ispitivanim uzorcima. To bi dalje značilo da su razlike u zastupljenosti pojedinih N-glikoproteina između uzoraka, utvrđene lektinskim blotom, pouzdane, odnosno da nisu posledica različitih koncentracija glikoproteina u uzorcima.

Iako se **lektini** već decenijama koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu glikana, često se u pitanje dovodi njihova **specifičnost i selektivnost**. Pojedini lektini prepoznaju dva ili više specifičnih saharida, a apsolutna specifičnost lektina se retko sreće. Postoje čak i literaturni podaci o tome da lektini mogu vezivati i nesaharidne komponente biomolekula, kao što su kratke sekvence aminokiselina koje prepoznaje Con A (Jain i sar., 2000). Zbog toga je potrebno imati i negativne i pozitivne kontrole za vezivanje lektina. Kao negativna kontrola za sve lektine, u ovoj tezi je korišćen protein za koji se pouzdano zna da ne nosi nijedan ostatak šećera, a to je BSA. Kao negativna kontrola može poslužiti i glikoprotein čiji su N-glikanski lanci dobro proučeni i poznati (npr. IgG), ali samo za one lektine koji ne prepoznaju saharide sa ovih N-glikana. Na kraju su potrebne i pozitivne kontrole za sve lektine, a to su glikoproteini čiji su N-glikani poznati (i sadrže specifične saharide), da bi se potvrdilo da primenjeni lektini zaista prepoznaju određene N-glikane.

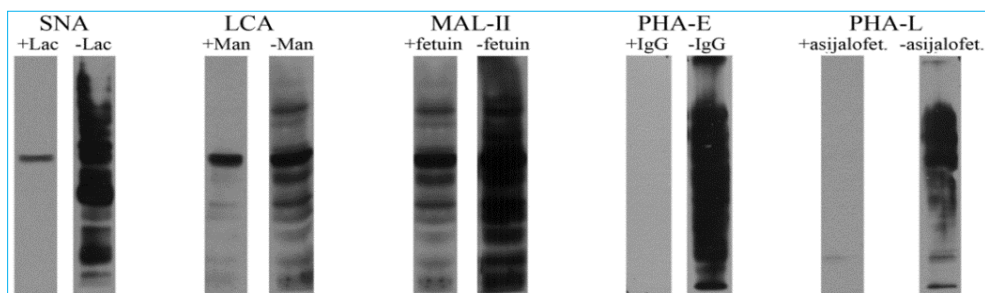
IgG je glikozilovan na Fc fragmentu, a njegovi lanci su uglavnom biantenarni N-glikani, sa ili bez L-Fuc u jezgru, sa ili bez umetnutog GlcNAc i mnogi se završavaju ostacima α 2,6-Sia (NGA2, NGA2F, NA2F, NA2B, NA2FB, A2F, A2B, i drugi). IgG ne sadrži multiantenarne N-glikane (Huhn i sar., 2009; Stadlmann i sar., 2009; Pučić i sar., 2011). Dakle, IgG je služio kao pozitivna kontrola za SNA (jer ima α 2,6-Sia), PHA-E (jer ima NA2B i NA2FB) i LCA (jer ima NGA2F, NA2F i A2F). IgG je korišćen i kao dodatna negativna proba za MAL-II i PHA-L lektine, jer nema α 2,3-Sia i multiantenarne glikane. Rezultati su prikazani na Slici 21, na kojoj se može uočiti potpuni izostanak glikoproteinskih signala na traci broj 1 na svim blotovima. Nijedan od ispitivanih lektina, dakle, ne daje signal sa BSA, što je i očekivano. Ovo dalje znači da, u uslovima našeg blota, nije postojalo nespecifično vezivanje lektina za nesaharidne komponente. IgG je dao signal u interakciji sa SNA, PHA-E i LCA, što je bilo

očekivano. Na ovaj način je potvrđena specifičnost pomenuta tri lektina. Nasuprot ovome, IgG nije dao signal sa MAL-II i PHA-L lektinima. To se i očekivalo, s obzirom da N-glikani sa IgG nemaju ni terminalnu α 2,3-Sia ni multiantenarne glikane, pa je na ovaj način proverena i selektivnost MAL-II (nije vezao α 2,6-Sia sa IgG) i PHA-L (nije vezao biantenarne lance sa IgG).



Slika 21. Provera specifičnosti biotinilovanih lektina u eksperimentima sa 1-BSA i 2-IgG.

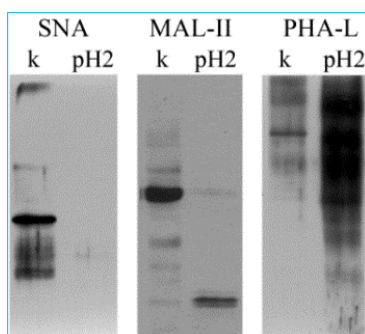
Specifičnost lektina je u ovom radu proveravana i putem inhibicije saharidima koje lektini specifično vezuju (Tabela 2). Tako je vezivanje SNA za glikoproteine iz uzoraka testirano u odsustvu i prisustvu Lac, dok je vezivanje LCA testirano sa Man. Takođe je testirana i inhibicija vezivanja nekih lektina za glikoproteine iz placente u prisustvu glikoproteina koji sadrže specifične N-glikane. U ovom slučaju dolazi do kompeticije između N-glikoproteina iz uzoraka i N-glikoproteina-inhibitora za vezivanje na lektine, koji su za te glikane specifični. Testirani su inhibitorski glikoproteini: fetuin, asijalofetuin i IgG. Fetuin sadrži triantenarne N-glikane koji se završavaju α 2,3-vezanom Sia, dok asijalofetuin nema Sia na krajevima svojih triantenarnih lanaca (Baenziger i Fiete, 1979). Upravo su zbog toga ova dva glikoproteina bila pogodna za kompetitivnu inhibiciju vezivanja MAL-II (fetuin) i PHA-L (asijalofetuin). IgG je korišćen kao kompetitivni inhibitor vezivanja PHA-E za N-glikoproteine iz placente. Rezultati blotova urađenih u odsustvu/prisustvu kompetitora su prikazani na Slici 22, sa koje se može videti da signali ili gotovo potpuno nestaju (SNA, PHA-E, PHA-L) ili im je intenzitet mnogo manji (LCA) u prisustvu inhibitorskog specifičnog saharida ili inhibitorskog glikoproteina.



Slika 22. Provera specifičnosti biotinilovanih lektina u testovima inhibicije vezivanja lektina specifičnim saharidima (Lac, Man) ili glikoproteinima (fetuin, IgG, asijalofetuin).

U slučaju MAL-II prisustvo fetuina je samo umanjilo intenzitet traka, a nije ih značajno inhibiralo. Tome može biti razlog nedovoljna inhibitorna koncentracija fetuina u inkubacionoj smeši sa uzorkom i MAL-II. Ovim eksperimentom potvrđeno je specifično vezivanje lektina za N-glikoproteine iz humane placente.

Iako su SNA i MAL-II lektini koji prepoznaju i vezuju ostatke Sia, ovaj saharid se ne koristi za inhibiciju vezivanja lektina, jer je skup, a Lac je efikasna kao inhibitor (www.vectorlabs.com), doduše u većoj koncentraciji (1,5 M). Kao dodatna kontrola specifičnosti Sia-vezujućih lektina (SNA i MAL-II), kao i PHA-L, hemijski desijalinizovani uzorci iz humane placente su podvrgnuti lektinskom blotu, što je prikazano na Slici 23.



Slika 23. Lektinski blot desijalinizovanih uzoraka. Provera specifičnosti biotinilovanih lektina (SNA, MAL-II i PHA-L) u eksperimentu sa hemijski desijalinizovanim glikoproteinima iz uzoraka: k, kontrolni (netretirani) uzorak; pH2, uzorak tretiran HCl.

Na Slici 23 se uočava da glikoproteinske trake sa vezanim lektinima izostaju ili im je smanjen intenzitet posle hemijske desijalinizacije. To znači da ako se terminalni Sia

ostatak ukloni sa N-glikoproteina (na pH 2), ne dolazi do vezivanja lektina specifičnih za Sia, što predstavlja direktni dokaz specifičnosti vezivanja SNA i MAL-II za ostatke Sia na placentnim N-glikoproteinima. Kao još jedna potvrda uspešnosti hemijske desijalinizacije, isti uzorci su analizirani i blotom sa PHA-L, što je takođe prikazano na Slici 23. Desijalinizovani uzorak (pH 2) je dao mnogo jači signal vezanog PHA-L od kontrolnog, sijalinizovanog uzorka, što je i očekivano s obzirom da je PHA-L Gal-vezujući lektin, čije vezivanje ometa terminalna Sia (Green i Baenziger, 1987). Ovim eksperimentom je, ujedno, i opravdana neophodnost desijalinizacije uzoraka placentnih glikoproteina, pre analize PHA lektinskim blotovima (Odeljak 3.14.).

Eksperimentima opisanim u ovom odeljku je, dakle, proverena specifičnost lektina koje smo koristili u lektinskim blotovima. Pokazano je da su se lektini LCA, PHA-E, PHA-L, SNA i MAL-II gotovo isključivo vezivali za saharidne ostatke na N-glikanima kovalentno vezanim za membranske glikoproteine iz humane placente.

4.1.2. Gestacijske promene

Placenta je tkivo koje podseća na tumorsko tkivo, po tome što veoma brzo raste i razvija se, što vrši invaziju u epitel uterusa, razara krvne sudove domaćina i uspostavlja svoj sopstveni krvotok kojim preuzima nutrijente od domaćina - u ovom slučaju majke, i što učestvuje u mehanizmima imunosupresije da ne bi došlo do odbacivanja (Murray i sar., 1999). Već je spomenuto da je izmenjena glikozilacija proteina redovna pojava kod tumorske ćelije (Glavey i sar., 2015). Kako gestacija napreduje i struktura i funkcija placente se znatno menjaju (Gude i sar., 2004), pa je zadatak proteina placente da se prilagode novim funkcijama. Najvažnije uloge u placentaciji su vezane za membrane ćelija, tačnije za membranske proteine: invazija trofoblasta, adhezija i migracija, transport kroz membranu i prenos signala rasta i proliferacije. Uzevši u obzir navedeno, radna hipoteza ove doktorske teze je bila da će tokom gestacije doći do promena u ekspresiji i/ili funkcionisanju membranskih proteina. Ove se promene očekuju na nivou N-glikozilacije membranskih proteina. Sledeći prethodno napisano, definisan je i jedan od najbitnijih ciljeva ove teze, a to je ispitivanje uticaja gestacijske starosti na N-glikom (to jest na profil N-glikana) membranskih proteina iz humane placente.

Uzorci solubilizata, koji su korišćeni za ispitivanje uticaja gestacijske starosti na

membranski N-glikom su isti uzorci koji su bili korišćeni za ispitivanje uticaja starosti žena (Odeljak 4.1.1.). Uzorci solubilizata placenti su podvrgnuti DSA-FACE analizi (Odeljak 4.1.2.1.), a potom i lektinskom blotu (Odeljak 4.1.2.2.), koji je služio za potvrdu rezultata dobijenih sa DSA-FACE.

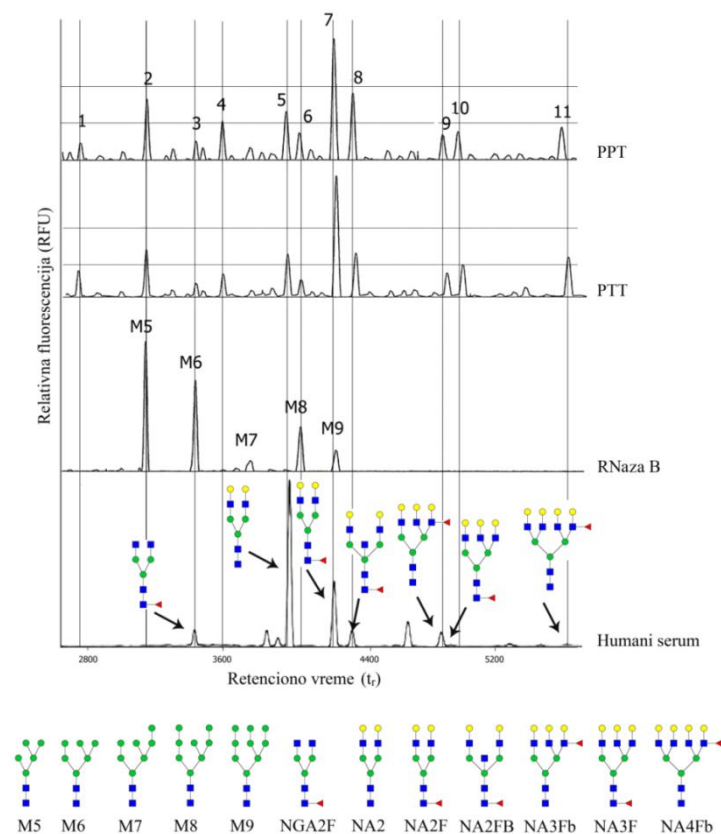
4.1.2.1. Uticaj gestacijske starosti na profile mebranskog N-glikoma, određene pomoću DSA-FACE

Da bi se ispitalo postoje li razlike u sadržaju najzastupljenijih N-glikana, koji su enzimskom hidrolizom odvojeni sa glikoproteina izolovanih iz membrana ćelija humane placentе, rezultati DSA-FACE analize uzoraka solubilizata (Odeljak 4.1.1.1.) su statistički obrađeni. Princip DSA-FACE analize, kao i podela uzoraka (n=44) u grupe prema starosti žena, kao i prema gestacijskoj starosti, detaljno je opisana u Odeljku 4.1.1. Kvalitativna analiza najzastupljenijih N-glikana (broj maksimuma na DSA-FACE profilima je jednak u svim uzorcima), kao i njihova kvantitativna analiza (poređenje relativnih intenziteta svih maksimuma N-glikana) pokazale su da starosna dob žena ne utiče na profile N-glikana analizirane pomoću DSA-FACE (Odeljak 4.1.1.1.). Zato su uzorci namenjeni statističkoj analizi uticaja gestacijske starosti na relativne intenzitete N-glikanskih maksimuma sa DSA-FACE profila (n=44) bili podeljeni u dve grupe:

1. solubilizati placenti prvog trimestra zdravih žena, PPT (n=14);
2. solubilizati placenti trećeg trimestra zdravih žena, PTT (n=30).

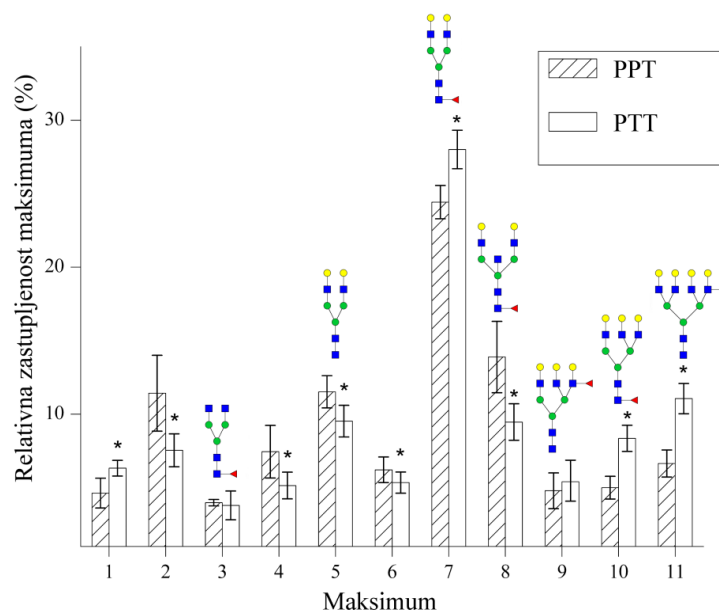
Dakle, urađena je DSA-FACE analiza 44 uzorka, a prikazani su samo reprezentativni elucioni profili uzoraka iz dve grupe placenti, PPT i PTT (Slika 24). Na slici 24 prikazani su i DSA-FACE profili RNaze B i kontrolnog seruma.

Na DSA-FACE profilima sa Slike 24 se uočava jedanaest glikanskih maksimuma. Kao što je već opisano (Odeljak 3.15.), površine ispod glikanskih maksimuma su integraljene, nakog čega je izračunat relativan intenzitet (fluorescencije) svakog pojedinačnog maksimuma. Dobijene vrednosti su podvrgnute statističkoj obradi. Rezultati poređenja dve grupe uzoraka različite gestacijske starosti su prikazani na Slici 25.



Slika 24. Tipični profili desijalinizovanih APTS-obeđenih N-glikana sa membranskih proteina poreklom iz placenti prvog (PPT) i trećeg trimestra (PTT), analiziran pomoću DSA-FACE. Na slici su prikazani i N-glikani iz RNaze B, kao i kontrolnog humanog seruma. Strukture N-glikana prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (videti i legendu ispod Slike 14).

Sa slike 25 se uočava da je ubedljivo najzastupljeniji N-glikan u obe grupe uzoraka NA2F, koji se eluira u max7. Interesatno je da je najzastupljeniji N-glikan na jednom humanom placentnom membranskom proteinu - $\alpha_5\beta_1$ integrinu di- α -2,3-sijalo-NA2F (Nakagawa i sar., 1996), koji predstavlja sijalinizovani oblik glikana eluiranog u max7. Drugi po zastupljenosti u uzorcima PPT je NA2FB iz max8. U uzorcima PTT, drugi po zastupljenosti je NA4Fb iz max11. Sa Slike 25 se takođe uočava da **postoje statistički značajne razlike u relativnom intenzitetu 9 od ukupno 11 maksimuma N-glikana**. Radi jednostavnosti, u daljem tekstu će relativni intenziteti maksimuma biti zamenjeni relativnom zastupljenošću odgovarajućih N-glikanskih struktura, koje se eluiraju u okviru tih maksimuma. Strukture N-glikana su pretpostavljene na osnovu elucionih vremena, kako je to detaljno opisano u Odeljku 4.1.1.1.



Slika 25. Relativna zastupljenost N-glikanskih maksimuma iz DSA-FACE profila uzoraka placenti prvog (PPT) i trećeg trimestra (PTT). Zvezdicom je označeno postojanje statistički značajne razlike PPT i PTT uzoraka ($p < 0,05$). Strukture glikana prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (videti i legendu ispod Slike 14).

U placentama trećeg trimestra ima više: $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ iz max1, NA2F iz max7, NA3F iz max10 i NA4Fb iz max11, što bi moglo ukazivati na gestacijsko povećanje sadržaja ovih N-glikana na membranskim glikoproteinima. U placentama trećeg trimestra ima manje: NGA2 iz max2, N-glikana iz max4 (njegova struktura nije mogla biti pretpostavljena, Odeljak 4.1.1.1.), NA2 iz max5, N-glikana iz max6 i NA2FB iz max8, što bi moglo ukazivati na gestacijsko smanjenje sadržaja ovih N-glikana na membranskim glikoproteinima. Sadržaj NGA2F iz max3 i NA3Fb iz max9 je sličan u obe grupe uzoraka, i izgleda da ostaje nepromenjen tokom gestacije. Statistička obrada rezultata profilisanja N-glikana iz uzoraka placenti različite gestacijske starosti, dakle, pokazuje da se tokom gestacije menja njihova zastupljenost na membranskim glikoproteinima.

Rezultati relativne zastupljenosti pojedinačnih N-glikana su kombinovani u cilju dobijanja dodatnih informacija o gestacijskim promenama u N-glikomu. Da bi se ispitalo da li je došlo do promena u ukupnom sadržaju N-glikana sa jezgarnom L-Fuc, sabrane su površine ispod onih maksimuma u kojima se eluiraju ti N-glikani, a to su:

max3 (NGA2F), max7 (NA2F), max8 (NA2FB) i max10 (NA3F) u PPT, odnosno PTT grupi, i dobijena vrednost je podeljena sa ukupnom površinom ispod svih maksimuma. Nađeno je da je ukupna zastupljenost N-glikana sa jezgarnom Fuc veća u PTT ($49,6 \pm 1,5\%$) nego u PPT uzorcima ($47,3 \pm 2,6\%$), $p < 0,01$, što ukazuje na gestacijski porast njihovog sadržaja. Među N-glikanima koji imaju jezgarnu Fuc nalazi se i jedan N-glikan koji, pored ovog ostatka, ima i umetnuti ostatak GlcNAc, a to je NA2FB iz max8, koji je veoma zastupljen. Ako se NA2FB izuzme iz prethodnog računa, zastupljenost N-glikana sa jezgarnom Fuc u PTT ($40,2 \pm 1,6\%$) je statistički značajno veća nego u PPT uzorcima ($33,4 \pm 1,8\%$), $p < 0,0001$, odnosno, gestacijsko povećanje sadržaja N-glikana sa jezgarnom Fuc je još izraženije. Ovo je posledica trenda promene zastupljenosti NA2FB tokom gestacije (pad), koji je suprotan trendu promene zastupljenosti fukozilovanih N-glikana (porast). Dobijenim rezultatima idu u prilog i retki literaturni podaci o N-glikozilaciji pojedinačnih proteina placente. Tako npr. više od 50% svih oligosaharida sa $\alpha_5\beta_1$ integrina iz humane placente sadrži jezgarnu Fuc (Nakagawa i sar., 1996). Većina N-glikana koji ulaze u sastav α -podjedinice hCG iz humane placente trećeg trimestra je takođe fukozilovana u jezgru (Nemansky i sar., 1998).

Zatim je ispitano da li je tokom gestacije došlo do promena u ukupnom sadržaju svih N-glikana koji nose ostatke L-Fuc. U tu svrhu je izračunata ukupna zastupljenost svih fukozilovanih N-glikana, odnosno zbir zastupljenosti onih koji nose jezgarnu L-Fuc (max3, max7, max8 i max10) i onih koji nose antenarnu L-Fuc (max9 i max11), u svim uzorcima placenti prvog i trećeg trimestra. Nađeno je da je veliki udeo (približno 60%) svih placentnih N-glikana fukozilovan (od čega 4/5 čini jezgarna fukozilacija). Ukupan sadržaj fukozilovanih N-glikana u uzorcima PTT ($66,1 \pm 1,7\%$) je značajno veći nego u PPT ($58,7 \pm 2,6\%$), sa $p < 0,0001$, ukazujući na trend gestacijskog povećanja ovih glikana.

I, na kraju, izračunata je ukupna zastupljenost multiantenarnih kompleksnih N-glikana, koji se eluiraju u okviru max9, max10 i max11, za sve uzorke PPT i PTT. Sa Slike 25 se može uočiti da je relativni intenzitet max10 i max11 značajno veći u PTT nego u PPT uzorcima. I intenzitet max9 je veći u PTT uzorcima, ali ova razlika nije statistički značajna. U max9, max10 i max11 eluiraju se N-glikani sa tri (NA3Fb, NA3F) i četiri antene (NA4Fb). Veći ukupan sadržaj multiantenarnih N-glikana nađen je u PTT ($24,8 \pm 1,8\%$) nego u PPT solubilizatima ($16,4 \pm 2,4\%$), $p < 0,0001$, što ukazuje

na gestacijski porast multiantenarnih N-glikana na glikoproteinima iz ćelijskih membrana placente.

Dakle, DSA-FACE analizom je utvrđeno da postoje značajne gestacijske razlike u zastupljenosti velikog broja N-glikana na membranskim glikoproteinima izolovanim iz humane placente. **Dobijeni rezultati jasno ukazuju na promene u N-glikomu placente tokom gestacije.** Ove promene uključuju: porast sadržaja N-glikana sa Fuc u jezgru, porast ukupnog stepena fukozilovanja N-glikana (fukozilovanje u jezgru + antenarno fukozilovanje), i porast sadržaja multiantenarnih kompleksnih N-glikana. Jedino što se smanjuje tokom gestacije je zastupljenost N-glikana sa umetnutim GlcNAc.

Studije gestacijskih promena glikozilacije placentalnih proteina su retke u literaturi. Pokazano je da je $\alpha_5\beta_1$ integrin iz citotrofoblastnih ćelja placente prvog trimestra drugačije glikozilovan od onog iz trećeg trimestra (Moss i sar., 1994). Gestacijsko povećanje fukozilacije u jezgru glikana placentalnog proteina α -hCG (glavni proteinski produkt placente) takođe je opisano u literaturi. Pred kraj trudnoće, gotovo 100% svih N-glikana na ovom proteinu je fukozilovano. Predloženi uzrok je promena ekspresije FUT8, koja katalizuje vezivanje Fuc u jezgro glikana (Odeljak 2.3.2.1.), i za koju autori smatraju da je gestacijski regulisana (Nemansky i sar., 1998). Fuc u jezgru N-glikana je obilno prisutna u humanoj placenti i smatra se da je ona od esencijalnog značaja za implantaciju i rast embriona (Aplin i Jones, 2012).

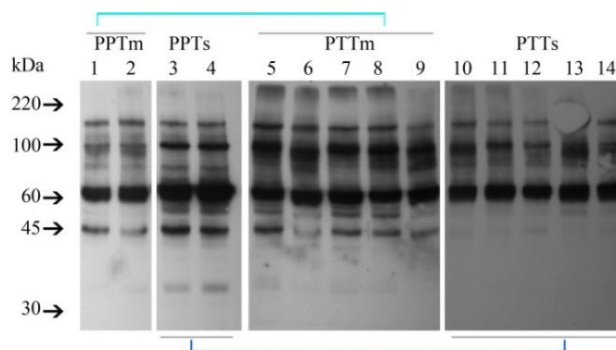
Povećanje zastupljenosti multiantenarnih N-glikana tokom gestacije primećeno je kod placentalnog hCG i njegove α podjedinice (Skarulis i sar., 1992). U literaturi je opisano i gestacijsko povećanje (u ovom slučaju između ranog i kasnog drugog trimestra) sadržaja triantenarnih N-glikana na α -hCG, koju autori objašnjavaju izmenjenom ekspresijom GnT-IV i GnT-V (Nemansky i sar., 1998). U literaturi postoje i drugačiji podaci. Tako su Tomiie i saradnici našli da je sadržaj multiantenarnih N-glikana u placenti, kao i sadržaj i enzimska aktivnost GnT-V (odgovoran za grananje N-glikana, Odeljak 2.3.2.1.), veći u prvom nego u trećem trimestru. U istoj studiji ustanovljen je nepromenjen nivo GnT-V mRNA tokom gestacije (Tomiie i sar., 2005). Ovi autori su sadržaj multiantenarnih N-glikana određivali PHA-L lektinskim blotom. Zhang i saradnici su pokazali da su, u placentama dobijenim iz planiranih prekida trudnoća, ekspresija i aktivnost GnT-V veći u 9. nego u 6. nedelji trudnoće, dok je GnT-

III pratila suprotan trend (Zhang i sar., 2015). Ista grupa je pokazala da je u placentama dobijenim usled spontanijih pobačaja ekspresija GnT-V bila manja, dok je ekspresija GnT-III bila veća nego u uzorcima iz kontrolne grupe placenti (planirani prekidi trudnoće). Trend promene ekspresije GnT-V i GnT-III pratio je odgovarajući trend promene zastupljenosti N-glikana koji su proizvod dejstva ovih enzima: β 1,6-GlcNAc-R i bis-GlcNAc-R (bis od engl. *bisecting*, umetnuti) (Zhang i sar., 2015). Razlike u dobijenim podacima o sadržaju pojedinih N-glikana u ovoj tezi i navedene dve grupe mogu biti i posledica različitih metoda određivanja N-glikana (DSA-FACE nasuprot lektinskom blotu), kao i razlike u načinu pripreme uzoraka iz tkiva placent. Tomiie i sar. su tkivo PPT dobili posle medicinski preporučenih abortusa, što bi moglo ukazati na postojanje izvesnih anomalija trudnoće, dok su Zhang i sar. tkiva dobili posle željenih prekida trudnoće, što navodi na zaključak da je bila reč o normalnim trudnoćama, što je bio slučaj i sa PPT uzorcima ispitivanim u ovoj tezi. Dalje, obe grupe su glikane određivale u tkivnim homogenatima bez ikakvog frakcionisanja, pa su oni sadržavali i membransku i citosolnu frakciju proteina, dok je u ovoj tezi izolovana samo membranska frakcija. Pored toga, uzorci za DSA-FACE i lektinski blot sa PHA-L su prvo desijalinizovani (Odeljci 3.14. i 3.15.), dok to nije bio slučaj sa uzorcima koje su analizirale pomenute dve grupe istraživača.

4.1.2.2. Lektinski blot N-glikozilovanih membranskih proteina iz humane placent. Uticaj gestacijske starosti na membranski N-glikom.

Kao što je detaljno objašnjeno u prethodnim odeljcima, lektinski blot je korišćen za potvrdu i dopunu rezultata dobijenih DSA-FACE profilisanjem N-glikana iz humane placent. Primeri lektinskih blotova uzoraka iz placenti različite gestacijske starosti (PPT i PTT uzoraka), koje su dobijene od žena različite starosne dobi (dve grupe: m i s) prikazani su na Slikama 26-29. Budući da su lektinskim blotom utvrđene izvesne razlike u zastupljenosti specifičnih N-glikana u uzorcima iz placenti žena različite starosti (Odeljak 4.1.1.2.), u istu grupu gestacijske starosti placenti nisu stavljani uzorci placenti žena iz dve različite starosne grupe. Kao i kod DSA-FACE, dakle, razmatrane su četiri grupe uzoraka. Poređene su denzitometrijske vrednosti glikoproteinskih traka iz

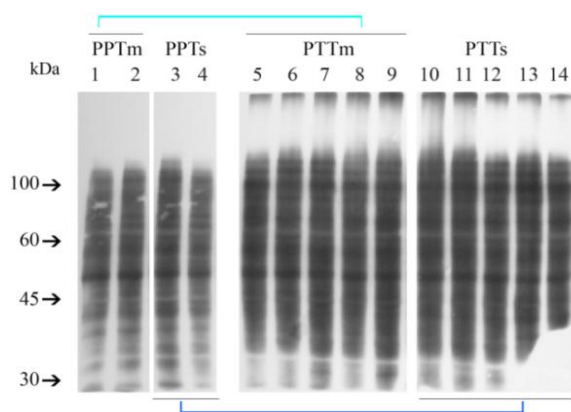
lektinskog blota između PPTm i PTTm, kao i između PPTs i PTTs. Reprezentativni LCA blot uzoraka solubilizata iz placenti prikazan je na Slici 26.



Slika 26. Lektinski blot uzoraka solubilizata sa biotinilovanim LCA. PPTm, uzorci iz placenti prvog trimestra mlađih žena; PPTs, uzorci iz placenti prvog trimestra starijih žena; PTTm, uzorci iz placenti trećeg trimestra mlađih žena; PTTs, uzorci iz placenti trećeg trimestra starijih žena. Markeri masa označeni su strelicama sa strane. Linijama u boji su označene grupe koje su međusobno statistički poređene.

Posle denzitometrijske obrade i statističke analize, uočeno je da su u mlađoj starosnoj grupi žena, placente trećeg trimestra imale značajno više LCA-reaktivnih glikoproteina nego placente prvog trimestra ($p < 0,05$). Nasuprot tome, u starijoj grupi, placente trećeg trimestra imale su značajno manje LCA-reaktivnih glikoproteina od placenti prvog trimestra ($p < 0,001$). Uzimajući u obzir predominantnu specifičnost LCA za biantenarne N-glikane koji imaju L-Fuc u jezgru (Tabela 1, Odeljak 2.4.1.), dobijeni rezultati ukazuju na veći sadržaj ovih N-glikana u PTT uzorcima, odnosno na njihov porast tokom gestacije. To važi samo za uzorke placenti dobijenih od žena mlađe starosne dobi, i potvrđuje rezultate dobijene pomoću DSA-FACE. LCA blot je, međutim, ukazao na gestacijsko smanjenje $\alpha 1,6$ -fukozilovanih N-glikana kod žena iz starije grupe. Nažalost, specifičnost LCA nije isključivo jezgarna Fuc, jer ovaj lektin u određenoj meri vezuje i biantenarne N-glikane bez Fuc, npr. NA2 (Debray i sar., 1981), dok prisustvo umetnutog GlcNAc na N-glikanu (NA2FB) ima blagi inhibitorni efekat na vezivanje za LCA (Tateno i sar., 2009), a NA2FB (max8) je drugi najzastupljeniji glikan u uzorcima PPT. Ovo bi moglo da utiče na različit trend gestacijskih promena u sadržaju LCA-reaktivnih glikana u PPT i u PTT uzorcima.

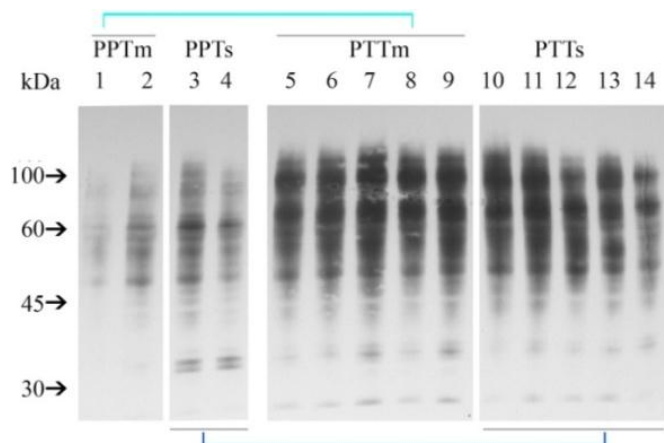
DSA-FACE rezultati ukazali su na veću zastupljenost N-glikana sa umetnutim GlcNAc (NA2FB) u PPT nego u PTT uzorcima (Odeljak 4.1.2.1.). N-glikani koji bi imali samo umetnuti GlcNAc, ali ne i Fuc u jezgru (NA2B) nisu detektovani na DSA-FACE profilima. Statistička analiza denzitometrijskih podataka iz PHA-E blota (PHA-E je lektin specifičan za biantenarne N-glikane sa umetnutim GlcNAc, Tabela 1, Odeljak 4.2.1.), sugerše da nema razlika u sadržaju N-glikana sa umetnutim GlcNAc između uzoraka placenti različite gestacijske starosti. Radi lakšeg praćenja rezultata PHA-E blot sa Slike 18A prikazan je i na Slici 27.



Slika 27. Lektinski blot uzoraka solubilizata sa biotiniловanim PHA-E. PPTm, uzorci iz placenti prvog trimestra mlađih žena; PPTs, uzorci iz placenti prvog trimestra starijih žena; PTTm, uzorci iz placenti trećeg trimestra mlađih žena; PTTs, uzorci iz placenti trećeg trimestra starijih žena. Markeri masa označeni su strelicama sa strane. Linijama u boji su označene grupe koje su međusobno statistički poređene.

Dakle, u slučaju N-glikana sa umetnutim ostatkom GlcNAc, lektinski blot sa PHA-E (nema razlika u sadržaju ovih glikana uslovljenih gestacijom) nije potvrdio rezultate sa DSA-FACE da tokom gestacije opada sadržaj ovih glikana. Sadržaj NA2FB kod PTT i PPT, određen sa DSA-FACE (Slika 25), je relativno nizak (10% i 15% redom). Stoga je moguće je da lektinski blot nije dovoljno osetljiv da prepozna tako male razlike u sadržaju ovog tipa N-glikana između PPT i PTT uzoraka.

DSA-FACE analizom je pokazano da se tokom gestacije povećava sadržaj multiantenarnih N-glikana (Odeljak 4.1.2.1.). Kao što je već rečeno, PHA-L prepoznaje i vezuje samo multiantenarne N-glikane (Tabela 1, Odeljak 2.4.1.). Lektinski blot sa PHA-L prikazan je na Slici 28.

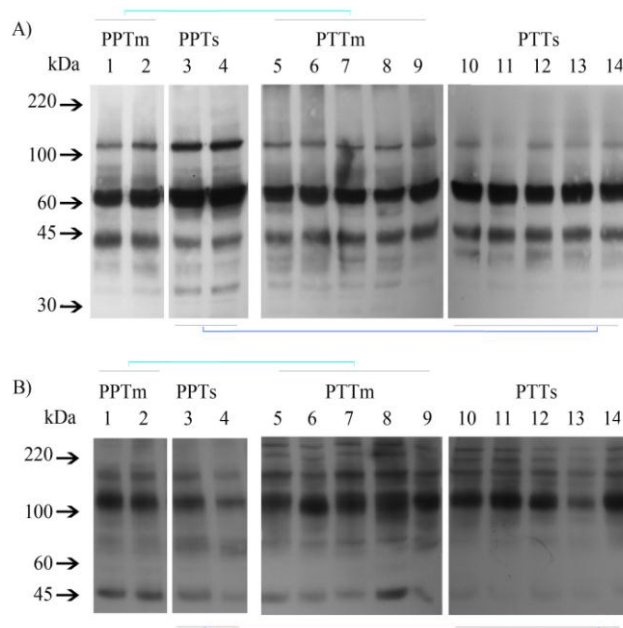


Slika 28. Lektinski blot uzoraka solubilizata sa biotinilovanim PHA-L. PPTm, uzorci iz placenti prvog trimestra mladih žena; PPTs, uzorci iz placenti prvog trimestra starijih žena; PTTm, uzorci iz placenti trećeg trimestra mladih žena; PTTs, uzorci iz placenti trećeg trimestra starijih žena. Marker masa označeni su strelicama sa strane. Linijama u boji su označene grupe za statističko poređenje.

Statističkom obradom denzitometrijskih podataka sa PHA-L blota, utvrđeno je da su u obe starosne grupe, glikoproteini iz PTT pokazali veću reaktivnost sa PHA-L nego oni iz PPT uzoraka ($p < 0,001$). Time je potvrđen nalaz DSA-FACE analize, koji je takođe upućivao na gestacijski porast zastupljenosti multiantenarnih N-glikana. Kod multiantenarnih N-glikana postoji podudaranje nalaza DSA-FACE i lektinskog blota, što nije bio slučaj sa N-glikanima sa umetnutim GlcNAc. PHA-L se smatra lektinom izuzetne selektivnosti, koji se široko koristi za procenu sadržaja multiantenarnih N-glikana u tkivima i ćelijama (Tomii i sar., 2005; Zhang i sar., 2015). Moguće je da je razlog ovome nedovoljna osetljivost lektinskog blota, koji detektuje razlike u sadržaju N-glikana samo ako su dovoljno velike. Lektini nisu apsolutno specifični (Tabela 1, Odeljak 2.4.1.) zbog čega mnogi autori kombinuju više lektina iste/slične specifičnosti kada žele da dobiju informacije o zastupljenosti pojedinih glikana samo lektinskim blotom, npr. za Fuc u jezgru koriste LCA, AAL i AOL (lektin iz *Aspergillus orizae*).

Zastupljenost Sia u N-glikanima PPT i PTT uzoraka je ispitana lektinskim blotom sa MAL-II i SNA. Reprezentativni lektinski blotovi prikazani su na Slici 29. Statistička analiza podataka dobijenih iz MAL-II blota (Slika 29A) je pokazala da u grupi uzoraka iz placenti mladih žena iz grupa PPT i PTT nije bilo razlike u vezivanju N-glikoproteina za MAL-II. Drugim rečima, kod mladih žena nisu detektovane

gestacijske promene u zastupljenosti α 2,3-sijalo-N-glikoproteina. Međutim, u grupi žena starije dobi primećeno je gestacijsko smanjenje sadržaja α 2,3-sijalo-N-glikoproteina ($p<0,01$).



Slika 29. Lektinski blot uzoraka solubilizata sa biotinilovanim A) MAL-II i B) SNA. PPTm, uzorci iz placenti prvog trimestra mladih žena; PPTs, uzorci iz placenti prvog trimestra starijih žena; PTTm, uzorci iz placenti trećeg trimestra mladih žena; PTTs, uzorci iz placenti trećeg trimestra starijih žena. Markeri masa označeni su strelicama sa strane. Linijama u boji su označene grupe za statističko poređenje.

Statističkom analizom podataka sa SNA blota (Slika 29B) nisu uočene razlike između uzoraka placenti različite gestacijske starosti, što ukazuje da tok gestacije nema uticaja na sadržaj α 2,6-sijalo-N-glikozilovanih membranskih proteina.

Rezultati prikazani u ovom odeljku jasno ukazuju na značajne promene zastupljenosti više tipova kompleksnih N-glikana membranskih proteina iz placente tokom gestacije. Ovi rezultati, koliko je nama poznato, su prvi rezultati te vrste u literaturi (Robajac i sar., 2014). Rezultati gestacijskih promena u N-glikomu membranskih proteina iz humane placente su sumirani u Tabeli 5.

Tabela 5. Uticaj gestacije na membranski N-glikom proteina humane placente dobijenih od žena različitog starosnog doba.

N-glikani sa...	Metoda	Mlada grupa (m)	Starija grupa (s)
Fuc u jezgru	DSA-FACE	raste	raste
	LCA blot	raste	opada
Fuc (jezgro + antenarna)	DSA-FACE	raste	raste
multiantenarni	DSA-FACE	raste	raste
	PHA-L blot	raste	raste
umetnutim GlcNAc	DSA-FACE	opada	opada
	PHA-E blot	ne menja se	ne menja se
α2,3-Sia	MAL-II blot	ne menja se	opada
α2,6-Sia	SNA blot	ne menja se	ne menja se

Razviće je izuzetno složen proces u kome se, radi potreba fetusa, sadržaj i ekspresija proteina menjaju tokom gestacije. Na ekspresiju i aktivnost glikozil-transferaza utiču epigenetski i faktori sredine, pa se razvojni stadijum ćelije, njena transformacija i starost odražavaju i na njen N-glikom (Dennis i sar., 1999). Pokazano je da se čak 25% gena različito eksprimira u placenti prvog i trećeg trimestra (Sitras i sar., 2012). Drugi trimestar trudnoće ključan je za praćenje promena, ali se placentu u tom periodu ne mogu nabaviti, zbog čega su ispitivane samo promene u placentama prvog i trećeg trimestra. Takođe, kada je reč o gestacijskim promenama i uticaju gestacije na sastav i sadržaj membranskog N-glikoma, najbolje bi bilo pratiti jednu trudnoću od početka do kraja. To znači imati tkivne uzorke iste placente od prvog do trećeg trimestra. Ipak, tako nešto nije lako izvodljivo, naročito kada je reč o humanim uzorcima. Ovako, samo velikim brojem uzoraka može se sugerisati da promena od uzoraka PPT ka uzorcima PTT odslikava gestacijske promene. Značaj rezultata iz ove teze je što su to prvi rezultati ove vrste, koji bi ukazivali da je N-glikozilacija proteina regulisana razvojnim stadijumom.

4.1.3. N-glikom u patološkim stanjima

Prethodno je istaknuto da membranski N-glikom jedva da je uopšte ispitivan i postojeće informacije su uglavnom u vezi sa promenama N-glikozilacije proteina kod kancera (Horvat i sar., 2012; Horvat i sar., 2013; Wang i sar., 2012; Liu i sar., 2013). O

promenama serumskog N-glikoma kod različitih vrsta kancera postoje brojni revijalni radovi (npr. Pinho i Reis, 2015). Imajući u vidu promene serumskog N-glikoma i u različitim patološkim stanjima, koja nisu kancer (Knežević i sar. 2010; Vandershaege i sar., 2013; Kam i sar., 2007), pretpostavljeno je da bi i neka patologija gestacije mogla stajati u vezi sa promenom N-glikanskog profila humanih placentalnih glikoproteina. Preeklampsija je odabrana zbog njene učestalosti (o čemu će biti govora u narednom odeljku), a dijabetes jer se, između ostalog, u novije vreme dovodi u vezu sa promenom u N-glikozilaciji proteina (Thanabalasingham i sar., 2013).

4.1.3.1. Uticaj preeklampsije i dijabetesa na profil N-glikana iz membranskih proteina humane placente, analiziran pomoću DSA-FACE

Hipertenzija je najčešća komplikacija u gestaciji, koja se javlja u 5-10% slučajeva. Preeklampsija (PE) je najzastupljeniji hipertenzivni poremećaj koji se javlja sa učestalošću 1:12 (ili u 8% trudnoća), i jedan je od najčešćih uzroka smrti majke i fetusa (Odeljak 2.2.3.). Prema podacima Nacionalnih instituta za zdravlje (engl. *National Institutes of Health*) poremećaji koji najčešće nastaju kao komplikacija PE, kao što su IUGR fetusa i HELLP sindrom (engl. *hemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet levels*, hemoliza eritrocita, povećana koncentracija enzima jetre i smanjenje broja trombocita) javljaju se u 10-15% slučajeva (za IUGR) i 0,1-0,2% slučajeva (za HELLP sindrom). Godišnje se kod 10 miliona trudnica detektuje PE. Od tog broja, čak 76 000 trudnoća završi se smrtnim ishodom majke, dok je broj preminulih novorođenčadi oko 500 000 (www.preeclampsia.org). Patofiziologija PE i dalje je nepoznata, i najverovatnije uključuje brojne faktore vezane za trudnice, placentu i fetus. Dijabetes (DM, lat. *diabetes mellitus*) je široko rasprostranjena bolest od koje, po podacima Svetske zdravstvene organizacije, boluje više od 300 miliona ljudi širom sveta. Po podacima iz 2012. godine, broj preminulih od dijabetesa iznosio je čak 1,5 miliona (www.who.int). Zbog toga svetska istraživačka zajednica finansira veliki broj projekata koji ispituju etiologiju i posledice dijabetesa.

Sgambati i saradnici (2007) su ispitivali ekspresiju glikokonjugata (glikoproteina i glikolipida) na tkivnim preparatima iz humane placente zdravih i dijabetičnih žena, metodom lektinske histohemije. Vezivanje obeleženih lektina za specifične glikanske

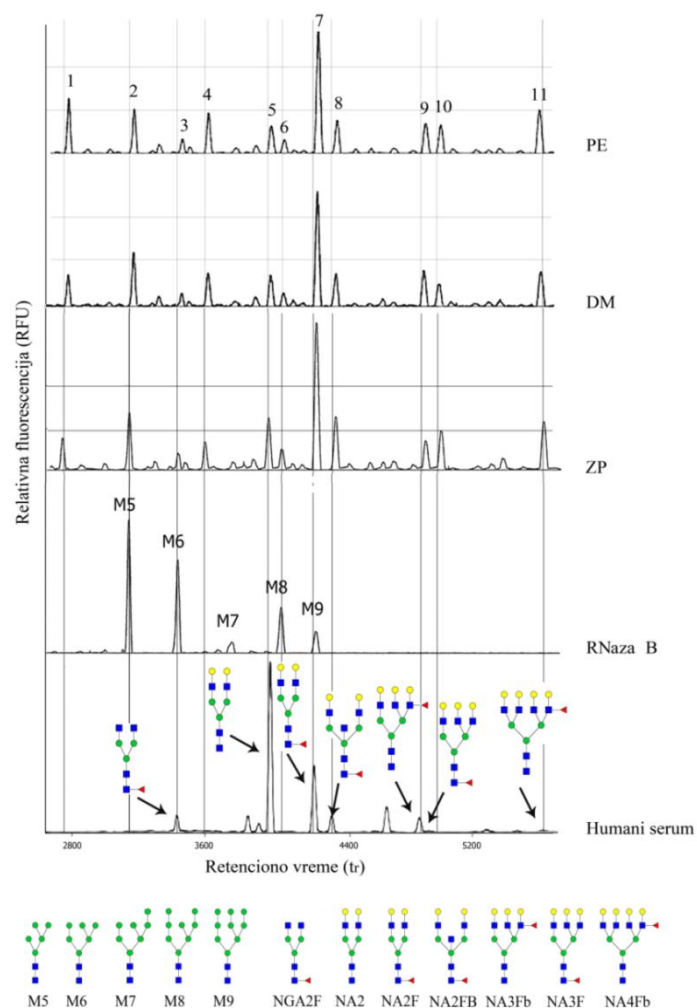
determinante na površini ćelija iz tkivnih preparata ne daje mnogo informacija o glikoproteinima-nosiocima tih glikana, osim gustine njihove distribucije na površini. Drugi nedostatak je oslanjanje na specifičnost lektina. Malobrojni su i literaturni podaci u kojima je ispitan uticaj dijabetesa na sadržaj oligosaharida vezanih na pojedinačnim glikoproteinima placentе (Lee i sar., 2011; Georgieff i sar., 1997).

U svetlu do sada napisanog, cilj je bio da se proverí da li kod PE (patologija trudnoće) i dijabetesa (patologija majke) ima promena na nivou N-glikozilacije membranskih proteina iz humane placentе. U ovom odeljku prikazani su DSA-FACE profili N-glikana hidrolizovanih sa membranskih glikoproteina iz humanih placenti, koje su dobijene iz trudnoća praćenih PE ili dijabetesom majki. Treba napomenuti da su sve placentе bile iz trećeg trimestra. Korišćeni su sledeći uzorci:

1. solubilizati izolovani iz placenti žena sa dijagnozom rane PE i IUGR fetusa (PE, n=14). Starost žena je bila 26-46 godina, prosečna starost 33 godine;
2. solubilizati izolovani iz placenti žena sa dijagnozom dijabetes (DM, n=6). Starost žena je bila 27-40 godina, prosečna starost 32 godine;
3. solubilizati izolovani iz placenti zdravih žena (kontrolni uzorci, ZP, n=30). Starost žena je bila 22-47 godina, prosečna starost 33 godine. Kontrolni uzorci su, dakle, bili uzorci placenti trećeg trimestra, na kojima su ispitivani uticaji starosti žena i gestacije na membranski N-glikom (Odeljci 4.1.1 i 4.1.2.).

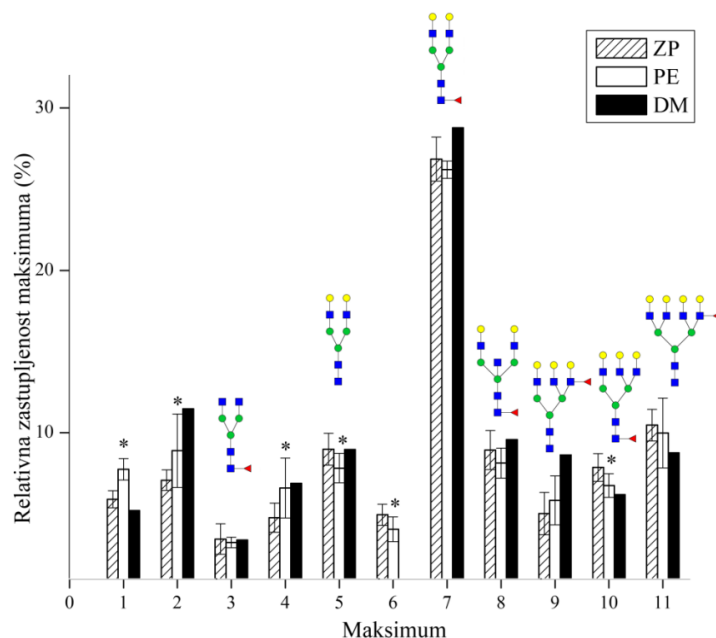
DSA-FACE metodom su profilisani N-glikani, nakon hidrolize membranskih glikoproteina dejstvom PNGase F (Odeljak 3.15.). Svi uzorci su ispitivani i lektinskim blotovima, u cilju potvrde rezultata dobijenih DSA-FACE metodom, kao i radi dobijanja informacija o sadržaju sijalo-N-glikoproteina (Odeljak 4.1.3.2.). DSA-FACE analiza rađena je u Laboratoriji u Gentu, u toku kratkog istraživačkog boravka od 6 nedelja, kada su izvedeni preliminarni eksperimenti sa placentama iz trudnoća komplikovanih patologijom PE i DM. S obzirom da nam DSA-FACE nije bila dostupna sve vreme izrade ove teze, broj uzoraka ovih placenti je bio mali (svega četiri sa PE, a DM samo jedna).

Tipični DSA-FACE profili N-glikana iz uzoraka iz tri grupe: ZP, PE i DM prikazani su na Slici 30, paralelno sa kontrolnim uzorcima N-glikana oslobođenih sa RNaze B i glikoproteina kontrolnog humanog seruma.



Slika 30. Profili N-glikana iz uzoraka placenti žena sa preeklampsijom (PE) i dijabetesom (DM), naspram uzoraka iz placenti zdravih žena (ZP), analizirani DSA-FACE metodom. Strukture N-glikana prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (videti i legendu ispod Slike 14).

Uočava se da je u svim uzorcima prisutno jedanaest maksimuma N-glikana jednakih vrednosti t_r . Drugim rečima, glikanski profili ne ukazuju na kvalitativne promene u N-glikomu membranskih proteina iz placenti poreklom iz patoloških trudnoća, u odnosu na uzorke iz placenti zdravih žena; iste N-glikanske strukture se pojavljuju u svim uzorcima. Strukture N-glikana iz PE i DM uzoraka su dodatno proveravane nakon tretmana α -L-fukozidazom, kao što je to urađeno i sa ZP uzorcima (Odeljak 4.1.1.1.). Dobijeni DSA-FACE profili su vrlo slični onima na Slici 16. Relativne zastupljenosti pojedinačnih N-glikana u ukupnoj masi N-glikana iz uzoraka PE, DM i ZP prikazane su na Slici 31.



Slika 31. Relativna zastupljenost N-glikana u profilima uzoraka iz placenti zdravih žena (ZP), žena sa preeklampsijom (PE) i žena sa dijabetesom (DM), koji su analizirani pomoću DSA-FACE. Zvezdicom je označeno postojanje statistički značajne razlike između PE i ZP uzoraka ($p < 0,05$). Strukture glikana prikazane su po uputstvu Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (videti i legendu ispod Slike 14).

S obzirom na to da je bio dostupan samo jedan uzorak placente od žene sa DM, razmatranja statističke značajnosti razlika N glikana u DM i ZP uzorcima nisu bila moguća. Zbog toga je upoređena zastupljenost pojedinačnih N-glikana iz DM sa zastupljenošću istih N-glikana iz ZP uzoraka (dobijenom kao srednja vrednost iz svih 30 uzoraka). Naravno, ovakvo poređenje je samo opisno i nema statistički značaj.

U svim uzorcima najzastupljeniji je max7, pretpostavljene strukture NA2F. Zastupljenost NA2F je veoma slična u uzorcima PE i ZP i iznosi 26,6% odnosno 27,2%. Max1, u okviru koga se, najverovatnije, nalaze paucimanozne strukture, je značajno veći u PE nego u ZP uzorcima. Max1 ima najmanji intenzitet u DM uzorku, kad se uporedi sa ZP i PE. Slično max1, i relativne zastupljenosti N-glikana iz max2 i max4 su veće u PE nego u ZP uzorcima. U okviru max2 se verovatno eluira NGA2, dok struktura koja odgovara max4 nije mogla biti identifikovana (Odeljak 4.1.1.1.). Interesantno je da su i max1, max2 i max4 veći u PE nego u ZP, što bi ukazivalo na veću zastupljenost N-glikana manjih molekularskih masa na membranskim proteinima iz

trudnoća komplikovanih PE. Naime, N-glikani koji se eluiraju pre max5 (NA2) su biantenarni i imaju kraće lance od NA2, što znači da im nedostaje jedan ili oba ostatka Gal (agalakto N-glikani, NGA2), a još su manji oni i bez GlcNAc, vezanog za Man u trimanoznom jezgru (max1). Razlog za ovo može biti povećana aktivnost glikozidaza kod PE (npr. fukozidaze, galaktozidaze, N-acetilglukozaminidaze) i/ili smanjena aktivnost glikozil-transferaza (npr. GalT i GnT). Postoje i maksimumi koji su manje zastupljeni u uzorcima PE u odnosu na ZP, kao što su: max5 (NA2), max6, max8 (NA2FB), max10 (NA3F) i max11 (NA4Fb), ali je statistički značajno samo smanjenje zastupljenosti max5, max6 i max 10. Dakle, zastupljenost većih, potpunije glikozilovanih N-glikana na membranskim proteinima iz trudnoća komplikovanih PE je manja. Ovaj rezultat se slaže sa prethodnim, odnosno sa povećanjem sadržaja nepotpuno glikozilovanih N-glikana. Poređenjem vrednosti relativnih intenziteta pojedinih maksimuma (posebno max2, max4, max6 i max11) pojedinačnih PE uzoraka uočena je velika varijabilnost. Kod uzoraka iz zdravih placenti varijabilnost između pojedinačnih uzoraka je bila mnogo manja.

Poređenjem zastupljenosti N-glikana iz ZP i onih iz uzoraka placenti od majki sa dijabetesom, uočeno je da su max2, max4, max7 i max9 veći u DM nego u ZP (max2 i max9 su izrazito veći), dok su max1, max10 i max11 manji u DM nego u ZP. Relativna zastupljenost glikana iz max6 uzorka DM nije mogla biti određena. Očigledno je da se u slučaju DM, ne mogu jednostavno izvesti zaključci o većoj zastupljenosti manjih ili većih N-glikana u odnosu na uzorke iz zdravih placenti.

Značajnost promena u relativnoj zastupljenosti svih N-glikana koji nose ostatke L-Fuc u jezgru kod uzoraka placenti iz patoloških trudnoća u odnosu na kontrolne ispitana je sabiranjem površina ispod max3, max7, max8 i max10. Pokazalo se da je sadržaj N-glikana sa jezgarnom Fuc u PE manji nego u ZP uzorcima ($44,0 \pm 10,4\%$ vs. $47,9 \pm 10,3\%$). Kada se iz računa izuzme N-glikanski maksimum koji sadrži umetnuti GlcNAc (max8), opet se dobija da je sadržaj N-glikana sa Fuc u jezgru u PE manji nego u ZP uzorcima ($36,2 \pm 12,5\%$ vs. $38,8 \pm 12,4\%$). Choi i sar. (2013) su pokazali da je ekspresija mikroRNA 198, koja deluje na nivou post-transkripcione regulacije *FUT8* gena, povećana kod PE. Na modelu miša pokazano je da mikroRNA 198 smanjuje ekspresiju *FUT8* (Wang i sar., 2014), što bi za posledicu moglo da ima manju ekspresiju enzima FUT8. Invazija i rast ćelija placente slični su razvoju tumora (Murray i sar.,

1999) dok je fukozilacija u jezgru N-glikana važna za proces implantacije (Odeljak 4.1.2.1.). Moguće je da povećana ekspresija mikroRNA 198 u placenti PE indirektno doprinosi smanjenju invazivne sposobnosti trofoblasta, što za posledicu ima plitku implantaciju.

Što se tiče ukupnog sadržaja fukozilovanih N-glikana (Fuc u jezgru + antenarna Fuc), sabirane su površine ispod max3, max7, max8, max9, max10 i max11. Uzorci PE imaju nešto manji ukupni sadržaj fukozilovanih N-glikana u odnosu na ZP ($60,2 \pm 7,6\%$ vs. $63,8 \pm 8,4\%$). Iako razlika nije statistički značajna, ona ukazuje na moguće smanjenje aktivnosti fukozil-transferaza u ćelijama placente kod PE.

Sadržaj razgranatih N-glikana (triantenarni + tetraantenarni N-glikani, površine ispod max9, max10 i max11) je nešto manji u uzorcima placenti iz PE trudnoća u odnosu na uzorke ZP ($22,5 \pm 2,3\%$ vs. $24,0 \pm 2,7\%$). Ipak, ni u ovom slučaju razlika nije statistički značajna.

U odnosu na kontrolne uzorke, DM uzorak je imao nešto veći sadržaj sledećih tipova N-glikana:

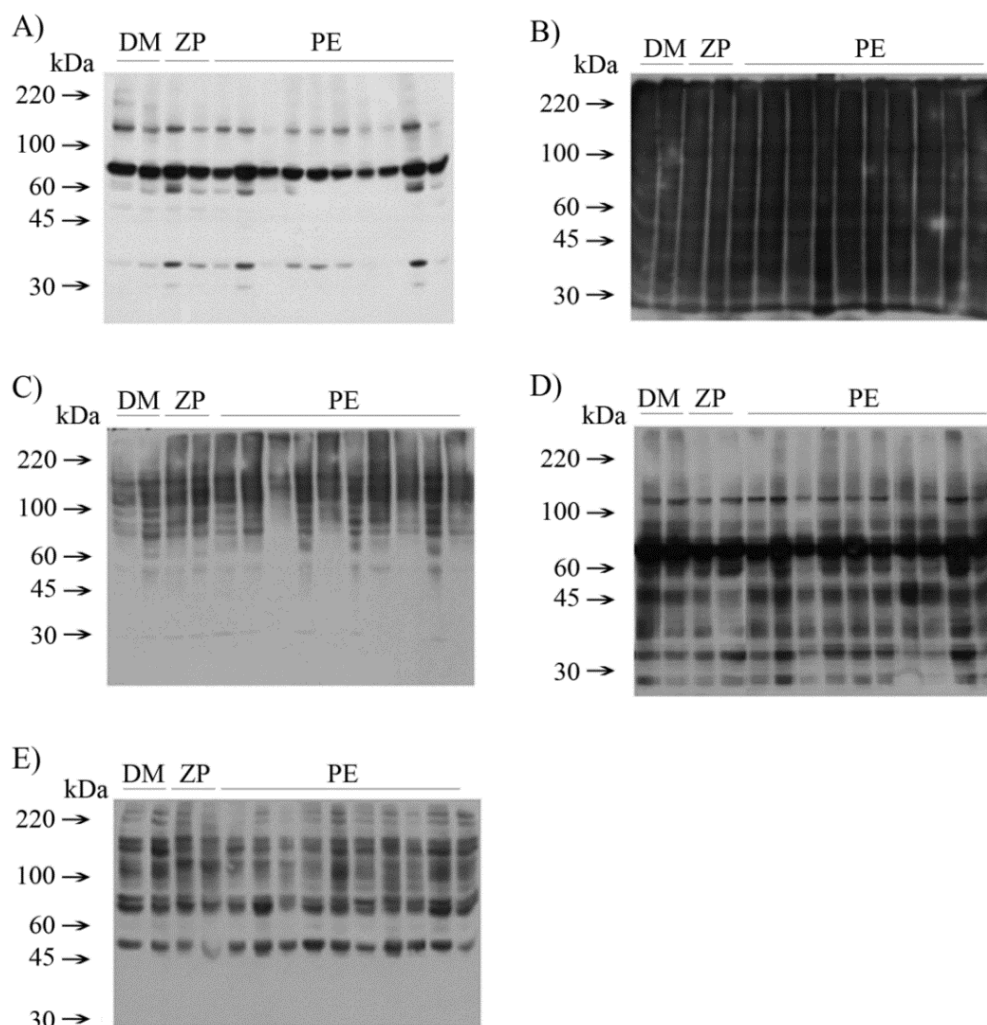
- i) N-glikana sa L-Fuc u jezgru ($48,8 \pm 11,5\%$ u DM vs. $44,0 \pm 10,4\%$ u ZP),
- ii) ukupnih fukozilovanih N-glikana (L-Fuc u jezgru + L-Fuc na antenama) ($66,6 \pm 9,0\%$ u DM vs. $60,2 \pm 7,6\%$ u ZP),
- iii) N-glikana sa L-Fuc u jezgru, bez umetnutog GlcNAc ($39,0 \pm 13,9\%$ u DM vs. $36,2 \pm 12,5\%$ u ZP),
- iv) multiantenarnih N-glikana ($24,2 \pm 1,5\%$ u DM vs. $22,5 \pm 2,3\%$ u ZP).

DSA-FACE analiza, mada je odrađena sa malim brojem uzoraka iz placenti žena sa patološkim trudnoćama, ukazuje na različit sadržaj specifičnih N-glikanskih struktura sa membranskih proteina poreklom iz placenti zdravih i patoloških trudnoća.

4.1.3.2. Membranski N-glikom u dijabetesu i preeklampsiji - analiza lektinskim blotom

Uzorci za lektinski blot su bili solubilizati placenti od majki sa DM, PE i zdravih majki (ZP) koji su prethodno analizirani pomoću DSA-FACE. Sve placente su bile iz trećeg trimestra gestacije. Lektinski blotovi su urađeni sa pet biotinom-obeležених lektina, različite saharidne specifičnosti: LCA (specifičan za biantenarne N-glikane sa

Fuc u jezgu), PHA-E (specifičan za biantenarne N-glikane sa umetnutim GlcNAc), PHA-L (specifičan za multiantenarne N-glikane), MAL-II (specifičan za terminalne α -2,3-Sia) i SNA (specifičan za terminalne α -2,6-Sia). Reprezentativni lektinski blotovi prikazani su na Slici 32.



Slika 32. Lektinski blotovi uzoraka solubilizata sa biotinilovanim lektinima: A) LCA, B) PHA-E, C) PHA-L, D) MAL-II i E) SNA. DM, uzorci iz placenti žena sa dijabetesom; ZP, uzorci iz placenti zdravih žena; PE, uzorci iz placenti žena sa preeklampsijom. Markeri masa označeni su strelicama sa strane.

Denzitometrijska analiza lektinskih blotova i poređenje dobijenih ADU vrednosti pokazala je da između uzoraka placenti iz patoloških trudnoća i kontrolnih uzoraka nema razlika u intenzitetima glikoproteinskih traka ni sa jednim od pet lektina.

Rezultati prikazani u ovom odeljku pokazuju da promene u N-glikozilaciji kod PE i DM postoje, ali samo na nivou pojedinačnih N-glikanskih struktura. Značajne promene na nivou tipova N-glikana (npr. glikana sa jezgarnom Fuc ili multiantenarnih N-glikana) nisu uočene. Prilikom razmatranja značaja ovih rezultata treba uzeti u obzir sledeće: mali broj uzoraka iz patoloških trudnoća, koji je nedovoljan za pouzdanu statističku obradu (dakle, radi se o preliminarnoj studiji); nedovoljnu osetljivost lektinskog blota (obrađeno u Odeljku 4.1.1.2.1.); i mali broj obeleženih lektina.

Grupa Sgambati i saradnika utvrdila je, metodom histohemije, manju zastupljenost glikana sa umetnutim GlcNAc, Sia i Fuc u placentama žena sa PE+ IUGR nego u kontrolnoj grupi placenti iz normalnih trudnoća (Sgambati i sar., 2002; Marini i sar., 2011). Smanjen serumski nivo hiperglikozilovane forme hCG je povezan sa pobačajima u ranoj trudnoći, pa postoje naznake da bi se ova proteinska forma mogla koristiti kao marker u dijagnozi rane PE (Keikkala i sar., 2013). Novija istraživanja ukazuju na mogućnost upotrebe i glikozilovanog fibronektina iz seruma majke kao biomarkera PE, jer je nivo ovog proteina povišen kod žena sa PE (Rasanen i sar., 2015). IUGR se takođe odlikuje smanjenom sijalinizacijom fetuina A (asijalofetuin), prisutnog u krvi pupčane vrpce (Karamessinis i sar., 2008). Pokazano je, takođe, da u placenti žena sa PE ne dolazi do promena u sadržaju mRNA, kao i u enzimskoj aktivnosti ST6 (Wang i sar., 2007). To ukazuje da nema promena u zastupljenosti α 2,6-sijaloglikoproteina u PE, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi.

Uzimajući u obzir učestalost pojave PE, i činjenicu da je njena patofiziologija i dalje nedovoljno poznata, brojna su istraživanja usmerena u pronalaženju uzroka ove bolesti. Kao posledica PE mogu nastati dodatne komplikacije, koje doprinose ozbiljnosti kliničke slike bolesti. Spektar simptoma koje PE obuhvata je širok i ne daje puno informacija, pa se može naslutiti da postoje različiti uzroci ove bolesti. Ono što jeste zajedničko za sve slučajeve PE je plitka implantacija trofoblasta u uterus (Vest i sar., 2014), odnosno trofoblast je nedovoljno invazivan. Jedan od bitnih mehanizama regulacije invazivnosti trofoblasta (prvo ga treba uključiti, pa ga onda isključiti) je različita ekspresija različitih tipova integrina u toku gestacije (engl. *integrin switching*) (Damsky i sar., 1994), a integrini su bogato N-glikozilovani na brojnim ostacima Asn (Janik i sar., 2010). Neki uzroci nastanka PE mogli bi biti povezani sa promenama u ekspresiji gliko-gena, koje bi dovele do promene u biosintezi N-glikana. Promena N-

glikanskog profila na površini ćelija mogla bi dalje da prouzrokuje promene u međućelijskim kontaktima, pokretljivosti i invazivnom potencijalu. Za ovo postoji i literaturna podrška, npr. NMDA (N-metil-D-aspartat) receptor, čija glikozilacija igra važnu ulogu u adaptivnoj regulaciji ćelijske površine na ćelijsku adheziju i međućelijsku komunikaciju (Horvat i sar., 2011). Novija istraživanja takođe ukazuju da je funkcija integrina, membranskih proteina ključnih za adheziju i pokretljivost ćelija, regulisana N-glikozilacijom brojnih ostataka Asn u ovim proteinima (Gu i sar., 2012). Postoji dokaz da je invazija trofoblasta regulisana modifikacijama N-glikozilacije $\alpha 5\beta 1$ integrina, posredstvom regulacije ekspresije GnT-V (Yamamoto i sar., 2009). U svetlu ovih podataka očekivalo bi se da je glikozilacija integrina promenjena kod PE placenti, a integrini su jedan od najzastupljenijih proteina u membrani ćelija trofoblasta.

Imajući u vidu veliku varijabilnost između pojedinačnih uzoraka PE, moguće je, da kod različitih individua dolazi do razlika u ekspresiji i aktivnosti različitih enzima, odnosno transferaza i glikozidaza. Time bi se mogla objasniti razlika u PE uzorcima na biohemijskom nivou, i činjenica da ne postoji jedinstvena slika koja bi povezala sve uzorke i izdvojila u odnosu na zdravu kontrolu. Ipak, da bi se napravile jedinstvene povezane grupe u kojima bi bili uzorci PE sa vrlo sličnom biohemijskom slikom, potreban je veliki broj uzoraka (minimum 100). Tek tada bi mogli da se izvedu pouzdaniji zaključci i preciznije utvrde razlike između patoloških i zdravih uzoraka.

U placenti trudnica kod kojih je dijagnostifikovana netolerancija na Glc, kao i kod onih sa dijagnostifikovanim gestacijskim dijabetesom, nađen je smanjen sadržaj: $\alpha 2,6$ -Sia vezane za Gal/GalNAc, Gal $\beta 1,3$ GalNAc i Gal $\beta 1,4$ (Fuc $\alpha 1,3$)GlcNAc $\beta 1,3$ R, u poređenju sa kontrolnom grupom (Sgambati i sar., 2007). U istim patološkim uzorcima nađen je povišen sadržaj: GlcNAc, GalNAc i Fuc $\alpha 1,2$ Gal (Sgambati i sar., 2007). Malobrojni podaci koji govore o uticaju dijabetesa na pojedinačne proteine placentu upućuju na povećan stepen glikozilacije transferinskog receptora (Georgieff i sar., 1997) i na smanjen sadržaj $\alpha 2,6$ -Sia i visokomanoznih N-glikana prisutnih na glikodelinu A, kao i na povećanu aktivnost placentalne sialidaze (Lee i sar., 2011).

4.2. N-glikani receptora za insulin i faktore rasta slične insulinu

IR, IGF1R i IGF2R imaju važne funkcije za rast i razvoj placente (Odeljak 2.2.1.). Ovi receptori su obilno N-glikozilovani (Collier i sar., 1993; Sparrow i sar., 2008; Ullrich i sar., 1986; Lobel i sar., 1987). Glikani prisutni na membranskim proteinima na površini ćelije imaju važne uloge u rastu i razvoju. Uočeno je i da se u ćelijama određene ugljenohidratne strukture specifično pojavljuju u različitim fazama razvoja i diferencijacije (Haltiwanger i Lowe, 2004). U laboratoriji, u kojoj je urađena ova teza, već je ispitivana N-glikozilacija IR, IGF1R i IGF2R. U svim tim eksperimentima je za dobijanje informacija o tipu i sadržaju specifičnih N-glikana vezanih za IR i IGFR korišćena LAH (Masnikosa i sar., 2006). Iako su N-glikani vezani za receptore globalno bili okarakterisani, ovi rezultati su imali nekoliko nedostataka. Kao prvi nedostatak je mali broj uzoraka placenti. Drugi nedostatak je što su placentе bile dobijene od porodilja nedefinisane starosti, a tek kasnije su se pojavili literaturni podaci koji snažno sugerišu da N-glikozilacija serumskih proteina zavisi od starosti (Vanhooren i sar., 2010; Pučić i sar., 2011). Tako je nastala potreba da se eksperimenti ispitivanja glikozilacije IR i IGFR ponove, ali sa daleko većim brojem uzoraka placenti, koje će biti dobro definisane gestacijske starosti, i koje će biti nabavljene od porodilja različite starosne dobi. Treći nedostatak preliminarnih ispitivanja N-glikozilacije IR i IGFR je što se o tipu i zastupljenosti N-glikana na receptorima zaključivalo samo na osnovu stepena vezivanja lektina poznate specifičnosti, i to sa ograničenim brojem lektina. Zbog toga su izostale informacije o sadržaju L-Fuc, oligomanoznih N-glikana i multiantenarnih N-glikana (Masnikosa i sar., 2006).

U odeljcima koji slede biće prikazani rezultati eksperimenata koji su omogućili da se dobiju kompletnije informacije o N-glikanima, kovalentno vezanim za IR i IGFR, koji su izolovani iz placenta žena različite starosne dobi, gestacijske starosti, sa PE i DM patologijama.

Najoptimalniji eksperimentalni plan za određivanje strukture N-glikana na IR i IGFR sastojao bi se od nekoliko koraka: 1) izolovanje i prečišćavanje receptora iz ćelijskih membrana humane placente; 2) enzimska hidroliza kompletnih N-glikana sa receptora; 3) razdvajanje N-glikana na HPLC kolonama uz MS detekciju pikova ili alternativno DSA-FACE profilisanje fluorescentno obeleženih N-glikana sa receptora.

Oba pristupa zahtevaju da se zadovolje tri neophodna uslova: da se membranski proteini solubilizuju deterdžentom i da se receptori izoluju u dovoljnoj količini potrebnoj za analizu, i da budu prečišćeni od drugih glikoproteina iz membrane. Niti jedan od ovih uslova nije mogao biti ispunjen iz sledećih razloga: prisustvo deterdženta onemogućava snimanje MS spektara, a njihovo potpuno uklanjanje je skupo i pri tome dolazi do gubitaka u materijalu. Izolovanje receptora iz humane placente u dovoljnoj količini za MS analizu glikana je takođe problematično, jer se iz cele jedne placente trećeg trimestra može izolovati maksimalno 50 µg IR (Fujita-Yamaguchi i sar., 1983), a za kompletnu analizu glikozilacije potrebno je više od 1 mg (Morelle i Michalski, 2007). Verovatno je ovo glavni razlog zašto u literaturi nema podataka o glikozilaciji membranskih proteina. Dodatni problem predstavlja odvajanje receptora za insulin od receptora za IGF peptide (Masnikosa i sar., 2006). Čak i pri pokušaju da se na koloni sa imobilizovanim insulinom izoluju samo IR, ili na koloni sa imobilizovanim M6P samo IGF2R, ipak se sva tri receptora manje ili više vezuju za sve ligande (Nedić i Masnikosa, 2009). U literaturi postoji samo jedan rad u kojem je detaljno opisana analiza N-glikoma IR. U tom radu, u ćelije iz kulture CHO-K1 i Lec8 je ubačen gen za IR-B, pa su receptori mogli biti izolovani u dovoljnoj količini i čistoći za MS analizu kompletnih glikana vezanih za IR (Sparrow i sar., 2008). S obzirom da je placenta bogat izvor sva tri receptora za insulin i IGF peptide, i uzevši u obzir unakrsnu reaktivnost receptora sa ligandima, nije za očekivati da će se u skorije vreme moći izolovati samo jedan receptorski entitet.

U ovoj tezi je profilisanje N-glikana vezanih za IR, IGF1R i IGF2R iz većeg broja uzoraka, urađeno metodom LAH. U narednim odeljcima su prikazani rezultati ispitivanja tipa i sadržaja N-glikana koji ulaze u sastav IR (4.2.1.), N-glikana koji ulaze u sastav IGF1R (4.2.2.) i N-glikana koji ulaze u sastav IGF2R (4.2.3.). Uzorci analizirani pomoću LAH su bili solubilizati iz placenti, koji su prethodno analizirani metodama DSA-FACE i lektinskog blota u cilju karakterizacije N-glikana membranskih proteina, ukoliko nije bilo navedeno drugačije.

4.2.1. N-glikani receptora za insulin

U cilju karakterizacije sadržaja i tipa N-glikana kovalentnovezanih za IR ispitan je:

- uticaj starosti žena (Odeljak 4.2.1.1.),
- uticaj gestacijske starosti placenti (Odeljak 4.2.1.2.),
- uticaj radioliganda na prepoznavanje i vezivanje kompleksa ^{125}I -insulin-IR za SNA (Odeljak 4.2.1.3.), i
- uticaj patoloških stanja (preeklampsije i dijabetesa) na IR (Odeljak 4.2.1.4.).

Za ispitivanje tipa i sadržaja N-glikana, korišćena je LAH, koja se zasniva na specifičnom vezivanju saharida iz N-glikana receptora, za lektine, koji su kovalentno vezani za čvrst nosač - agarozu. Da bi se vezivanje IR za imobilizovani lektin detektovalo, receptor je prvo inkubiran sa svojim ligandom - insulinom, koji je radioaktivno obeležen (^{125}I -insulin). Vezani kompleks ^{125}I -insulin-IR je sa lektinske kolone eluiran rastvorom koji sadrži kompetitivni/inhibitorni saharid, ili snižavanjem pH na 3. Kompleksi ^{125}I -insulin-IR, koji sadrže takve glikoforme receptora, da se njihovi N-glikani ne vezuju za dati lektin, se odstranjuju sa lektinske kolone pri ispiranju, pre elucije specifičnih glikoformi IR. Radioaktivnost frakcija se očitava na gama brojaču. Vezivanje kompleksa ^{125}I -insulin-IR za lektin se izražava u procentima, koji predstavljaju udeo specifično eluirane radioaktivnosti u ukupnoj radioaktivnosti, skinutoj sa kolone sa imobilizovanim lektinom (isprana + eluirana radioaktivnost). Eluirana radioaktivnost je, dakle, mera vezivanja određenih glikoformi IR za određeni lektin. Procenat vezivanja ^{125}I -insulin-IR kompleksa će se, radi jasnoće, u daljem tekstu nazivati samo procentom vezivanja receptora, i predstavljati u formi histograma.

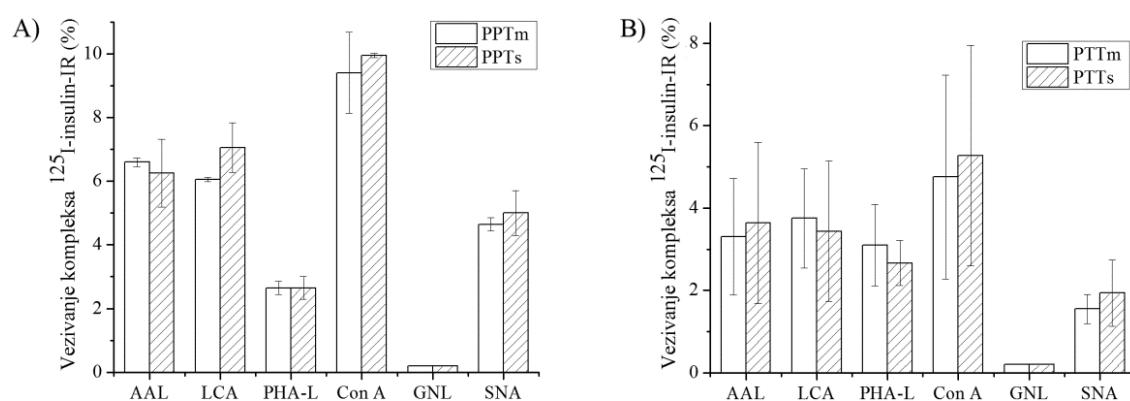
4.2.1.1. Uticaj starosti žena na sastav N-glikana receptora za insulin

IR je integralni membranski glikoprotein, koji ima 18 potencijalnih mesta za N-glikozilaciju (14 na α i 4 na β podjedinici), a veliki broj tih mesta (čak 16) je zaista i glikozilovan (Sparrow i sar., 2008). S obzirom da je IR jedan od mnogobrojnih N-glikozilovanih membranskih proteina ćelija humane placentе, bilo je od interesa ispitati da li je zastupljenost njegovih N-glikana slična onima iz ukupnih membranskih proteina

placente. Drugi cilj je bio da se ispita postoje li razlike u N-glikanima vezanim za IR, koji potiču iz uzoraka placenti dobijenih od žena različite starosne dobi. DSA-FACE analiza je, naime, pokazala da starost žena ne utiče na membranski N-glikom (Odeljak 4.1.1.1.). Sa druge strane, analiza lektinskim blotom je ukazala na promenu nekih N-glikana sa starošću žena (Odeljak 4.1.1.2.). Da bi se ispitaio uticaj starosti žena na sastav N-glikana IR, korišćeni su solubilizati placenti razvrstani u četiri grupe (kao u Odeljku 4.1.1.): PPTm (n=7), PPTs (n=7), PTTm (n=15), PTTs (n=15).

Za LAH je odabran čitav spektar lektina (LCA, AAL, Con A, GNL, PHA-L i SNA) koji prepoznaju raznovrsne (najčešće terminalne) saharidne ostatke u sastavu N-glikana (Tabela 1, Odeljak 4.1.1.2). AAL sa najvećim afinitetom vezuje Fuc u jezgru glikana, ali takođe vezuje i Fuc na antenama N-glikana, koja je vezana α 1,3-glikozidnom vezom za preposlednje ostatke GlcNAc (u sekvenci LacNAc) (Matsumura i sar., 2007). Con A vezuje sa velikim afinitetom trimanozno jezgro oligomanoznih N-glikana, ali i trimanozno jezgro uglavnom biantenarnih N-glikana. GNL je izabran kao lektin specifičan za oligomanozni tip N-glikana (Shibuya i sar., 1988).

Rezultati dobijeni pomoću LAH (srednje vrednosti vezivanja preformiranih kompleksa 125 I-insulin-IR za različite imobilizovane lektine u %), u kojima je ispitan uticaj starosti žena na N-glikane vezane za IR iz humane placent, prikazani su na Slici 33.



Slika 33. Vezivanje IR za lektine imobilizovane na agarozu. Korišćeni su uzorci solubilizata iz placenti različite gestacijske starosti dobijeni od žena iz dve različite starosne grupe: A) PPTm, placente prvog trimestra mlađih žena; PPTs, placente prvog trimestra starijih žena; B) PTTm, placente trećeg trimestra mlađih žena; PTTs, placente trećeg trimestra starijih žena.

Može se uočiti da se IR iz humane placente specifično vezuje za sve ispitivane lektine, izuzev za GNL; da se IR iz sve četiri grupe placenti vezuju za iste lektine, odnosno da ne postoji lektin za koji se vezuje samo IR iz neke grupe uzoraka; i da su procenti vezivanja receptora približno jednaki u grupi placenti iste gestacijske starosti. Uzevši u obzir različite specifičnosti lektina, **ovi rezultati ukazuju na to da IR poseduje:** visok sadržaj kompleksnih biantenarnih N-glikana (velika reaktivnost sa ConA), ali ne i oligomanozne N-glikane (izostanak vezivanja za GNL); da N-glikani IR nose ostatke L-Fuc u jezgru (dupla potvrda, reaktivnost sa LCA i sa AAL); da ima dosta biantenarnih N-glikana fukozilovanih u jezgru (reaktivnost sa LCA); da IR imaju nešto niži sadržaj multiantenarnih N-glikana (mnogo veća reaktivnost sa Con A nego sa PHA-L); i da se neki od lanaca N-glikana na IR završavaju α 2,6-vezanom Sia (reaktivnost sa SNA).

Sparrow i saradnici (2008) su detaljno analizirali sve glikane vezane za IR, koji su eksprimirali u CHO-K1 ćelijama, čime su pokazali prisustvo osam ostataka Asn zauzetih kompleksnim N-glikanima, i samo tri Asn, na kojima se mogu naći oligomanozni N-glikani, što je prikazano u Tabeli 6. Najzastupljeniji N-glikan na IR eksprimiranom u CHO-K1 ćelijama je NA2F sa 37,6%, slede oligomanozni N-glikani sa 22,0%, NA3F sa 14,3%, i NA4F sa 14,2%. NA2F bi se sigurno snažno vezivao za AAL, LCA i Con A, dok bi se NA3F i NA4F vezivali za PHA-L. Oligomanozni N-glikani u molekulu IR vezani su za ostatke Asn koji su sterno manje dostupni rastvaraču (Sparrow i sar., 2008), što može biti razlog izostanka vezivanja IR iz humane placente za imobilizovani GNL pri LAH analizi. Rezultati dobijeni LAH za IR iz humane placente se, dakle, dobro slažu sa podacima prikazanim u radu Sparrow i saradnika (Sparrow i sar., 2008) iako se radi o IR iz različitih tkiva, pa postoji mogućnost tkivno-specifične glikozilacije IR. Nažalost, u dostupnoj literaturi nema više podataka o glikozilaciji IR iz nekih drugih tkiva. Pored navedenog, važno je istaći da su pomoću LAH, mada to nije metoda za određivanje strukture N-glikana, dobijeni osnovni podaci o najzastupljenijim tipovima N-glikana vezanih za IR.

Tabela 6. Zastupljenost kompleksnih i oligomanoznih N-glikana vezanih za ektodomen humanog IR-B, eksprimiranog u CHO-K1 ćelijskoj liniji. Tabela je preuzeta iz literature (Sparrow i sar., 2008), i prerađena. Oznake N-glikana su preuzete sa sajta: www.dextrauk.com/index.php/products/glycans/complex-type-n-glycans.

Mesto glikozilacije	Struktura glikana	Oznaka	Zastupljenost (%)
Asn16	GlcNAc ₂ Man ₅	M5	20,1
	GlcNAc ₄ Man ₃ Gal ₂ Fuc	NA2F	17,7
	GlcNAc ₄ Man ₃ Gal ₂	NA2	12,3
	GlcNAc ₃ Man ₃ Gal	G1	9,7
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ Fuc	NA3F	6,4
Asn25	GlcNAc₄Man₃Gal₂Fuc	NA2F	53,9
	GlcNAc ₄ Man ₃ Gal ₂ FucSia	A1F	25,8
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ Fuc	NA3F	11,3
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ FucSia	Sia-NA3F	9
Asn111	GlcNAc ₂ Man ₆₋₉	M6, M7, M8, M9	100
Asn255	GlcNAc₄Man₃Gal₂Fuc	NA2F	91,2
	GlcNAc ₄ Man ₃ Gal ₂ FucSia	A1F	6,3
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ Fuc	NA3F	1,4
	GlcNAc₄Man₃GalFuc	A2G1F	0,7
	GlcNAc₃Man₃GalFuc	G1F	0,4
Asn295	GlcNAc₄Man₃Gal₂Fuc	NA2F	54,8
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ Fuc	NA3F	32,3
	GlcNAc ₆ Man ₃ Gal ₄ Fuc	NA4F	12,9
Asn418	GlcNAc₄Man₃Gal₂Fuc	NA2F	50,1
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ Fuc	NA3F	36,7
	GlcNAc ₆ Man ₃ Gal ₄ Fuc	NA4F	13,2
Asn514	GlcNAc ₂ Man ₅₋₆	M5, M6	100
Asn606	GlcNAc₄Man₃Gal₂Fuc	NA2F	54,9
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ Fuc	NA3F	28,8
	GlcNAc ₆ Man ₃ Gal ₄ Fuc	NA4F	16,3
Asn624	GlcNAc₄Man₃Gal₂Fuc	NA2F	53,4
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃ Fuc	NA3F	26,7
	GlcNAc ₄ Man ₃ Gal ₂	NA2	11,9
	GlcNAc ₅ Man ₃ Gal ₃	NA3	7,9
Asn671	GlcNAc ₆ Man ₃ Gal ₄ Fuc	NA4F	100

Što se tiče odgovora na pitanje: Postoje li razlike u sadržaju osnovnih tipova N-glikana IR između placenti žena različite starosti, odgovor je da nisu utvrđene. Dakle, starosna dob žena ne utiče na sadržaj i tip najzastupljenijih N-glikana na IR, i to važi za obe gestacijske grupe placenti (prvog i trećeg trimestra). Ovaj rezultat u saglasnosti je sa

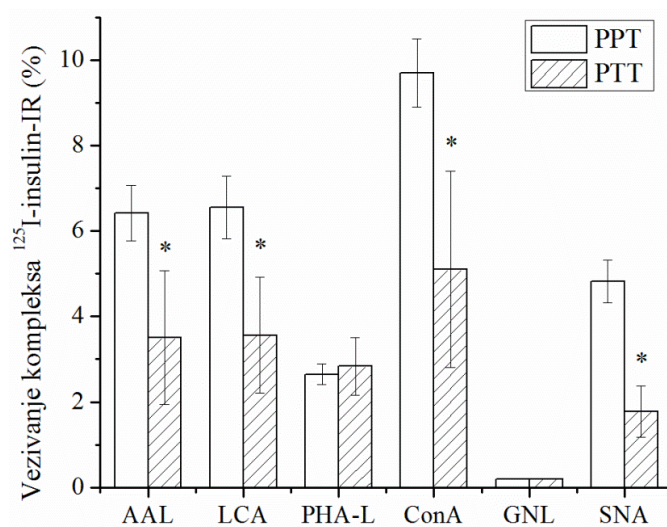
rezultatima dobijenim profilisanjem membranskog N-glikoma humane placente (4.1.1.1.) pomoću DSA-FACE. Naravno, starosne promene membranskog N-glikoma placente ne moraju nužno biti u korelaciji sa promenama u sadržaju N-glikana na placentnom IR. Membrane ćelija placente bogate su različitim glikoproteinima, pri čemu N-glikani najzastupljenijih membranskih proteina najviše doprinose ukupnom N-glikomu. Znajući da IR ima jako mali broj kopija po ćeliji, njegovi N-glikani se sigurno ne ističu na DSA-FACE u izobilju N-glikana oslobođenih sa ostalih glikoproteina.

4.2.1.2. Uticaj gestacijske starosti na sastav N-glikana receptora za insulin

Jedan od ciljeva ove teze bio je da se utvrdi ima li gestacijska starost humane placente uticaj na sadržaj i tip N-glikana vezanih za IR, odnosno da se utvrdi: i) postoje li razlike (kvalitativne/kvantitativne) u N-glikanima IR, koje bi stajale u vezi sa gestacijskom starošću humane placente; ii) da li gestacijske promene u N-glikomu, koje su utvrđene na ukupnim membranskim glikoproteinima iz humane placente (Odeljak 4.1.2), koreliraju sa promenama na N-glikanima placentnog IR (ukoliko se uoče). Jedini literaturni podatak koji je povezan sa opisanim ciljevima je Brennan-ov nalaz da se sadržaj Sia vezane za IR iz mozga pacova jako smanjuje u toku embrionalnog razvoja (Brennan, 1988).

Za analizu N-glikana IR pomoću LAH korišćeni su solubilizati PPTm, PPTs, PTTm i PTTs i izračunate su vrednosti vezivanja IR za imobilizovane lektine za svaki pojedinačni ispitani uzorak. Srednje vrednosti vezivanja IR za lektine, po grupama različite gestacijske starosti (PPT vs PTT), su poređene i ispitana je statistička značajnost dobijenih razlika (Slika 34). Razvrstavanje na grupe uzoraka prema starosti je izostalo, jer je pokazano da starost ne utiče na glikozilaciju placentnog IR. IR iz svih uzoraka se vezuju za sve lektine, primenjene u LAH, osim za GNL, što se videlo i na Slici 33. IR iz uzoraka placenti različite gestacijske starosti se vezuju za iste lektine, samo što je procenat vezivanja različit. Najveće vezivanje je postignuto sa IR iz PPT i to za ConA (9,7%), a najniže sa IR iz PTT za SNA (<2%). Razlike u vezivanju IR iz PPT i IR iz PTT za sve lektine, osim za PHA-L su bile statistički značajne ($p < 0,05$). Vezivanje je uvek veće u slučaju IR iz PPT nego IR iz PTT. Drugim rečima, dobijeni rezultati ukazuju da se IR, poreklom iz placenti različite gestacijske starosti, razlikuju

po sadržaju N-glikana, odnosno, tok gestacije dovodi do promena u sadržaju (bar nekih specifičnih) N-glikana vezanih za placentalni IR.



Slika 34. Vezivanje IR za lektine imobilizovane na agarozu. Korišćeni su uzorci solubilizata iz placenti različite gestacijske starosti: PPT, placentе prvog trimestra; PTT, placentе trećeg trimestra. Zvezdicom je označeno postojanje statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Polazeći od utvrđenih razlika u vezivanju IR za lektine i saharidne specifičnosti lektina, može se zaključiti da se, tokom gestacije, smanjuje sadržaj: N-glikana koji nose ostatke L-Fuc (vezivanje za AAL); biantenarnih N-glikana sa Fuc u jezgru (vezivanje za LCA i AAL); svih biantenarnih N-glikana (vezivanje za ConA), i N-glikana koji završavaju sa $\alpha 2,6$ -Sia (vezivanje za SNA). Izgleda da se tokom gestacije ne menja sadržaj multiantenarnih kompleksnih N-glikana (koji se vezuju za PHA-L) na IR.

Analiza membranskog N-glikoma humane placentе pomoću DSA-FACE pokazala je gestacijski porast u sadržaju svih fukozilovanih N-glikana, ali i porast multiantenarnih N-glikana (Odeljak 4.1.2.1.). U Odeljku 4.1.2.2. je zaključeno da nema gestacijskih promena u zastupljenosti $\alpha 2,6$ -sijalo-N-glikoproteina u placenti. Nasuprot ovim rezultatima, rezultati dobijeni pomoću LAH ukazuju na gestacijsko smanjenje sadržaja pomenutih N-glikana na IR. Drugim rečima, gestacijske promene sadržaja specifičnih N-glikana IR ne prate promene tih N-glikana na nivou ukupnog membranskog N-glikoma. U prethodnom odeljku je obrazloženo zašto promene u N-

glikomu IR ne moraju da budu iste vrste kao i promene u ukupnom membranskom N-glikomu.

Razlike u vezivanju IR za pojedinačne lektine prikazane su i kroz odnose vezivanja IR poreklom iz PPT i PTT uzoraka (Tabela 7). Skoro dvostruko veće vezivanje IR iz PPT uočeno je za AAL, LCA i ConA, dok se najveća razlika može videti u slučaju vezivanja IR za imobilizovani SNA. To znači da se tokom gestacije sadržaj $\alpha 2,6$ -Sia na N-glikanima IR skoro trostruko smanjuje. Smanjen sadržaj Sia na glikanima IR utvrđen je i tokom fetalnog razvoja mozga pacova (Brennan, 1988).

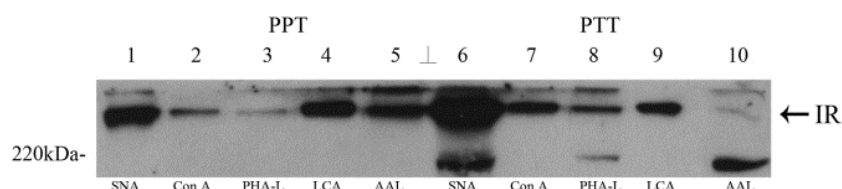
Tabela 7. Odnos vezivanja IR iz placenti prvog (PPT) i trećeg trimestra (PTT) za različite lektine.

IR vezivanje za...	PPT/PTT
AAL	1,8
LCA	1,8
PHA-L	1,0
Con A	1,9
SNA	2,7

U prethodno opisanim analizama N-glikana pomoću LAH, IR je „vizualizovan” posredstvom vezivanja za 125 I-insulin. Primena radioaktivno- obeleženog insulina omogućila je detekciju vezivanja, odnosno specifičnog eluiranja kompleksa 125 I-insulin-IR sa lektin-agaroze putem očitavanja radioaktivnosti u eluiranim frakcijama. U dostupnoj literaturi nema podataka o postojanju nekog (gliko)proteina u humanoj placenti koji vezuje insulin, i koji bi vezao 125 I-insulin za vreme preinkubacije sa solubilizatima, čime bi se i ovi kompleksi vezivali za lektin-agaroze i pogrešno očitavali kao radioaktivnost koja potiče isključivo od kompleksa 125 I-insulin-IR (o ovome će biti reči u narednom odeljku kod IGF1R).

Za dodatno dokazivanje/potvrdu vezivanja IR iz uzoraka za imobilizovane lektine, upotrebljena su i antitela na humani IR i metoda imunoblota. IR iz uzoraka su vezani za lektin-agarozu (LAH bez preinkubacije solubilizata sa 125 I-insulinom), specifične glikoforme IR su eluirane odgovarajućim inhibitornim saharidom, a zatim razdvojene elektroforezom, i potom blotovane antitelima na IR (Odeljci 3.9. i 3.13.). GNL-agarozu je izostavljena iz eksperimenta, jer nije bilo vezivanja IR na njoj (Slike 33 i 34). S obzirom na to da se radilo o potvrdi prethodno prikazanih rezultata, analizirana su

samo dva uzorka: zbirni uzorak solubilizata iz PPT i zbirni uzorak solubilizata iz PTT. Dobijeni imunoblot prikazan je na Slici 35. Imunoreaktivni IR je detektovan i u PPT i u PTT uzorcima solubilizata, i vezivao se za sve ispitivane lektine u većoj ili manjoj meri. Najintenzivnija je imunoreaktivna traka IR iz PTT eluirana sa SNA-agaroze, što je u suprotnosti sa rezultatom prikazanim na Slici 34, gde je detektovano upravo najmanje vezivanje 125 I-insulin-IR kompleksa iz PTT za SNA-agarozu, što će biti detaljno opisano u Odeljku 4.2.1.3. Najmanjeg intenziteta je traka IR iz PPT uzorka eluiranog sa PHA-L-agaroze. Ovaj rezultat stoji u saglasnosti sa onim prikazanim na Slici 34, gde je detektovano upravo najmanje vezivanje 125 I-insulin-IR kompleksa iz PPT za PHA-L-agarozu. Redosled intenziteta traka IR iz PPT uzoraka, prikazanih na Slici 35 je sledeći: SNA>AAL≈LCA>Con A>PHA-L, dok je redosled vezivanja 125 I-insulin-IR kompleksa za iste lektine bio: Con A>AAL≈LCA>SNA, PHA-L (Slika 34). Redosled intenziteta traka IR iz PTT sa Slike 35 je: SNA>Con A≈LCA≈AAL>PHA-L, dok je redosled vezivanja 125 I-insulin-IR kompleksa bio: Con A>AAL≈LCA>PHA-L>SNA (Slika 34). Uočava se i da je intenzitet traka IR eluiranih sa AAL i LCA sličan, kao što su bile slične i vrednosti % vezivanja 125 I-insulin-IR kompleksa za pomenuta dva lektina, koji su specifični za N-glikane sa L-Fuc u jezgru. Za očekivati je da se svi IR koji nose NA2F glikan vežu i za LCA i za AAL (Tabela 6), dok LCA ne toleriše glikane sa tri ili više antena. Ukoliko bi se pojavila populacija IR sa znatnijim udelom N-glikana sa antenarnom fukozilacijom (npr. NA3Fb ili NA4Fb), oni bi se vezivali samo za AAL-agarozu, koja bi onda pokazivala veći procenat vezivanja IR nego LCA, što ovde nije bio slučaj. Rezultati prikazani u Tabeli 6 ne govore u prilog postojanju antenarno fukozilovanih N-glikana na IR.



Slika 35. Imunoblot analiza IR eluiranog sa lektinskih kolona. Zbirni uzorci solubilizata iz placenti prvog (PPT) i placenti trećeg trimestra (PTT) su razdvojeni elektroforezom, u neredukujućim uslovima na 8% gelu. Korišćena su anti-IR antitela (razblaženje 1:200). Eluati sa različitih lektinskih kolona označeni su brojevima: SNA (1,6), ConA (2,7), PHA-L (3,8), LCA (4,9), AAL (5,10).

Ako se uporedi intenzitet trake IR iz PPT sa odgovarajućom trakom IR iz PTT za svaki lektin posebno (npr. SNA vs. SNA, Con A vs. Con A, Slika 35), dobija se da je: intenzitet traka sa AAL i LCA veći u PPT uzorcima, dok je intenzitet traka sa SNA, Con A i PHA-L povećan u PTT u odnosu na PPT. Ovi rezultati ukazuju na **gestacijsko povećanje sadržaja** biantenarnih N-glikana tipa NA2 (Con A reaktivnost), multiantenarnih N-glikana (PHA-L reaktivnost) i α 2,6-sijalo-N-glikanskih lanaca (SNA reaktivnost). Rezultati se ne slažu sa rezultatima dobijenim pomoću LAH uz vizuelizaciju vezivanja IR preinkubiranjem sa 125 I-insulinom (Slika 34), gde je ustanovljeno da se **tokom gestacije** smanjuje sadržaj fukozilovanih N-glikana, ali i biantenarnih N-glikana tipa NA2 i α 2,6-Sia. Razlika je najverovatnije uslovljena eksperimentalnom postavkom. Postoji mogućnost različitog afiniteta vezivanja slobodnog IR i kompleksa 125 I-insulin-IR sa imobilizovanim lektinima. Druga mogućnost je da monoklonska antitela na IR ne prepoznaju (i ne vezuju istim afinitetom) sve glikoforme IR iz solubilizata, kao i da se 125 I-insulin ne vezuje istim afinitetom za sve glikoforme IR.

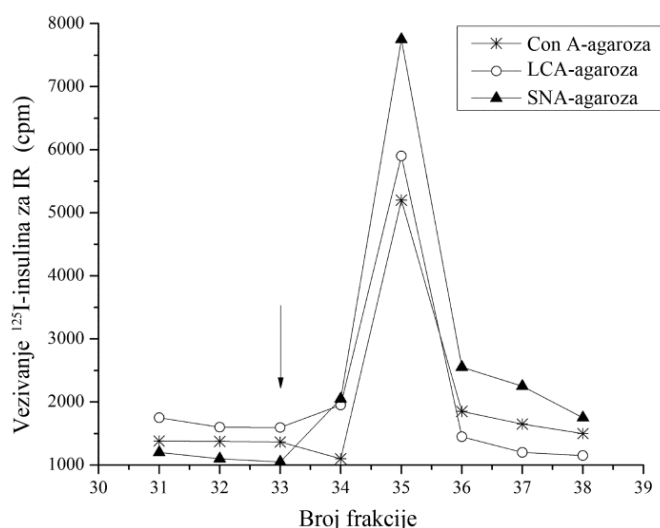
Literaturni podaci ukazuju na veću zastupljenost IR na apikalnoj membrani sinciotrofoblasta u prvom trimestru gestacije, dok je u trećem trimestru IR mnogo zastupljeniji na bazalnoj membrani ovih placentnih ćelija. Znači da placentni IR, tokom gestacije, menja svoju lokalizaciju od plazma membrane, koja je u kontaktu sa majčinom cirkulacijom, ka plazma membrani koja je u kontaktu sa fetalnom cirkulacijom (Desoye i sar., 1994). Moguće je da je u mehanizam ovog pomeranja u lokalizaciji IR u ćelijama placentne uključena promena u N-glikozilaciji IR. Interesantno je da se na imunoblotu (Slika 35) uočavaju i trake IR manjih molekulskih masa (SNA, PHA-L i AAL), i to samo u PTT. Može se pretpostaviti da su ove glikoforme IR povezane sa njegovim funkcijama u poslednjem trimestru trudnoće.

4.2.1.3. Uticaj 125 I-insulina na vezivanje kompleksa 125 I-insulin-IR za SNA

Često se lanci N-glikana završavaju ostacima Sia, vezanih α 2,6-glikozidnom vezom za pretposlednji ostatak Gal (Varki i sar., 2009). Lektin iz kore zove, SNA, specifično vezuje α 2,6-Sia (Shibuya i sar., 1987). Sve je više radova koji ukazuju na ogroman značaj Sia u funkcionisanju glikoproteina. Sia ima ulogu u aktivaciji IR nakon

što je receptor vezao insulin (Dridi i sar., 2013). Promena u sadržaju Sia na proteinu može dovesti do promene u njegovoj funkciji (Pshezhetsky i Ashmarina, 2013).

U prethodnom odeljku je ukazano na neslaganje rezultata dobijenih za vezivanje IR za različite lektine imobilizovane na agarozu, koje je praćeno na dva načina: i) merenjem radioaktivnosti kompleksa ^{125}I -insulin-IR nakon njegove elucije sa lektin-agarozu, ili ii) merenjem intenziteta imunoreaktivnih traka IR, nakon njegove elucije sa lektin-agarozu. Neslaganje je najizrazitije u slučaju SNA-agarozne hromatografije uzoraka iz PTT, gde je jako intenzivna traka IR eluiranog sa SNA-agaroze (Slika 35) upoređena sa niskim vezivanjem kompleksa ^{125}I -insulin-IR za SNA-agarozu (Slika 34). Uzrok ovom neslaganju bi mogao biti različit afinitet vezivanja slobodnog IR i IR- ^{125}I -insulin kompleksa za imobilizovani SNA. Drugim rečima, mesta na IR odgovorna za vezivanje insulina i ona za vezivanje SNA se, možda, delimično preklapaju. Da bi se proverila ova pretpostavka, IR iz solubilizata je prvo vezan za imobilizovani lektin bez prisustva ^{125}I -insulina, a potom eluiran sa kolone u frakcijama, u koje je dodavan ^{125}I -insulin i proveravano vezivanje IR. Paralelno sa LAH na SNA-agarozu, radi poređenja, urađena je i LAH solubilizata na još dve kolone: LCA- i Con A-agarozu. Rezultati dobijeni za test vezivanja u epruveti prikazani su na Slici 36.



Slika 36. Test vezivanja ^{125}I -insulina za IR u frakcijama eluiranim pri LAH sa kolona: Con A-, LCA- i SNA-agarozu. Strelicom je obeležen početak elucije.

Sa grafika na Slici 36, vidi se da se ^{125}I -insulin vezuje za IR u frakcijama eluiranim sa sve tri kolone: SNA-agarozu > LCA-agarozu > Con A-agarozu. Ovaj rezultat ukazuje na

prisustvo funkcionalnog IR u svim eluatima, odnosno na prisustvo glikoformi IR koje se vezuju za ispitivane lektine, i koje nakon elucije ne menjaju znatnije svoju konformaciju. Znači, ^{125}I -insulin se neometano vezuje za sijalinizovane glikoforme IR iz placentne, eluirane sa SNA-agaroze. Preformirani kompleksi ^{125}I -insulin-IR se slabo vezuju za SNA-agarozu, verovatno zbog toga što su mesta vezivanja za SNA na IR u blizini vezivnog mesta za insulin, tako da ^{125}I -insulin na neki način ometa interakciju IR sa SNA. Rezultati Sparrow i sar. (2008) (Tabela 6) su pokazali da je Sia prisutna samo u N-glikanima vezanim za dva glikozilaciona mesta: Asn25 (34,8% zastupljenosti) i Asn255 (6,3% zastupljenosti). Ako se posmatra trodimenzionalna mapa IR, može se videti da je velika verovatnoća da se bar jedan od ovih ostataka Asn nalazi u blizini ligand-vezujućeg mesta (Lawrence i sar., 2007; Rentería i sar., 2008). Još je davne 1986. godine Rouiller sa saradnicima utvrdio da postoje ogromne razlike u vezivanju ^{125}I -insulina za normalne CHO ćelije iz kulture (WT, engl. *wild type*) i za ćelije – mutante (Lec1), u kojima postoji genetski defekt u N-glikozilaciji proteina. Autor je pretpostavio da je uzrok smanjenog afiniteta IR za insulin izmenjena N-glikozilacija IR u Lec1 ćelijama, koje nemaju sposobnost sinteze kompleksnih N-glikana (već samo oligomanoznih) (Rouiller i sar., 1986). Mada na prvi pogled ovi literaturni podaci ne izgledaju da imaju veze sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi, ipak pokazuju da afinitet IR spram insulina zavisi od N-glikozilacije IR. To bi dalje moglo značiti da jedna ćelija (npr. placentna) može podešavati afinitet svojih IR prema insulinu prostim izmenama u glikozilaciji receptora. Ova hipoteza nalazi svoju potvrdu u radu Arabkhari-ja, u kome je pokazano da je tretman L6 ćelija neuraminidazom doveo do desijalinizacije IR na površini ćelija, koji se poklopio sa značajnim povećanjem afiniteta IR spram insulina (Arabkhari i sar., 2010). Sve je veći broj dokaza u prilog važne uloge sijalidaza/neuraminidaza, koje su smeštene u blizini receptora na plazminoj membrani, koje bi uklanjale potreban broj terminalnih ostataka Sia sa receptora i time privremeno menjale njihovu strukturu, pa i lokalizaciju i/ili funkciju (Pshezhetsky i Ashmarina, 2013). Promena glikozilacione šeme IR bi mogla nastati prema planu (recimo tokom gestacije) ili biti deo gestacijskog oboljenja (npr. preeklampsije), o čemu će biti govora u narednom odeljku.

4.2.1.4. Uticaj dijabetesa i preeklampsije na sastav N-glikana IR

U poglavlju 4.1.3. ove teze prikazani su rezultati uticaja patologija (PE i DM) u trudnoći na promenu profila najzastupljenijih N-glikana vezanih za membranske proteine iz placente. Uticaj PE i DM na N-glikozilaciju receptora IGF sistema: IR, IGF1R i IGF2R je, takođe ispitan, a u ovom odeljku su prikazani rezultati ispitivanja uticaja na sadržaj i tip N-glikana vezanih za IR poreklom iz placenti trećeg trimestra. Korišćeni su uzorci solubilizata, izolovani iz placenti žena sa PE i DM, koji su prethodno bili ispitani lektinskim blotom na ukupan membranski N-glikom: PE (n=14), DM (n=6), ZP (n=30). Ovi uzorci su korišćeni i za ispitivanje uticaja patoloških stanja na sastav N-glikana IGF1R i IGF2R.

Profilisanje N-glikana vezanih za IR urađeno je metodom LAH, a glikoforme IR su detektovane preko „vezane“ radioaktivnosti ^{125}I -insulina, s kojim su solubilizati inkubirani pre nanošenja na kolone sa imobilizovanim lektinima specifičnim za: GlcNAc (WGA i sWGA), Sia (SNA i MAL-II), Gal (RCA-I, ECL, PHA), Man iz jezgra biantenarnih lanaca N-glikana (Con A), biantenarne N-glikane fukozilovane u jezgru (LCA), i $\alpha 1,2$ -Fuc (UEA-I). Dodatno je korišćen i imunoblot, kao potvrda vezivanja IR iz solubilizata za imobilizovane lektine. Procenti vezivanja kompleksa ^{125}I -insulin-IR (IR iz placenti zdravih i trudnica sa DM) za lektin-agarozu prikazani su u Tabeli 8.

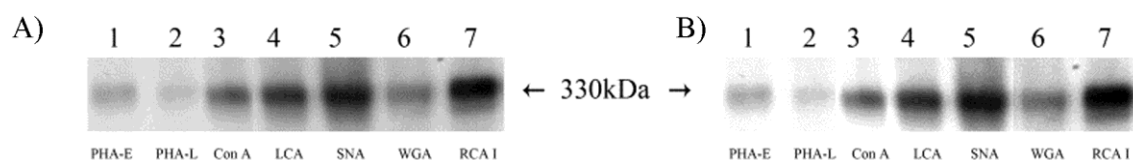
Tabela 8. Vezivanje IR za lektine imobilizovane na agarozu. Uzorci su solubilizati membrana ćelija placenti, dobijeni od zdravih (ZP) i žena sa dijabetesom (DM). Vezivanje je izraženo kao srednja vrednost procenata vezivanja pojedinačnih uzoraka $\pm$ standardna devijacija (sd).

Lektin Uzorak	WGA	sWGA	RCA-I	SNA	ECL	UEA-I
ZP $\pm$ sd	2,7 $\pm$ 1,2	1,5 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,7
DM $\pm$ sd	3,5 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,6
Lektin Uzorak	LCA	Con A	PHA-E	PHA-L	MAL-II	
ZP $\pm$ sd	2,5 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 1,5	2,5 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,6	
DM $\pm$ sd	3,3 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 1,2	1,7 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 1,2	1,3 $\pm$ 0,6	

IR izolovan iz obe grupe uzoraka se vezuje za sve ispitivane lektine, ali je vezivanje

malo. Razlike u sadržaju N-glikana vezanih za IR poreklom iz zdrave i patološke populacije placenti nisu statistički značajne.

Glikoforme IR, koje su se vezale, a potom bile eluirane sa imobilizovanih lektina detektovane su i u imunoblotu sa anti-IR antitelima. Na 7 različitih imobilizovanih lektina naneta su dva zbirna uzorka: pul DM solubilizata i pul ZP solubilizata. Na Slici 37 je prikazan reprezentativni imunoblot.



Slika 37. Imunoblot analiza IR eluiranog sa lektinskih kolona. Zbirni uzorak solubilizata placenti zdravih (ZP) (A) i majki sa dijabetesom (DM) (B) je razdvojen na SDS-PAGE, u neredukujućim uslovima na 6% gelu. Korišćena su anti-IR antitela (razblaženje 1:200). Brojevima su označeni eluati sa lektinskih kolona: 1 (PHA-E), 2 (PHA-L), 3 (Con A), 4 (LCA), 5 (SNA), 6 (WGA) i 7 (RCA-I).

Rezultati imunoblota nisu ukazali na postojanje razlika u sadržaju pojedinih glikoformi IR između ZP i DM uzoraka placenti. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim pomoću LAH (Tabela 8). Rezultat ima preliminaran značaj, zbog malog broja uzoraka placenti iz trudnoća komplikovanih DM. Ovaj poremećaj, na sreću, nije čest.

Analiza zastupljenosti N-glikoformi IR iz uzoraka PE urađena je pomoću **mini-LAH** metode, koja je brža u odnosu na klasičnu LAH. Problemi vezani sa klasičnom LAH su sledeći: kolonice su napunjene sa 2 mL agaroznog gela, što onemogućava upotrebu frakcionog kolektora za sakupljanje frakcija; kolona sa imobilizovanim lektinima u eksperimentu ima najmanje šest, što je zahtevno za jednog eksperimentatora. Usled toga što se radioaktivnost ^{125}I -liganda smanjuje iz dana u dan, vrednosti vezivanja ^{125}I -ligand-receptor kompleksa za lektine takođe opadaju iz dana u dan, zbog čega se one dobijene u razmaku od 10 ili 15 dana ne mogu porediti. U cilju obrade većeg broja uzoraka za što kraće vreme, upotrebljena je mini-LAH, sa 10 puta manjom zapreminom lektin-agaroznog gela u kolonici (0,2 ml), što je zahtevalo 10 puta manju zapreminu uzorka, kao i 10 puta manju koncentraciju ^{125}I -liganda. Uzimajući u obzir rezultate dobijene upotrebom LAH, smanjen je broj lektina korišćenih za mini-

LAH, pri čemu nisu korišćeni lektini šireg spektra specifičnosti (poput WGA, ECL i RCA). Mini-LAH metodom su analizirani IR iz PE i ZP solubilizata. Dobijeni rezultati analize vezivanja N-glikoformi IR za 7 odabranih lektina, pomoću mini-LAH prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9. Vezivanje IR, izolovanih iz uzoraka solubilizata placenti zdravih žena (ZP) i žena sa preeklampsijom (PE), za lektine, dobijeno pomoću mini lektinske afinitetne hromatografije. Prikazani su procenti vezivanja kompleksa ^{125}I -insulin-IR $\pm$ standardna devijacija (sd). Zvezdicom je označena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) dok „nd“ ukazuje da radioaktivnost nije detektovana.

Lektin	AAL	LCA	PHA-E	PHA-L	Con A	GNL	SNA
Uzorak							
ZP $\pm$ sd	6,6 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,3	nd	nd	0,9 $\pm$ 0,1	nd	3,2 $\pm$ 0,1
PE $\pm$ sd	5,5 $\pm$ 1,4	2,4 $\pm$ 0,8	nd	nd	1,6 $\pm$ 1,1	nd	1,9 $\pm$ 0,6*

Kao što se iz Tabele 9 vidi, kompleks ^{125}I -insulin-IR iz svih uzoraka se vezuje za većinu ispitivanih lektina, izuzev za PHA-E, PHA-L i GNL. Vezivanje IR za GNL, ni u ovoj eksperimentalnoj postavci, nije detektovano (ka ni sa LAH, Slika 33), što se može objasniti ili potpunim izostankom oligomanoznih N-glikana na placentnom IR ili njihovim prisustvom u regionima IR koji su sterno nedostupni (Sparrow i sar., 2008). Međutim, izuzetno nisko do nedetektabilno vezivanje kompleksa ^{125}I -insulin-IR za PHA-L nije u saglasnosti sa vezivanjem ostvarenim pri klasičnoj LAH (Slika 33). Uočava se i da su procenti vezivanja IR za imobilizovane lektine generalno jako niski, kako u mini-LAH tako i u LAH. Tako je u LAH vezivanje kompleksa ^{125}I -insulin-IR iz zdravih PTT za LCA iznosilo 3,6%, za AAL 3,5%, za Con A 5,1%, za SNA 1,8%, dok je u mini-LAH vezivanje kompleksa ^{125}I -insulin-IR iz istih uzoraka iznosilo 2,8% (za LCA), 6,6% (za AAL), 0,9% (za Con A) i 3,2% (za SNA). Iz nekog razloga, prevođenje sistema za LAH ^{125}I -insulin-IR na mini-LAH nije funkcionisalo ni za jedan lektin. S obzirom na navedeno, IGF1R i IGF2R su izuzeti iz ove vrste testiranja.

Statističkom analizom poređeni su procenti vezivanja IR iz PE solubilizata sa procentima vezivanja IR iz ZP solubilizata, za svaki lektin posebno. Jedina statistički značajna razlika, uočena između zdrave i patoloških grupa, je u vezivanju za SNA-agarozu, koje je bilo niže u PE uzorcima u odnosu na kontrolu. Dobijene vrednosti su suviše niske da bi se doneli pouzdani zaključci o promeni sadržaja α 2,6-Sia na N-

glikanima IR. Zbog toga bi bi ispitivanje N-glikana vezanih IR trebalo uraditi osjetljivijim metodama.

Sumirani rezultati ispitivanja N-glikana iz IR:

- starost žena nema uticaja na sadržaj i tip N-glikana prisutnih na IR;
- tokom gestacije smanjuje se sadržaj: biantenarnih N-glikana koji nose ostatke L-Fuc u jezgru, biantenarnih N-glikana i α 2,6-sijalo-N-glikana;
- moguće je da vezivanje ^{125}I -insulina dovodi do promena u konformaciji IR, što za posledicu može imati veću ili manju dostupnost specifičnih N-glikanskih termina (npr. α 2,6-Sia);
- patološka stanja (poput dijabetesa i preeklampsije) ne dovode do značajnih promena tipa i sadržaja N-glikana prisutnih na IR.

4.2.2. N-glikani receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1

U ovom odeljku su prikazani rezultati ispitivanja sadržaja i tipa N-glikana koji ulaze u sastav IGF1R, izolovanog iz placenti:

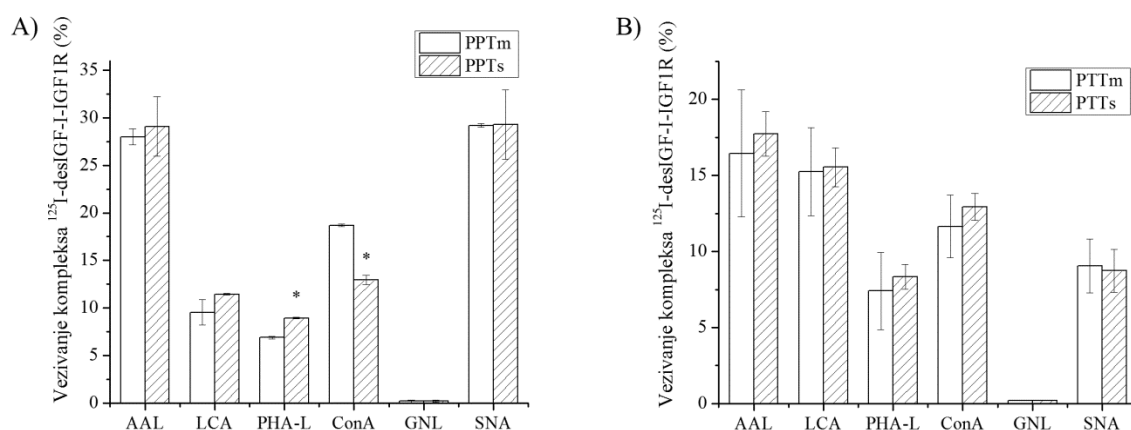
- žena različite starosne dobi (Odeljak 4.2.2.1.),
- različite gestacijske starosti (Odeljak 4.2.2.2.),
- trudnica sa patologijom DM (Odeljak 4.2.2.3.).

4.2.2.1. Uticaj starosti žena na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1

U Odeljku 4.2.1.1. pokazano je da starost žena nema uticaja na tip i sadržaj N-glikana koji ulaze u sastav IR. Ekstracelularni deo IGF1R sadrži 16 ostataka Asn (11 na α podjedinici i 5 na β podjedinici) koji su potencijalna mesta za N-glikozilaciju (Ullrich i sar., 1986). U ovom odeljku prikazani su rezultati ispitivanja uticaja starosti žena na tip i sadržaj N-glikana vezanih za IGF1R. Primenjena je metoda LAH na uzorcima u kojima su prethodno analizirane glikoforme IR (Odeljak 4.2.1.1.): PPTm (n=7), PPTs (n=7), PTTm (n=15) i PTTs (n=15). Za detekciju vezivanja IGF1R za lektine upotrebljen je ^{125}I -desIGF-I. Molekulu desIGF-I nedostaju tri aminokiselinska ostatka

(Gly-Pro-Glu) na NH₂-kraju peptidnog lanca (Ballard i sar., 1996). Izbor desIGF-I umesto samog IGF-I učinjen je iz dva razloga: pokazano je da desIGF-I ima nešto veći afinitet za IGF1R i od samog IGF-I, i, najvažnije, desIGF-I ima višestruko manji afinitet za IGFBP (Carlsson-Skwirut i sar., 1989). Inkubacijom uzoraka sa ¹²⁵I-desIGF-I, dakle, stvaraju se pretežno kompleksi ¹²⁵I-desIGF-I-IGF1R. Na ovaj način izbegava se obeležavanje IGFBP, čija se mogućnost prisustva u solubilizatima membrana iz placente ne može isključiti. Ukoliko bi N-glikozilovani IGFBP (IGFBP-3, IGFBP-4 i IGFBP-5), bio prisutan u uzorcima, kompleksi ¹²⁵I-IGF-I-IGFBP bi se vezivali za lektin-agarozu i bili bi pogrešno protumačeni kao vezani IGF1R. Pokazano je da se IGFBP-3 može naći u obliku vezanom za plazma membranu (Oh i sar., 1993).

Rezultati su izraženi preko procenta vezivanja kompleksa ¹²⁵I-desIGF-I-IGF1R za lektin-agarozu i prikazani su na Slici 38.



Slika 38. Vezivanje IGF1R (¹²⁵I-desIGF-I-IGF1R) za lektine imobilizovane na agarozu. Korišćeni su uzorci solubilizata iz placenti različite gestacijske starosti, dobijeni od žena iz dve različite starosne grupe: A) PPTm, placente prvog trimestra mladih žena; PPTs, placente prvog trimestra starijih žena; B) PTTm, placente trećeg trimestra mladih žena; PTTs, placente trećeg trimestra starijih žena. Zvezdicom je označeno postojanje statistički značajne razlike (p<0,05).

Može se uočiti:

- da se IGF1R (kao i IR) iz humane placente specifično vezuje za gotovo sve ispitivane lektine, osim za GNL,

- da se IGF1R iz sve 4 grupe uzoraka vezuju za iste lektine, odnosno ne postoji lektin za koji bi se vezivali samo IGF1R iz jedne grupe uzoraka (kao i kod IR),

- da nisu nađene statistički značajne razlike između srednjih vrednosti procenata vezivanja kompleksa ^{125}I -desIGF-I-IGF1R za lektine između grupa različite starosne dobi (osim za PHA-L i Con A u PPT grupaciji), a iste gestacijske starosti.

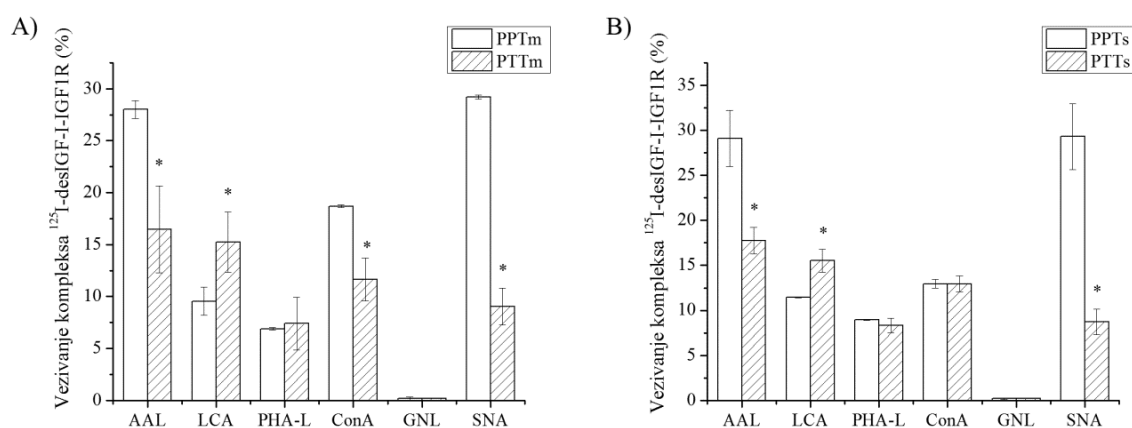
Polazeći od saharidne specifičnosti lektina, rezultati ukazuju da IGF1R iz humane placente poseduje visok sadržaj fukozilovanih N-glikana (reaktivnost sa AAL), takođe i dosta biantenarnih N-glikana sa Fuc u jezgru (reaktivnost sa LCA), kao i da je obilna α 2,6-sijalinizacija lanaca N-glikana (SNA reaktivnost). Umereno vezivanje za PHA-L ukazuje na prisustvo i multiantenarnih N-glikana, mada preovlađuju biantenarni lanci (Con A reaktivnost > PHA-L reaktivnosti), dok se oligomanozni N-glikani na IGF1R ne detektuju (izostanak vezivanja za GNL). Dakle, tipovi N-glikana vezanih za IR i IGF1R iz humane placente su manje ili više slični (videti Sliku 33), izuzev α 2,6-sijalo-N-glikana, kojih je vidno više kod IGF1R. U literaturi nema dostupnih podataka o tipovima i sadržaju N-glikana vezanih za IGF1R. Starost žena nije uticala na profil N-glikana vezanih za IR (Slika 33), dok je kod IGF1R utvrđen veći sadržaj multiantenarnih N-glikana (veće vezivanje za PHA-L) i manji sadržaj biantenarnih N-glikana (manje vezivanje za Con A) u PPTs u poređenju sa PPTm grupom.

Dakle, sa povećanjem starosne dobi žena, u placentama dolazi do smanjenja relativnog sadržaja biantenarnih N-glikana IGF1R, praćenog povećanjem sadržaja tri- i tetraantenarnih N-glikana, koje je primećeno u obe gestacijske grupe, ali je u prvom trimestru statistički značajno. Prema novim saznanjima, broj i zastupljenost multiantenarnih N-glikana na receptorima za faktore rasta (npr. EGFR, Trk, IGF1R) su jako osetljivi na uslove povećanog metaboličkog unosa heksoza. Količina multiantenarnih N-glikana na ovim receptorima se značajno povećava što im omogućava interakciju sa galektinima i izbegavanje endocitoze, zahvaljujući čemu ostaju duže na površini ćelije i mogu reagovati na signale koje donose faktori rasta (EGF, IGF-I). Na ovaj način se spreže količina energije kojom organizam raspolaže i odluka da ćelija krene u proliferaciju (Dennis i sar., 2009a). Povećanje sadržaja multiantenarnih N-glikana na IGF1R sa starošću, koje je utvrđeno u ovoj tezi, moglo bi biti posledica povećanog unosa nutrijenata i Glc kod žena starijih od 34 godina, koje imaju veću verovatnoću da imaju BMI>25 nego mlađe žene (Lamminpää i sar., 2012).

Žene starije od 35 godina češće dobijaju i PE, o čemu će biti više rečeno u odeljku 4.2.2.3. U grupi placenti iz trećeg trimestra nisu nađene statistički značajne promene povezane sa starošću žena-davalaca placenti. Što se tiče različitog profila N-glikana IGF1R iz PPT i PTT uzoraka, oni su posledica razlika u gestacijskoj starosti placenti, što se razmatra u sledećem odeljku.

4.2.2.2. Uticaj gestacijske starosti na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1

Rezultati dobijeni u ovoj tezi su ukazali da tokom gestacije dolazi do promena u tipu i relativnom sadržaju N-glikana vezanih za IR iz humane placente (Odeljak 4.2.1.2.). Uticaj gestacijske starosti na profile N-glikana sa IGF1R, izolovanih iz četiri grupe uzoraka solubilizata (PPTm, PPTs, PTTm i PTTs), ispitan je pomoću LAH. Vrednosti vezivanja kompleksa ^{125}I -desIGF-I-IGF1R za imobilizovane lektine prikazani su na Slici 39.



Slika 39. Vezivanje IGF1R (^{125}I -desIGF-I-IGF1R) za lektine imobilizovane na agarozu. Korišćeni su solubilizati iz placenti različite gestacijske starosti: A) PPTm, placente prvog trimestra mlađih žena; PTTm, placente trećeg trimestra mlađih žena; B) PPTs, placente prvog trimestra starijih žena; PTTs, placente trećeg trimestra starijih žena. Zvezdicom je označeno postojanje statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Najveće vezivanje IGF1R iz PPT grupe uzoraka je ostvareno za SNA (29,2%) i AAL (28,0%), dok se IGF1R iz PTT najviše vezao za AAL (16,5%) i LCA (15,3%). Najniže

vezivanje IGF1R u obe grupe različite gestacijske starosti bilo je za PHA-L (oko 7%), dok vezivanje za GNL gotovo da ne postoji.

U PTT grupi mlade starosne dobi izraženo je smanjenje u vezivanju IGF1R za AAL- (za 11,5%), Con A- (za 7,0%) i SNA-agarozu (za 20,1%) (Slika 39A) u odnosu na PPT. Ove razlike su statistički značajne ($p < 0,05$), što ukazuje na gestacijsko smanjenje u sadržaju terminalne $\alpha 2,6$ -Sia, kao i smanjenje u sadržaju fukozilovanih (npr. NA2F, NA3F, NA4F) i nefukozilovanih biantenarnih N-glikana (npr. NA2). U PTT grupama vezivanje za LCA je značajno veće u odnosu na PPT grupe. **Kod trudnica starije dobi**, manje vezivanje IGF1R za SNA- i AAL-agarozu (Slika 39B) u PTT u odnosu na PPT uzorke ukazuje na (opet izrazito) smanjenje u sadržaju terminalne $\alpha 2,6$ -Sia, praćeno smanjenjem sadržaja fukozilovanih N-glikana tokom gestacije. Razlika u vezivanju kompleksa IGF1R za različite lektine izražena je i kroz odnose procenata vezivanja dobijenih za dve gestacijske grupe, za obe starosne dobi (PPTm/PTTm i PPTs/PTTs, Tabela 10).

Tabela 10. Odnos vezivanja IGF1R iz solubilizata placenti prvog (PPT) i trećeg trimestra (PTT) za različite lektine imobilizovane na agarozu. Oznaka **m** je za mladu, a **s** za stariju grupu žena.

PPTm/PTTm	IGF1R	PPTs/PTTs	IGF1R
AAL	1,7	AAL	1,6
LCA	0,6	LCA	0,7
PHA-L	0,9	PHA-L	1,1
Con A	1,6	Con A	1,0
SNA	3,2	SNA	3,4

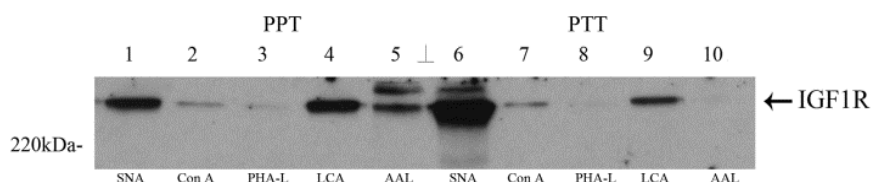
Polazeći od specifičnosti lektina upotrebljenih za karakterizaciju N-glikana može se izvesti nekoliko zaključaka o gestacijskim promenama u sadržaju N-glikana IGF1R:

- gestacijsko smanjenje sadržaja fukozilovanih N-glikana (jezgarna+antenarna fukozilacija), što važi za obe starosne grupe;
- gestacijsko povećanje sadržaja biantenarnih N-glikana sa jezgarnom Fuc;
- izrazito gestacijsko smanjenje sadržaja $\alpha 2,6$ -sijalo-N-glikana (što je bio slučaj i sa IR, Slika 34).

Galektin-3 ima visok afinitet za ostatke Gal na krajevima lanaca N-glikana, afinitet je veći ukoliko je veće grananje, a afinitet mu jako opada dodatkom terminalne

$\alpha 2,6$ -Sia (Dennis i sar., 2009a). Galektin-3 je univerzalno prisutan na feto-maternalnoj površini, a njegova ekspresija dostiže pik sredinom gestacije (Lee i sar., 1998). Pokazano je da galektin-3 formira specifične strukture na površini ćelije vezujući membranske receptore (npr. neki iz familije TK) koji imaju veći broj N-glikozilovanih ostataka Asn sa multiantenarnim N-glikanima, jer sam galektin-3 ima više od jednog mesta za vezivanje Gal. Na ovaj način se produžava zadržavanje receptora na površini ćelije, čime se obezbeđuje efikasniji odgovor na signale faktora rasta (Dennis i sar., 2009a). Može se pretpostaviti da je u prvom trimestru, u invazivnoj fazi trofoblasta, potrebno držati pod kontrolom interakciju galektina-3 sa multiantenarnim N-glikanima na IGF1R, tako što će ostaci Gal biti pokriveni ostacima $\alpha 2,6$ -Sia. Time bi se moglo objasniti nisko vezivanje IGF1R za PHA-L, jer uzorci nisu desijalnizovani pre LAH na PHA-L koloni.

Glikoforme IGF1R su detektovane i u imunoblotu sa anti-IGF1R antitelima. Prethodno su na kolone napunjene lektin-agaroznim gelovima naneta dva zbirna uzorka (bez preinkubacije sa 125 I-desIGF-I): pul PPT solubilizata i pul PTT solubilizata. Nakon eluiranja IGF1R, elektroforetskog razdvajanja pomoću SDS-PAGE i transfera na nitroceluloznu membranu, urađen je blot sa anti-IGF1R antitelima (Slika 40). Imunoreaktivni IGF1R je detektovan i u PPT i u PTT uzorcima. Takođe se uočava da se placentni IGF1R, u većem ili manjem stepenu, vezivao za sve ispitivane lektine. Najintenzivnija je imunoreaktivna traka IGF1R iz PTT, eluirana sa SNA-agaroze. Interesantno je da je SNA-reaktivna traka iz PTT bila i najintenzivnija traka na imunoblotu IR (Slika 35).



Slika 40. Imunoblot analiza IGF1R iz zbirnih uzoraka solubilizata placenti prvog (PPT) i trećeg trimestra (PTT), eluiranih sa lektinskih kolona i razdvajanih elektroforezom u neredukujućim uslovima na 8% gelu. Korišćena su anti-IGF1R antitela (razblaženje 1:400). Eluati sa različitih lektinskih kolona označeni su brojevima: SNA (1,6), Con A (2,7), PHA-L (3,8), LCA (4,9), AAL (5,10).

Redosled intenziteta traka IGF1R iz PTT dobijen imunoblotom je sledeći: SNA>>LCA>Con A>AAL≈PHA-L, a redosled vezivanja 125 I-desIGF-I-IGF1R kompleksa za iste lektine: AAL>LCA>Con A>SNA, PHA-L (Slika 39). I ovde se, kao i kod rezultata dobijenih za IR, može pretpostaviti da na redosled reaktivnosti glikoformi IGF1R sa lektinima utiče metod detekcije receptora, jer se 125 I-ligand vezuje za funkcionalne molekule receptora (očuvane konformacije), dok se antitela vezuju za sve imunoreaktivne forme, uz probleme koje nosi proizvodnja antitela imunizacijom životinja ne celim IGF1R, već nekim delom njegove sekvence. Traka IGF1R iz PTT uzorka, eluiranog sa AAL-agaroze bila je gotovo nevidljiva pri imunoblotu, što se ne slaže sa rezultatom dobijenim pomoću LAH, gde je vrednost procenta vezivanja kompleksa 125 I-desIGF-I-IGF1R za imobilizovani AAL bila najveća (Slika 39A i 39B). Može se pretpostaviti da je i kod IGF1R (slično kao i kod IR) došlo do uticaja 125 I-desIGF-I na interakciju receptora sa lektinom, moguće usled konformacione promene receptora. Dok je kod IR slabo vezivanje kompleksa 125 I-insulin-IR za SNA pratilo visoko vezivanje slobodnog IR za SNA, slobodan IGF1R ima neznatno vezivanje za AAL-agarozu, dok kompleks 125 I-desIGF-I-IGF1R ima veliku vrednost vezivanja za isti lektin. U slučaju IGF1R, dakle, ligand je povećao afinitet receptora za lektin.

4.2.2.3. Uticaj dijabetesa na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 1

U odeljku 4.1.3.1 prikazane su promene profila N-glikana placentalnih membranskih glikoproteina do kojih dolazi u trudnoćama komplikovanim dijabetesom majke i preeklampsijom. Potencijalni uticaj patologije trudnoće na N-glikanski profil IGF1R je, takođe, ispitan, na uzorcima solubilizata iz placenti trećeg trimestra, u kojima je prethodno ispitan ukupan membranski N-glikom i N-glikom IR. Ispitivani su uzorci: DM (n=6) i kontrolni uzorci ZP (n= 30). Za analizu je korišćena metoda LAH.

Procenti vezivanja preformiranih kompleksa 125 I-desIGF-I-IGF1R za 11 različitih lektina imobilizovanih na agarozu su prikazani u Tabeli 11. Iz tabele se vidi da se IGF1R izolovan iz placenti zdravih žena i žena sa DM vezivao za sve ispitivane lektine. Vezivanje IGF1R za UEA-I-agarozu je gotovo neznatno, slično dobijenom pri ispitivanju N-glikoma IR (Tabela 8). Ovo ukazuje na slabu ili nikakvu zastupljenost N-

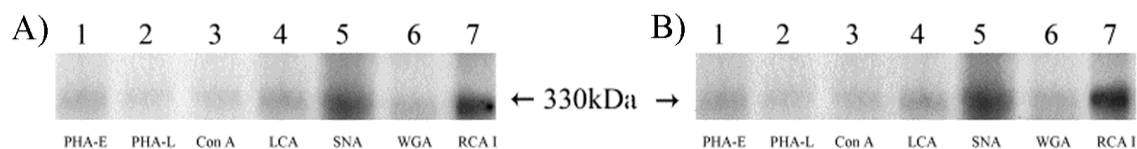
glikana, koji imaju terminalne ostatke L-Fuc vezane α 1,2-glikozidnom vezom za Gal (Baldus i sar., 1996), na IGF1R. Lee i Damjanov(1984) takođe nisu detektovali UEA-I glikotope lektinskom histohemijom preparata tkiva humane placente. Isto je i sa vezivanjem za MAL-II, koje ukazuje na odsustvo α 2,3-sijalo-N-glikana iz IGF1R.

Tabela 11. Vezivanje IGF1R za lektine imobilizovane na agarozu. Uzorci su solubilizati membrana ćelija placenti, dobijenih od zdravih (ZP) i žena sa dijabetesom (DM). Vezivanje je izraženo u procentima $\pm$ standardna devijacija (sd).

Lektin	WGA	sWGA	RCA-I	SNA	ECL	UEA-I
Uzorak						
ZP $\pm$ sd	9,5 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,7	16,5 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 0,7	15,5 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,6
DM $\pm$ sd	8,7 $\pm$ 2,1	1,3 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 1,7	6,3 $\pm$ 1,5	11,3 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 0,6
Lektin	LCA	Con A	PHA-E	PHA-L	MAL-II	
Uzorak						
ZP $\pm$ sd	8,2 $\pm$ 0,6	12,5 $\pm$ 0,7	13,7 $\pm$ 0,6	8,7 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,6	
DM $\pm$ sd	7,1 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 1,5	13,7 $\pm$ 2,1	7,3 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,6	

Vezivanje IGF1R za ECL-agarozu je najveće, što ukazuje na prisustvo disaharidne sekvence Gal β 1,4GlcNAc kako na biantenarnim (bez umetnutog GlcNAc), tako i na multiantenarnim N-glikanima (Wu i sar., 2007). Vezivanje za WGA ukazuje na prisustvo slobodne terminalne GlcNAc, ali i Sia, dok nisko vezivanje za sWGA pokazuje da se na krajevima lanaca N-glikana iz IGF1R nalazi α 2,6-vezana Sia, što je potvrđeno i vezivanjem za SNA. Statističkom obradom podataka prikazanih u Tabeli 11 **nisu nađene razlike u sadržaju N-glikana** između IGF1R iz kontrolne grupe i IGF1R iz placenti žena sa dijabetesom. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatom dobijenim pri ispitivanju uticaja dijabetesa majke na tip i sadržaj N-glikana vezanih za placentalni IR, gde takođe nisu utvrđene značajne razlike u odnosu na zdrave osobe.

Glikoforme IGF1R, koje su se vezale, a potom bile eluirane sa lektin-agaroznih kolona detektovane su i u imunoblotu sa anti-IGF1R antitelima. Na 7 različitih imobilizovanih lektina naneta su dva zbirna uzorka: pul DM solubilizata i pul ZP solubilizata, kao što je opisano u Odeljku 4.2.1.2. Na Slici 41 prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Rezultati imunoblota, nisu ukazali na postojanje razlika u sadržaju N-glikana vezanih za IGF1R između ZP i DM uzoraka placenti, što je potvrda nalaza dobijenih pomoću LAH.



Slika 41. Immunoblot analiza IGF1R iz zbirnih uzoraka solubilizata zdravih (ZP) (A) i placenti žena sa dijabetesom (DM) (B), eluiranih sa lektinskih kolona i razdvajanih elektroforezom u neredukujućim uslovima na 6% gelu. Korišćena su anti-IGF1R antitela (razblaženje 1:200). Brojevima su označeni eluati sa lektinskih kolona: 1 (PHA-E), 2 (PHA-L), 3 (Con A), 4 (LCA), 5 (SNA), 6 (WGA) i 7 (RCA-I).

Sumirani rezultati ispitivanja N-glikana vezanih za IGF1R:

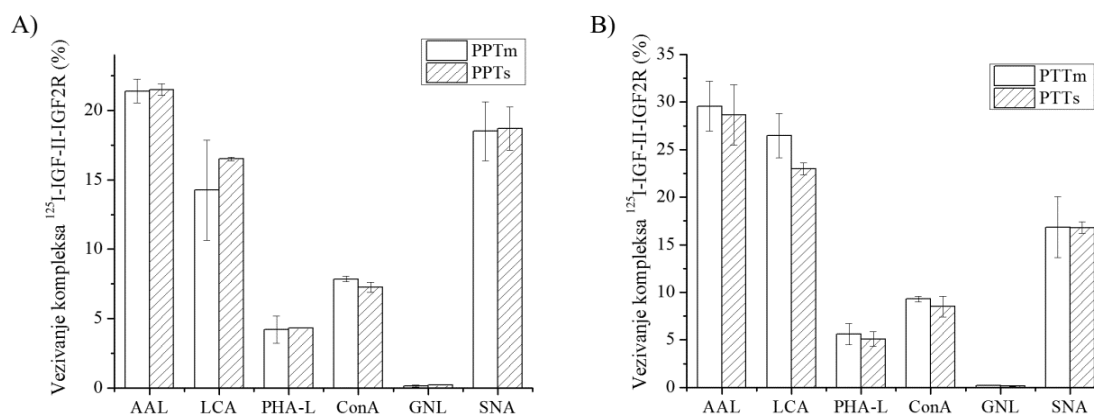
- Sa povećanjem starosti žena, u njihovim placentama dolazi do smanjenja sadržaja biantenarnih N-glikana, praćenog povećanjem sadržaja tri-i tetraantenarnih N-glikana vezanih za IGF1R, ali samo u prvom trimestru trudnoće;
- Tokom gestacije sadržaj α 2,6-sijalo-N-glikana se smanjuje, kao i sadržaj fukozilovanih N-glikana, dok se sadržaj biantenarnih N-glikana sa jezgarnom Fuc povećava;
- Moguće je da vezivanje 125 I-desIGF-I dovodi do promena u konformaciji IGF1R, čime se povećava izloženost ostataka L-Fuc lektinu AAL;
- Dijabetes ne dovodi do značajnih promena tipa i sadržaja N-glikana prisutnih na IGF1R.

4.2.3. N-glikani receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2

IGF2R nema nikakve homologije u sekvenci, niti sličnosti u strukturi sa receptorima iz familije TK: IR i IGF1R (Annunziata i sar., 2011). Jedino što ovaj receptor povezuje sa IR i IGF1R je molekul IGF-II, koji se vezuje za sva tri receptora, iako sa bitno različitim afinitetom (Annunziata i sar., 2011). IGF2R sadrži 19 potencijalnih mesta za N-glikozilaciju, od kojih su bar dva zaista i glikozilovana (Lobel i sar., 1987). Osim ovih šturih literaturnih podataka o glikanima na IGF2R se ne zna ništa. Stoga je cilj ove teze bio i ispitivanje sadržaja i tipa N-glikana koji su vezani za IGF2R, izolovan iz humane placentе. Pored toga, ispitan je uticaj starosti žena, gestacijske starosti placentе i DM majki na sastav N-glikana vezanih za IGF2R.

4.2.3.1. Uticaj starosti žena na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2

Za profilisanje N-glikana IGF2R primenjena je LAH metoda, a imunoblot sa anti-IGF2R antitelom je korišćen u cilju potvrde rezultata vezivanja za lektin. Analizirani su uzorci u kojima su prethodno ispitivani N-glikani vezani za IR i IGF1R: PPTm (n=7), PPTs (n=7), PTTm (n=15) i PTTs (n=15). Uzorci su pre nanošenja na kolone napunjene lektin-agarozom inkubirani sa 125 I-IGF-II. Vezivanje nastalih kompleksa 125 I-IGF-II-IGF2R za različite lektine, i eluiranje sa kolona praćeno je merenjem radioaktivnosti (Slika 42).



Slika 42. Vezivanje IGF2R za lektine imobilizovane na agarozu. Korišćeni su solubilizati placenti različite gestacijske starosti dobijeni od žena iz dve različite starosne grupe: A) PPTm, placentе prvog trimestra mladih žena; PPTs, placentе prvog trimestra starijih žena; B) PTTm, placentе trećeg trimestra mladih žena; PTTs, placentе trećeg trimestra starijih žena.

Kao što se sa Slike 42 može videti, IGF2R, iz svih placenti, se specifično vezuje za gotovo sve ispitivane lektine, osim za lektin specifičan za oligomanozne N-glikane: GNL (ni IR ni IGF1R se nisu vezivali za GNL). IGF2R se u najvećem stepenu vezuje za AAL (specifičan za ostatke L-Fuc na N-glikanima), LCA (prepoznaje biantenarne N-glikane sa jezgarnom Fuc) i SNA (specijalizovan za terminalne α 2,6-Sia). Ovi rezultati sugerišu da je IGF2R značajno fukozilovan (poseduje visok sadržaj npr. NGA2F i NA2F) i bogat α 2,6-Sia, što je naročito izraženo u uzorcima iz placenti prvog trimestra, o čemu će biti govora u narednom odeljku. Vezivanje IGF2R za PHA-L je relativno

malo, u poređenju sa vezivanjem za druge lektine. Ovo ne mora biti samo posledica niskog sadržaja multiantenarnih N-glikana, već i toga što se veliki broj antena završava ostacima α 2,6-Sia, što ometa vezivanje PHA-L za preposlednje ostatke Gal (Green i Baenziger, 1987), a uzorci namenjeni LAH receptora nisu desijalinizovani.

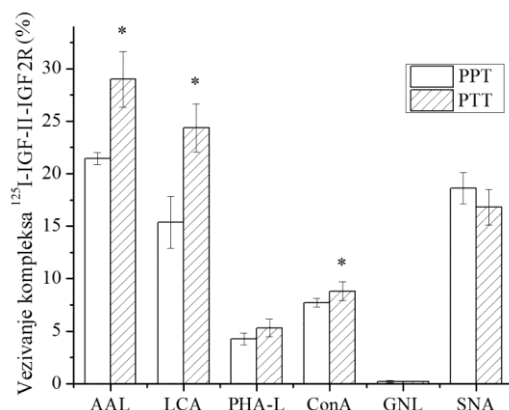
Poredeći rezultate LAH dobijene za tip glikana vezanih za IR (Slika 33), IGF1R (Slika 38) i IGF2R (Slika 42) može se zaključiti da sva tri receptora poseduju slične N-glikanske profile. Razlike u profilima N-glikana između tri receptora izgleda da potiču samo od razlika u sadržaju terminalnih ostataka α 2,6-Sia i stepena fukozilacije na antenama i u jezgru N-glikana. Na osnovu dobijenih rezultata, nije moguće kvantitativno porediti vrednosti vezivanja sva tri kompleksa 125 I-ligand-receptor za imobilizovane lektine, jer postoje i dodatni faktori koji mogu uticati na količinu kompleksa koja zaostaje na koloni sa lektinom: i) koncentracija samog receptora u solubilizatu; iako su na sve lektinske kolone nanošene jednake količine membranskih proteina, nije se znao sadržaj svakog pojedinačnog receptora, ii) afinitet receptora za 125 I-ligand, tj. broj obeleženih molekula receptora u odnosu na broj koji se ne obeleži, ali se vezuje za lektin; iii) prisustvo različitih glikoformi ispitivanih receptora; moguće je da jedna glikoforma istog receptora bude zastupljenija u odnosu na neku drugu, što bi dalo pogrešnu sliku o sadržaju glikanskih struktura.

Statističkom obradom podataka dobijenih pomoću LAH zaključeno je da starost žena od kojih potiču placentе, ne utiče na generalni profil zastupljenosti N-glikana vezanih za IGF2R, što je dobijeno i pri ispitivanju uticaja starosti na profile N-glikana IR iz placentе.

4.2.3.2. Uticaj gestacijske starosti na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2

Uticaj gestacijske starosti placentе na profile N-glikana koji ulaze u sastav IGF2R ispitan je na uzorcima: PPTm, PPTs, PTTm i PTTs. Rezultati vezivanja kompleksa 125 I-IGF-II-IGF2R za lektine prikazani su na Slici 43. Imajući u vidu da nije nađeno da starost žena utiče na profil vezivanja N-glikana IGF2R za lektine, grupe PPTm i PPTs su svrstane u jednu grupu - PPT, što je izvedeno i sa uzorcima iz trećeg trimestra - PTT. Potom su statistički poredene srednje vrednosti vezivanja IGF2R za

lektine, dobijene za PPT uzorke sa onima dobijenim za PTT uzorke. Rezultati su prikazani na Slici 43.

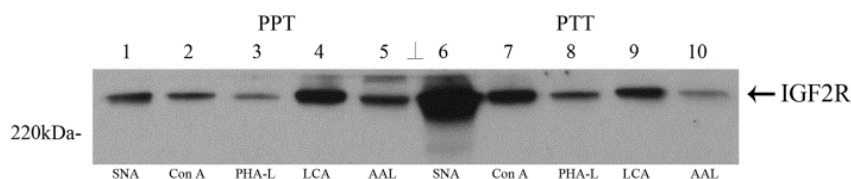


Slika 43. Vezivanje IGF2R za lektine imobilizovane na agarozu. Korišćeni su solubilizati iz placenti različite gestacijske starosti: PPT, placentе prvog trimestra; PTT, placentе trećeg trimestra. Zvezdicom je označeno postojanje statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

IGF2R iz PTT uzoraka se najviše vezao za AAL-agarozu (29,0%) i LCA-agarozu (24,4%). Najmanje vezivanje IGF2R dobijeno je za PHA-L-agarozu. Razlike u vezivanju IGF2R iz PTT i PPT za AAL-, LCA-, pa čak i za Con A-agarozu su bile statistički značajne ($p < 0,05$). U sva tri slučaja je vezivanje IGF2R za lektine bilo veće u PTT nego u PPT uzorcima. Veće vezivanje za AAL- i LCA-agarozu u PTT uzorcima ukazuje na gestacijsko povećanje sadržaja antenarne i jezgarne Fuc na N-glikanima IGF2R. Tokom gestacije, dakle, najverovatnije dolazi do promena u sadržaju određenih N-glikana, koji ulaze u sastav IGF2R, što je bio slučaj i sa IR i IGF1R.

Potvrda rezultata dobijenih sa LAH urađena je imunoblotom sa anti-IGF2R antitelima, nakon vezivanja i elucije IGF2R sa LAH, koje je izvedeno bez prethodne inkubacije uzoraka (pula PPT i PTT) solublizata sa ^{125}I -IGF-II. Dobijeni imunoblot prikazan je na Slici 44. Sa se uočava da je najintenzivnija imunoreaktivna traka IGF2R iz PTT uzorka eluiranog sa SNA-agaroze, dok je IGF2R traka iz istog uzorka sa AAL-agaroze slabog intenziteta. Poređenje ovih rezultata sa rezultatima dobijenim pomoću LAH (Slika 43), uočava se neslaganje. Kompleks ^{125}I -IGF-II-IGF2R iz PTT uzoraka se najjače vezivao za AAL-agarozu, i jače nego za SNA-agarozu. Moguće je da i u slučaju

IGF2R, ligand ^{125}I -IGF-II ima određeni uticaj na konformaciju receptora, čime se moduliše njegov afinitet za vezivanje određenih lektina.



Slika 44. Imunoblot analiza IGF2R, iz zbirnih uzoraka solubilizata placenti prvog (PPT) i trećeg trimestra (PTT), eluiranih sa lektinskih kolona i razdvojenih elektroforezom pri neredukujućim uslovima na 8% gelu. Korišćena su anti-IGF2R antitela (razblaženje 1:2000). Eluati sa različitih lektinskih kolona označeni su brojevima: SNA (1,6), ConA (2,7), PHA-L (3,8), LCA (4,9), AAL (5,10).

4.2.3.3. Uticaj dijabetesa na sastav N-glikana receptora za faktor rasta sličan insulinu tip 2

Analiza N-glikoformi IGF2R iz placenti dobijenih od žena sa DM (n=6) urađena je na solubilizatima membrana iz placenti trećeg trimestra, pomoću LAH. Radi poređenja korišćeni su rezultati dobijeni analizom N-glikana IGF2R iz placenti zdravih trudnica istog trimestra (ZP, n=30). Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 12.

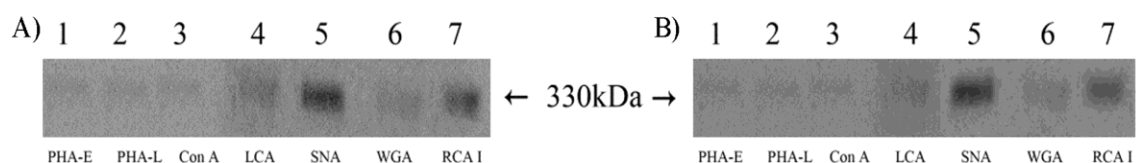
Tabela 12. Vezivanje IGF2R za lektine imobilizovane na agarozu. Uzorci su solubilizati membrana ćelija placenti, dobijenih od zdravih (ZP) i žena sa dijabetesom (DM). Vezivanje je izraženo u procentima $\pm$ standardna devijacija (sd).

Lektin Uzorak	WGA	sWGA	RCA-I	SNA	ECL	UEA-I
ZP $\pm$ sd	18,5 $\pm$ 3,5	4,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 2,1	26,5 $\pm$ 0,6	7,7 $\pm$ 3,1	2,5 $\pm$ 0,7
DM $\pm$ sd	17,3 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 0,6	12,0 $\pm$ 1,1	21,7 $\pm$ 1,5	8,7 $\pm$ 0,6	3,0 $\pm$ 0,1
Lektin	LCA	Con A	PHA-E	PHA-L	MAL-II	
ZP $\pm$ sd	7,9 $\pm$ 1,1	11,5 $\pm$ 0,7	14,5 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,6	
DM $\pm$ sd	8,5 $\pm$ 1,1	10,3 $\pm$ 1,2	14,7 $\pm$ 1,2	8,3 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,6	

IGF2R se, bez obzira da li potiče iz placenti ZP ili DM grupe, vezuje za iste imobilizovane lektine. Statističkom analizom nije nađena značajna razlika u vezivanju IGF2R za lektine između grupa. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim

pri ispitivanju uticaja DM na N-glikane vezane za IR (Odeljak 4.2.1.4) i IGF1R (Odeljak 4.2.2.3.). Najveće vezivanje IGF2R je ostvareno sa PHA-E. PHA-E vezuje biantenarne glikane koji imaju terminalnu Gal, dok prisustvo umetnutog GlcNAc povećava afinitet (Tabela 1, Odeljak 2.4.1.). To bi značilo da je IGF2R, kao i IR i IGF1R, bogat strukturama tipa NA2.

Rezultati dobijeni pomoću LAH su provereni imunoblotom. Glikoforme IGF2R (iz pula DM solubilizata i pula ZP solubilizata), koje su se vezale, pa potom bile sakupljene u eluatima sa 7 lektinskih kolona, su blotovane anti-IGF2R antitelima. Na Slici 45 prikazani su reprezentativni imunoblotovi.



Slika 45. Imunoblot analiza IGF2R, iz zbirnih uzoraka solubilizata placenti zdravih (ZP) (A) i žena sa dijabetesom (DM) (B), eluiranih sa lektinskih kolona i razdvojenih pomoću SDS-PAGE, u neredukujućim uslovima na 6% gelu. Korišćena su anti-IGF2R antitela (razblaženje 1:2000). Redni brojevi predstavljaju eluate sa lektinskih kolona: 1 (PHA-E), 2 (PHA-L), 3 (Con A), 4 (LCA), 5 (SNA), 6 (WGA) i 7 (RCA-I).

Sa imunoblota na Slici 45 se uočavaju trake imunoreaktivnog IGF2R koji je bio vezan za sve lektinske kolone, iako su trake sa PHA-L-, PHA-E- i Con A-agaroze jedva vidljive. Između imunoblotova IGF2R (kao i u slučaju IR i IGF1R), sa pulovima DM i ZP, nema značajne razlike.

Sumirani rezultati ispitivanja N-glikana iz IGF2R:

- starost žena nema uticaja na sadržaj i tip N-glikana prisutnih na IGF2R;
- tokom gestacije povećava se sadržaj antenarne i jezgarne Fuc;
- moguće je da vezivanje ^{125}I -IGF-II dovodi do promena u konformaciji IGF2R, što verovatno doprinosi povećanoj izloženosti Fuc ostataka lektinima specifičnim za Fuc;
- dijabetes ne dovodi do značajnih promena tipa i sadržaja N-glikana vezanih za IGF2R.

4.2.3.4. Sumirani rezultati ispitivanja uticaja gestacije na sadržaj N-glikana IR, IGF1R i IGF2R

Tokom gestacije na IR i IGF1R se smanjuje sadržaj N-glikana koji nose Fuc i $\alpha 2,6$ -Sia, dok se kod IGF2R smanjuje samo sadržaj N-glikana koji nose Fuc, bez promene u sadržaju $\alpha 2,6$ -Sia (Tabela 13).

Tabela 13. Uticaj gestacijske starosti na sadržaj N-glikana receptora IGF sistema. Pregled najbitnijih rezultata.

ReceptorN-glikani sa...	IR	IGF1R	IGF2R
	tokom gestacije		
Fuc	opada	opada	opada
$\alpha 2,6$-Sia	opada	opada	nema promene

Trend promene specifičnih N-glikana je isti za oba receptora iz grupe TK: IR i IGF1R. Ove receptore kodiraju geni za koje se smatra da vode poreklo iz jedno istog pra-gena. Zbog toga i ne čudi visok stepen homologije koji dele IR i IGF1R: i) oba spadaju u transmembranske TK, i za razliku od ostalih članova te familije, ovi receptori postoje kao tetrameri strukture $\alpha_2\beta_2$ (kod ostalih TK tetramer se formira nakon vezivanja liganda); ii) eksperimentalno je pokazano da se funkcije IR i IGF1R delimično preklapaju (Kim i Accili, 2002). Shodno tome, trend uočenih promena je logičan ako se radi o regulaciji N-glikozilacije razvićem, koja bi uključila promenjenu ekspresiju nekih gliko-gena tokom gestacije, npr. utišavanje ekspresije jedne ili više FUT. Takva promena bi se odrazila na sve membranske proteine na kojima FUT ispoljavaju aktivnost, a u ovoj tezi su ispitana samo tri: IR, IGF1R i IGF2R. Za potvrdu ove pretpostavke trebalo bi proveriti ekspresiju iRNK za neke FUT i/ili proveriti N-glikanski profil još ponekog membranskog proteina iz humane placente.

FUT4 je $\alpha 1,3$ -fukozil-transferaza, koja dodaje Fuc na ostatak GlcNAc iz LacNAc sekvence N-glikana (Becker i Lowe, 2003, Odeljak 2.3.2.1.). Tako nastaje Le^x glikotop, koji će prepoznati i vezati AAL lektin. Ekspresija gena *FUT4* je često veća u tumorskim ćelijskim linijama nego u odgovarajućim normalnim ćelijama (Yang i sar., 2013). Pokazano je da prekomerna ekspresija FUT4 ide skupa sa povećanjem migracijskog potencijala ćelije. Takođe se zna da je FUT4 uključena u procese ćelijske migracije, invazivnosti i metastaze kancera (Yang i sar., 2013). Placenta prvog trimestra

po mnogo čemu podseća na tumor, naročito biologija invazivnog trofoblasta (Murray i sar., 1999), ali se taj proces brzo zaustavlja kad implantacija dostigne određeni stepen. Pod pretpostavkom da su supstrati za FUT4 u placenti i IR i IGF1R (a nema razloga da ne budu, jer glikozil-transferaze u Goldžijevom aparatu nisu protein-specifične), jasno je zašto je veći sadržaj N-glikana koji nose Le^x glikotop u placentama prvog nego u placentama trećeg trimestra.

Primećeno je i da vezivanje ¹²⁵I-insulina smanjuje afinitet IR za Sia-specifični lektin (SNA). Kao što je već rečeno, sve je više radova koji se bave značajem Sia za funkcionisanje glikoproteina. Promena u sadržaju Sia utiče na funkciju IR (Pshezhetsky i Ashmarina, 2013), i njegovu aktivaciju posle vezivanja insulina (Dridi i sar., 2013). Pokazano je da desijalinizacija IR povećava njegov afinitet spram insulina (Arabkhari i sar., 2010), a moguće je da se na taj način, pored strukture, menja i lokalizacija i funkcija IR (Pshezhetsky i Ashmarina, 2013). Sa druge strane, kod IGF1R i IGF2R vezivanje liganda povećava afinitet ovih receptora za Fuc-specifični lektin (AAL). Moguće je da se afinitet IGF1R i IGF2R za njihove ligande kontroliše preko Fuc, a ne preko Sia (što je bio slučaj sa IR). AAL lektin prepoznaje terminalnu i jezgarnu Fuc, a pokazano je i da prisustvo terminalne Fuc (u α 1,3 položaju) pospešuje adheziju i implantaciju embriona (Aplin i Jones, 2012). Moguće je da se lokalizacija i funkcija IR kontrolišu sijalinizacijom, a lokalizacija i funkcija IGF1R i IGF2R fukozilacijom.

5. Zaključci

- Po prvi put je analiziran N-glikom solubilizovanih membranskih proteina iz humane placente:
 - Utvrđeno je jedanaest tipova kompleksnih N-glikana koji se vezuju za membranske proteine.
 - Starost žena ne utiče na N-glikom solubilizovanih membranskih proteina.
 - Tokom gestacije dolazi do povećanja u sadržaju paucimanoznih, NA2F i NA3F struktura N-glikana kompleksnog tipa, dok opada sadržaj NGA2, max4, NA2, max6, i NA2FB.
 - Tokom gestacije dolazi do povećanja u sadržaju N-glikana sa jezgarnom Fuc i multiantenarnih N-glikana, dok se sadržaj N-glikana sa umetnutim GlcNAc smanjuje.
 - Preeklampsija dovodi do povećane zastupljenosti manjih N-glikana (kao što su paucimanozne strukture, NGA2 i max4), i do smanjene zastupljenosti većih N-glikana (kao što su NA2, max6 i NA3F).

- Pri ispitivanju N-glikoma receptora (**IR**, **IGF1R** i **IGF2R**) izvedeni su sledeći zaključci:
 - Starost žena ne utiče na sastav N-glikana vezanih za **IR** i **IGF2R**.
 - Tokom gestacije sadržaj N-glikana sa ostacima L-Fuc, biantenarnih N-glikana, i N-glikana koji se završavaju sa α 2,6-Sia vezanih za **IR** se smanjuje.
 - U prvom trimestru trudnoće, na **IGF1R** dolazi do smanjenja sadržaja biantenarnih N-glikana, i povećanja sadržaja tri- i tetraantenarnih N-glikana.
 - Tokom gestacije sadržaj fukozilovanih i N-glikana koji se završavaju sa α 2,6-Sia, vezanih za **IGF1R** se smanjuje, dok se povećava sadržaj N-glikana sa jezgarnom Fuc.
 - Sadržaj fukozilovanih N-glikana, vezanih za **IGF2R**, se povećava tokom gestacije.
 - Preeklampsija i dijabetes, ne menjaju bitno sadržaj N-glikana vezanih za **IR**, **IGF1R** i **IGF2R**.
 - Prisustvo određenih glikana na **IR** (Sia), **IGF1R** (Fuc) i **IGF2R** (Fuc) menja njihove interakcije sa ligandima i afinitet prema lektinima, čime se verovatno moduliše lokalizacija i funkcija ovih receptora u tkivu placente.

6. Literatura

Adamczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM (2012) Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 1820:1347-1353.

Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW (2000) Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1050-1093.

Annunziata M, Granata R, Ghigo E (2011) The IGF system. *Acta Diabetol* 48:1-9.

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473:4-8.

Aplin JD, Jones CJP (2012) Fucose, placental evolution and glycode. *Glycobiology* 22:470-478.

Arabkhari M, Bunda S, Wang Y, i sar. (2010) Desialylation of insulin receptors and IGF-1 receptors by neuraminidase-1 controls the net proliferative response of L6 myoblasts to insulin. *Glycobiology* 20:603-616.

Bach LA, Hsieh S, Sakano K, i sar. (1993) Binding of mutants of human insulin-like growth factor II to insulin like growth factor binding proteins 1-6. *J Biol Chem* 268:9246-9254.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82.

Baldus SE, Thiele J, Park YO (1996) Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) in comparison to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) *Glycoconj J* 13:S585-590.

Ballard FJ, Wallace JC, Francis GL, i sar. (1996) Des(1-3)IGF-I: a truncated form of insulin-like growth factor-I. *Int J Biochem Cell Biol* 28:1085-1087.

Balog CIA, Stavenhagen K, Fung WLJ, i sar. (2012) N-glycosylation of colorectal cancer tissues. *Mol Cell Proteomics* 11:571-585.

Balzarini (2007) Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Microbiol* 5:583-597.

Baenziger JU, Fiete D (1979) Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J Biol Chem* 254:789-795.

Barb AW, Prestegard JH (2011) NMR analysis demonstrates immunoglobulin G N-glycans are accessible and dynamic. *Nat Chem Biol* 7:147-153.

Baxter RC (2000) Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol* 278:E967-976.

Becker DJ, Lowe JB (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13:R41-53.

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, et al. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 30:586-623.

Bell GI, Gerhard DS, Fong NM, et al. (1985) Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6450-6454.

Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW (1993) Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 268:19161-19164.

Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, et al. (2001) The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol* 170:63-70.

Bolte AC, van Geijn HP, Dekker GA (2001) Management and monitoring of severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96:8-20.

Brennan WA Jr (1988) Developmental aspects of the rat brain insulin receptor: loss of sialic acid and fluctuation in number characterize fetal development. *Endocrinology* 122:2364-2370.

Brewer CF, Bhattacharyya L (1986) Specificity of concanavalin A binding to asparagine-linked glycopeptides. A nuclear magnetic relaxation dispersion study. *J Biol Chem* 261:7306-7310.

Brown J, Delaine C, Zaccheo OJ, et al. (2008) Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction. *EMBO J* 9:265-276.

Büll C, Stoel MA, den Brok MH, Adema GJ (2014) Sialic acids sweeten a tumor's life. *Cancer Res* 74:3199-3204.

Callewaert N, Geysens S, Molemans F, Contreras R (2001) Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligo-saccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology* 11:275-281.

Carlsson-Skwirut C, Lake M, Hartmanis M, et al. (1989) A comparison of the

biological activity of the recombinant intact and truncated insulin-like growth factor I. *Biochim Biophys Acta* 1011:192-197.

Chen VP, Choi RC, Chan WK, i sar. (2011) The assembly of proline-rich membrane anchor (PRiMA)-linked Acetyl-cholinesterase enzyme: glycosylation is required for enzymatic activity but not for oligomerization. *J Biol Chem* 286:32948-32961.

Chevalier F (2010) Standard dyes for total protein staining in gel-based proteomic analysis. *Materials* 3:4784-4792.

Choi S-Y, Yun J, Lee O-J, i sar. (2013) MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using PNA-based microarray. *Placenta* 34:799-804.

Clairmont KB, Czech MP (1991) Extracellular release as the major degradative pathway of the IGF-II/M6P receptor. *J Biol Chem* 266:12131-12134.

Colomiere M, Permezel M, Riley C, i sar. (2009) Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 160:567-578.

Collier E, Carpentier J-L, Beitz L, i sar. (1993) Specific glycosylation site mutations of the insulin receptor α subunit impair intracellular transport. *Biochemistry* 32:7818-7823.

Cummings RD, Kornfeld S (1982) Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-agarose affinity chromatography. *J Biol Chem* 257:11235-11240.

Cummings RD (2009) The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol Biosyst* 5:1087-1104.

Dall'Olio F, Vanhooren V, Chen CC, sar. (2013) N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Res Rev* 12:685-698.

Damsky CH, Librach C, Lim KH, i sar. (1994) Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120:3657-3666.

Daughaday WH, Rotwein P (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68-91.

De Beer T, Van Zuylen CW, Leeftang BR, i sar. (1996) NMR studies of the free α subunit of human chorionic gonadotropin. Structural influences of N-

glycosylation and the beta subunit on the conformation of the alpha subunit. *Eur J Biochem* 241:229-242.

Debray H, Decout D, Strecker G, i sar. (1981) Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem* 117:41-55.

DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ (1990) A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345:78-80.

Dennis JW, Granovsky M, Warren C.E (1999) Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* 21:412-421.

Dennis JW, Pawling J, Cheung P, i sar. (2002) UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1573:414-422.

Dennis JW, Nabi IR, Demetriou M (2009)a Metabolism, cell surface organization, and disease. *Cell* 139:1229-1241.

Dennis JW, Lau KS, Demetriou M, Nabi IR (2009)b Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation. *Traffic* 10:1569-1578.

Desoye G, Hartmann M, Blaschitz A, i sar. (1994) Insulin receptors from syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern. *Histochemistry* 101:277-285.

Desoye G, Hauguel-de Mouzon S (2007) The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 2:S120-126.

Ding N, Nie H, Sun X, i sar. (2011) Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing* 40:568-575.

Dridi L, Seyrantepe V, Fougerat A, i sar. (2013) Positive regulation of insulin signaling by neuraminidase 1. *Diabetes* 62:2338-2346.

Du Y, Wei T (2014) Inputs and outputs of insulin receptor. *Protein Cell* 5:203-213.

Duan C, Xu Q (2005) Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol* 142:44-52.

Duronio V, Jacobs S, Cuatrecasas P (1986) Complete glycosylation of the

insulin and insulin-like growth factor I receptors is not necessary for their biosynthesis and function. Use of swainsonine as an inhibitor in IM-9 cells. *J Biol Chem* 261:970-975.

Fang M, Dewaele S, Zhao Y, i sar. (2010)a Serum N-glycome biomarker for monitoring development of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rat. *Mol Cancer* 9:215-229.

Fang M, Zhao YP, Zhou FG, i sar. (2010)b N-glycan based models improve diagnostic efficacies in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Int JCancer* 127:148-159.

Fareed M, Afzal M (2013) Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. *Egypt J Med Hum Genet* 2:123-134.

Ferrara C, Grau S, Jäger C, i sar. (2011) Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12669-12674.

Firth SM, Baxter RC (1999) Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* 160:379-387.

Forbes K, Westwood M (2008) The IGF axis and placental function. A mini-review. *Horm Res* 69:129-137.

Frasca F, Pandini G, Scalia P, i sar. (1999) Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 19:3278-3288.

Fu D, Chen L, O'Neill RA (1994) A detailed structural characterisation of ribonuclease B oligosaccharides by ¹H NMR spectroscopy and mass spectrometry. *Carbohydr Res* 261:173-186.

Fujita-Yamaguchi Y, Choi S, Sakamoto Y, Itakura K (1983) Purification of insulin receptor with full binding activity. *J Biol Chem* 258:5045-5049.

Ganguly P, Fossett NG (1984) The role of sialic acid in the activation of platelets by wheat germ agglutinin. *Blood* 63:181-187.

Gatenby VK, Imrie H, Kearney M (2013) The IGF-1 receptor and regulation of nitric oxide bioavailability and insulin signalling in the endothelium. *Eur J Physiol* 465:1065-1074.

Gao XD, Tachikawa H, Sato T, i sar. (2005) Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation. *J Biol Chem* 280:36254-36262.

Geisler C, Jarvis DL (2011) Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* 21:988-993.

Georgieff MK, Petry CD, Mills MM, i sar. (1997) Increased N-glycosylation and reduced transferrin-binding capacity of transferrin receptor isolated from placentae of diabetic women. *Placenta* 18:563-568.

Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:202-212.

Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, i sar. (1993) Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet* 4:98-101.

Girnit L, Worrall C, Takahashi S, i sar. (2014) Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. *Cell Mol Life Sci* 71:2403-2427.

Glavey SV, Huynh D, Reagan MR, i sar. (2015) The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Rev* 29:269-279.

Gornik O, Wagner J, Pucić M, i sar. (2009) Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* 19:1547-1553.

Gornik O, Pavić T, Lauc G (2012) Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 1820:1318-1326.

Goto Y, Niwa Y, Suzuki T, i sar. (2014) C-mannosylation of human hyaluronidase 1: possible roles for secretion and enzymatic activity. *Int J Oncol* 45:344-350.

Graham ME, Kilby DM, Firth SM, i sar. (2007) The in vivo phosphorylation and glycosylation of human insulin-like growth factor-binding protein-5. *Mol Cell Proteomics* 6:1392-1405.

Green ED, Baenziger JU (1987) Oligosaccharide specificities of *Phaseolus*

vulgaris leukoagglutinating and erythroagglutinating phytohemagglutinins. *J Biol Chem* 262:12018-12029.

Gu J, Isaji T, Xu Q, i sar. (2012) Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconj J* 29:599-607.

Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 114:397-407.

Gudelj I, Keser T, Vučković F, i sar. (2014) Estimation of human age using N-glycan profiles from bloodstains. *Int J Legal Med* doi:10.1007/s00414-015-1162-x.

Haga Y, Ishii K, Suzuki T (2011) N-glycosylation is critical for the stability and intracellular trafficking of glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem* 286:31320-31327.

Haltiwanger RS, Lowe JB (2004) Role of glycosylation in development. *Ann Rev Biochem* 73:491-537.

Harada H, Kamei M, Tokumoto Y, i sar. (1987) Systematic fractionation of oligosaccharides of human immunoglobulin G by serial affinity chromatography on immobilized lectin columns. *Anal Biochem* 164:374-381.

Harada Y, Hirayama H, Suzuki T (2015) Generation and degradation of free asparagine-linked glycans. *Cell Mol Life Sci* 72:2509-2533.

Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, i sar. (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83:727-737.

Harris LK, Crocker IP, Baker PN, i sar. (2011) IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor. *Biol Reprod* 84:440-446.

Harvey DJ, Royle L, Radcliffe CM, i sar. (2008) Structural and quantitative analysis of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption ionization and negative ion nanospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 376:44-60.

Hauguel-de Mouzon S, Louizeau M, Girard J (1992) Functional alterations of type I insulin-like growth factor receptor in placenta of diabetic rats. *Biochem J* 288:273-279.

Hedo JA, Kasuga M, Van Obberghen E, i sar. (1981) Direct demonstration of glycosylation of insulin receptor subunits by biosynthetic and external labeling: evidence for heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4791-4795.

Herzberg VL, Grigorescu F, Edge AS, i sar. (1985) Characterization of insulin

receptor carbohydrate by comparison of chemical and enzymatic deglycosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 129:789-796.

Hidden U, Glitzner E, Hartmann M, Desoye G (2009) Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *J Anat* 215:60-68.

Hille-Rehfeld A (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1241:177-194.

Hoeck WG, Mukku VR (1994) Identification of the major sites of phosphorylation in IGF binding protein 3. *J Cell Biochem* 56:262-273.

Horvat T, Zoldoš V, Lauc G (2011) Evolutional and clinical implications of the epigenetic regulation of protein glycosylation. *Clin Epigenetics* 2:425-432.

Horvat T, Mužinić A, Barišić D, i sar. (2012) Epigenetic modulation of the HeLa cell membrane N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 1820:1412-1419.

Horvat T, Deželjin M, Redžić I, i sar. (2013) Reversibility of membrane N-glycome of HeLa cells upon treatment with epigenetic inhibitors. *PLoS One* 8:e54672.

Huffman JE, Knežević A, Vitart V, i sar. (2011) Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and MGAT5 are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults. *Hum Mol Genet* 20:5000-5011.

Huhn C, Selman MHJ, Ruhaak LR, i sar. (2009) IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 9:882-913.

Hwa V, Oh J, Rosenfeld RG (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20:761-787.

Hwang JB, Frost SC (1999) Effect of alternative glycosylation on insulin receptor processing. *J Biol Chem* 274:22813-22820.

Hwang JB, Hernandez J, Leduc R, Frost SC (2000) Alternative glycosylation of the insulin receptor prevents oligomerization and acquisition of insulin-dependent tyrosine kinase activity. *Biochim Biophys Acta* 1499:74-84.

Ide Y, Miyoshi E, Nakagawa T, i sar. (2006) Aberrant expression of N-acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 341:478-482.

Ihara Y, Sakamoto Y, Mihara M, i sar. (1997) Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III disrupts the tyrosine phosphorylation of Trk with

resultant signaling dysfunction in PC12 cells treated with nerve growth factor. *J Biol Chem* 272:9629-9634.

Ikeda H, Shiojima I, Oka T, i sar. (2011) Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol* 31:1054-1065.

Iñiguez G, González CA, Argandoña F, i sar. (2010) Expression and protein content of IGF-I and IGF-I receptor in placentas from small, adequate and large for gestational age newborns. *Horm Res Paediatr* 73:320-327.

Itakura Y, Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, i sar. (2007) Systematic comparison of oligosaccharide specificity of *Ricinus communis* agglutinin I and *Erythrina* lectins: a search by frontal affinity chromatography. *J Biochem* 142:459-469.

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33S:245-254.

Jain D, Kaur KJ, Goel M, Salunke DM (2000) Structural basis of functional mimicry between carbohydrate and peptide ligands of con A. *Biochem Biophys Res Commun* 272:843-849.

Janik ME, Lityńska A, Vereecken P (2010) Cell migration - the role of integrin glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1800:545-555.

Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, i sar. (2007) Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta* 28:1165-1173.

Jones JI, Busby WH Jr, Wright G, i sar. (1993) Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth factor binding protein-1. Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *J Biol Chem* 268:1125-1131.

Jones CJP, Aplin JD (2009) Glycosylation at the fetomaternal interface: Does the glycode play a critical role in glycosylation? *Glycoconj J* 26:359-366.

Kalipatnapu S, Chattopadhyay A (2005) Membrane organization of the human serotonin(1A) receptor monitored by detergent insolubility using GFP fluorescence. *Mol Membr Biol* 22:539-547.

Kam RK, Poon TC, Chan HL, i sar. (2007) High-throughput quantitative profiling of serum N-glycome by MALDI-TOF mass spectrometry and N-glycomic fingerprint of liver fibrosis. *Clin Chem* 53:1254-1263.

Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313:670-673.

Karamessinis PM, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, i sar. (2008) Marked defects in the expression and glycosylation of α_2 -HS glycoprotein/fetuin-A in plasma from neonates with intrauterine growth restriction. Proteomics screening and potential clinical implications. *Mol Cell Proteomics* 7:591-599.

Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, i sar. (2008) DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 135:142-151.

Keck RG, Briggs JB, Jones AJS (2005) Oligosaccharide release and MALDI-TOF MS analysis of N-linked carbohydrate structures from glycoproteins. Therapeutic Proteins. *Methods Mol Biol* 308:381-396.

Keikkala E, Vuorela P, Laivuori H, i sar. (2013) First trimester hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin in serum. A marker of early-onset preeclampsia. *Placenta* 34:1059-1065.

Kim JJ, Accili D (2002) Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm IGF Res* 12:84-90.

Kirwan A, Utratna M, O'Dwyer ME, i sar. (2015) Glycosylation-based serum biomarkers for cancer diagnostics and prognostics. *Biomed Res Int* 450531.

Knežević A, Polašek O, Gornik O, i sar. (2009) Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res* 8:694-701.

Knežević A, Gornik O, Polašek O, i sar. (2010) Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology* 20:959-969.

Kornfeld K, Reitman ML, Kornfeld R (1981) The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. *J Biol Chem* 256:6633-6640.

Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Ann Rev Biochem* 61:307-333.

Kostecká Z, Blahovec J (2002) Animal insulin-like growth factor binding proteins and their biological functions. *Vet Med-Czech* 47:75-84.

Kunkel JP, Jan DC, Jamieson JC, Butler M (1998) Dissolved oxygen

concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol* 62:55-71.

Lamminpää R, Vehviläinen-Julkunen K, Gissler M, Heinonen S (2012) Preeclampsia complicated by advanced maternal age: a registry-based study on primiparous women in Finland 1997-2008. *BMC Pregnancy Childbirth* 12:47.

Laroy W, Contreras R, Callewaert N (2006) Glycome mapping on DNA sequencing equipment. *Nat Protoc* 1:397-405.

Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, i sar. (2007) Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129:123-134.

Lauc G, Zoldoš V (2009) Epigenetic regulation of glycosylation could be a mechanism used by complex organisms to compete with microbes on an evolutionary scale. *Med Hypotheses* 73:510-512.

Lauc G, Zoldoš V (2010) Protein glycosylation - an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst* 6:2373-2379.

Lauc G, Rudan I, Campbell H, Rudd PM (2010)a Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol Biosyst* 6:329-335.

Lauc G, Essafi A, Huffman JE, i sar. (2010)b Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet* 6:e1001256.

Lauc G, Krištić J, Zoldoš V(2014) Glycans - the third revolution in evolution. *Front Genet* 5:145.

Lawrence MC, McKern NM, Ward CW (2007) Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr Opin Struct Biol* 17:699-705.

Lee MC, Damjanov I (1984) Lectin histochemistry of human placenta. *Differentiation* 28:123-128.

Lee VH, Lee AB, Phillips EB, i sar. (1998) Spatio-temporal pattern for expression of galectin-3 in the murine utero-placental complex: evidence for differential regulation. *Biol Reprod* 58:1277-1282.

Lee CL, Chiu PC, Pang PC, i sar. (2011) Glycosylation failure extends to glycoproteins in gestational diabetes mellitus: evidence from reduced α 2-6 sialylation

and impaired immunomodulatory activities of pregnancy-related glycodefin-A. *Diabetes* 60:909-917.

Li FX, Yang XX, Hu NY, i sar. (2012) Single-nucleotide polymorphism associations for colorectal cancer in southernchinese population. *Chin J Cancer Res* 24:29-35.

Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ, editori (1986) U knjizi: The lectins - properties, functions and applications in biology and medicine. Izdavač: Academic Press, Orlando, Florida, USA.

Liu JP, Baker J, Perkins AS, i sar. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.

Liu AX, Jin F, Zhang WW, i sar. (2006) Proteomic analysis on the alteration of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. *Biol Reprod* 75:414-420.

Liu XE, Desmyter L, Gao CF, i sar. (2007) N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus. *Hepatology* 46:1426-1435.

Liu YC, Yen HY, Chen CY, i sar. (2011) Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:11332-11337.

Liu X, Nie H, Zhang Y, i sar. (2013) Cell surface-specific N-glycan profiling in breast cancer. *Plos One* 8:e72704.

Lo WY, Lagrange AH, Hernandez CC, i sar. (2010) Glycosylation of $\beta 2$ subunits regulates GABAA receptor biogenesis and channel gating. *J Biol Chem* 285:31348-31361.

Lobel P, Dahms NM, Breitmeyer J i sar. (1987) Cloning of the bovine 215-kDa cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2233-2237.

Lobel P, Dahms NM, Kornfeld S (1988) Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263:2563-2570.

Loris R, Hamerlyck T, Bouckaert J, Wyns L (1998) Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta* 1383:9-36.

Lou M, Garrett TPJ, McKern NM, i sar. (2006) The first three domains of the insulin receptor differ structurally from the insulin-like growth factor 1 receptor in the regions governing ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12429-12434.

Louhio H, Hovatta O, Sjöberg J, Tuuri T (1999) The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod* 6:694-698.

Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, i sar. (1996) Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in the Igf2 and Igfr null backgrounds. *Dev Biol* 177:517-535.

Marek KW, Vijay IK, Marth JD (1999) A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology* 9:1263-1271.

Marini M, Bonaccini L, Thyron GDZ, i sar. (2011) Distribution of sugar residues in human placentas from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *Acta Histochem* 113:815-825.

Marth JD, Grewal PK (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8:874-887.

Masnikosa R, Baricević I, Jones DR, Nedić O (2006) Characterisation of insulin-like growth factor receptors and insulin receptors in the human placenta using lectin affinity methods. *Growth Horm IGF Res* 16:174-184.

Masnikosa R, Nikolić JA, Nedić O (2008) Affinity modulation of human placental insulin and insulin-like growth factor receptors by lectins. *J Biochem* 143:813-820.

Masuda K, Kubota T, Kaneko E, i sar. (2007) Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol* 44:3122-3131.

Matsumura K, Higashida K, Ishida H, i sar. (2007) Carbohydrate binding specificity of fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*. A novel probe for core fucose. *J Biol Chem* 282:15700-15708.

Mehdi MM, Singh P, Rizvi SI (2012) Erythrocyte sialic acid content during aging in humans: correlation with markers of oxidative stress. *Dis Markers* 32:179-186.

Monsigny M, Roche AC, Sene C, i sar. (1980) Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur J Biochem* 104:147-53.

Montpetit ML, Stocker PJ, Schwetz TA, i sar. (2009) Regulated and aberrant glycosylation modulate cardiac electrical signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16517-16522.

Morgan L (2010) Update on genetics of pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens* 3:59-60.

Morelle W, Canis K, Chirat F, i sar. (2006) The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics* 6:3993-4015.

Morelle W, Michalski JC (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2:1585-1602.

Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:448-462.

Moriwaki K, Narisada M, Imai T, i sar. (2010) The effect of epigenetic regulation of fucosylation on TRAIL-induced apoptosis. *Glycoconj J* 27:649-659.

Moss L, Proakobphol A, Wiedmann TW, i sar. (1994) Glycosylation of human trophoblast integrins is stage and cell-type specific. *Glycobiology* 4:567-575.

Muetze S, Kapagerof A, Vlachopoulos L, i sar. (2010) Mutation analysis of the growth factor genes PlGF, Flt1, IGF-I, and IGF-IR in intrauterine growth restriction with abnormal placental blood flow. *J Matern Fetal Neonatal Med* 23:142-147.

Murray MJ, Lessey BA (1999) Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 17:275-290.

Nagata Y, Burger MM (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem* 25:3116-3122.

Nairn AV, York WS, Harris K, i sar. (2008) Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J Biol Chem* 283:17298-17313.

Naismith JH, Field RA (1996) Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. *J Biol Chem* 271:972-976.

Naka R, Kamoda S, Ishizuka A, i sar. (2006) Analysis of total N-glycans in cell

membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography. *J Proteome Res* 5:88-97.

Nakagawa H, Zheng M, Hakomori S, i sar. (1996) Detailed oligosaccharide structures of human integrin $\alpha 5 \beta 1$ analyzed by a three-dimensional mapping technique. *Eur J Biochem* 237:76-85.

Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, i sar. (2008) Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *J Proteome Res* 7:2222-2233.

Nedić O, Masnikosa R (2009) Isolated compared to membrane-bound receptors exhibit altered insulin/IGF interaction. *Biochemistry (Moscow)* 74:29-35.

Nemansky M, Thotakura NR, Lyons CD, i sar. (1998) Developmental changes in the glycosylation of glycoprotein hormone free α subunit during pregnancy. *J Biol Chem* 273:12068-12076.

Neumann GM, Marinaro JA, Bach LA (1998) Identification of N-glycosylation sites and partial characterization of carbohydrate structure and disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein 6. *Biochemistry* 37:6572-6585.

Nikolić JA, Ivanoska D, Krainčanić M, i sar. (1989) Određivanje insulina radioimunoesejom. *Primenjena nauka* 16:37-41.

Novokmet M, Lukić E, Vučković F, i sar. (2014) Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep* 11:4-4347.

O'Dell SD, Day IN (1998) Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 30:767-771.

Oh Y, Muller HL, Pham H, Rosenfeld RG (1993) Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 on Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem* 268:26045-26048.

Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, i sar. (2005) Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell* 123:1307-1321.

Ohtsubo K, Chen MZ, Olefsky JM, Marth JD (2011) Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat Med* 17:1067-1075.

Orberger G, Geyer R, Stirn S, Tauber R (1992) Structure of the N-linked oligosaccharides of the human transferrin receptor. *Eur J Biochem* 205:257–267.

Ottum MS, Mistry AM (2015) Advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance. *J Clin Biochem Nutr* 57:1-12.

Peters BP, Ebisu S, Goldstein IJ, Flashner M (1979) Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* 18:5505-5011.

Petrescu S, editor (2012) U knjizi: Glycosylation. Izdavač: InTech, Rijeka, Hrvatska.

Pinho SS, Reis CA (2015) Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 15:540-555.

Prien JM, Ashline DJ, Lapadula AJ, i sar. (2009) The high mannose glycans from bovine ribonuclease B isomer characterization by ion trap MS. *J Am Soc Mass Spectrom* 20:539-556.

Pshezhetsky AV, Ashmarina LI (2013) Desialylation of surface receptors as a new dimension in cell signaling. *Biochemistry (Moscow)* 78:736-745.

Pučić M, Knežević A, Vidić J, i sar. (2011) High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG - variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 10:M111.010090.

Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, i sar. (2012) Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology* 22:975-982.

Rabinovich GA, Toscano MA (2009) Turning ‘sweet’ on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Rev Immunol* 9:338-352.

Rademacher TW, Williams P, Dwek RA (1994) Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6123-6127.

Ram BP, Munjal DD (1985) Galactosyltransferases: physical, chemical, and biological aspects. *CRC Crit Rev Biochem* 17:257-311.

Rasanen J, Quinn MJ, Laurie A, i sar. (2015) Maternal serum glycosylated fibronectin as a point-of-care biomarker for assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 212:e1-9.

Rentería ME, Gandhi NS, Vinuesa P, i sar. (2008) A comparative structural

bioinformatics analysis of the insulin receptor family ectodomain based on phylogenetic information. *PloS One* 3:e3667.

Rivinoja A, Hassinen A, Kokkonen N, i sar. (2009) Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J Cell Physiol* 220:144-154.

Robajac D, Masnikosa R, Vanhooren V, i sar. (2014) The N-glycan profile of placental membrane glycoproteins alters during gestation and aging. *Mech Ageing Dev* 138:1-9.

Romano G (2003) The complex biology of the receptor for the insulin-like growth factor-1. *Drug News Perspect* 16:525-531.

Roth Z, Yehezkel G, Khalaila I (2012) Identification and quantification of protein glycosylation. *Int J Carbohydr Chem* 2012:1-10.

Rouiller DG, Sharon N, McElduff A, i sar. (1986) Lectins as probes of insulin receptor carbohydrate composition: studies in glycosylation mutants of Chinese hamster ovarian cells with altered insulin binding. *Endocrinology* 118:1159-1165.

Royle L, Matthews E, Corfield A, i sar. (2008) Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences. *Glycoconj J* 25:763-773.

Ryan EA, Liu D, Bell RC, i sar. (1995) Long-term consequences in offspring of diabetes in pregnancy: studies with syngeneic islet-transplanted streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 136:5587-5592.

Saha S, Anilkumar AA, Mayor S (2015) GPI-anchored protein organization and dynamics at the cell surface. *J Lipid Res* doi:10.1194/jlr.R062885.

Schachter H (1986) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol* 64:163-181.

Schaefer-Graf UM, Buchanan TA, Xiang A, i sar. (2000) Patterns of congenital anomalies and relationship to initial maternal fasting glucose levels in pregnancies complicated by type 2 and gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 182:313-320.

Schwarz F, Aepli M (2011) Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 21:576-582.

Seino S, Seino M, Nishi S, i sar. (1989) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Nat Acad Sci USA* 86:114-118.

Serpa J, Mesquita P, Mendes N, i sar. (2006) Expression of Le^a in gastric cancer cell lines depends on FUT3 expression regulated by promoter methylation. *Cancer Lett* 242:191-197.

Sgambati E, Biagotti R, Marini M, Brizzi E (2002) Lectin histochemistry in the human placenta of pregnancies complicated by intrauterine growth retardation based on absent or reversed diastolic flow. *Placenta* 23:503-515.

Sgambati E, Marini M, Vichi D, i sar. (2007) Distribution of the glycoconjugate oligosaccharides in the human placenta from pregnancies complicated by altered glycemia: Lectin histochemistry. *Histochem Cell Biol* 3:263-273.

Sharon N (2007) Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem* 282:2753-2764.

Sharon N (2008) Lectins: Past, present and future. *Biochem Soc Trans* 36:1457-1460.

Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, i sar. (1987) The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 262:1596-1601.

Shibuya N, Goldstein IJ, Van Damme EJ, Peumans WJ (1988) Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem* 15:728-734.

Sitras V, Fenton C, Paulssen R, i sar. (2012) Differences expression between first and third trimester human placenta: a microarray study. *PLoS One* 7:e33294.

Skarulis MC, Wehmann RE, Nisula BC, Blithe DL (1992) Glycosylation changes in human chorionic gonadotropin and free alpha subunit as gestation progresses. *J Clin Endocrinol Metab* 75:91-96.

Sklar MM, Thomas CL, Municchi G, i sar. (1992) Developmental expression of rat insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 130:3484-3491.

Skropeta D (2009) The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorg Med Chem* 17:2645-2653.

Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, i sar. (2005) Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4299-4308.

Sparrow LG, Lawrence MC, Gorman JJ, i sar. (2008) N-linked glycans of the

human insulin receptor and their distribution over the crystal structure. *Proteins* 71:426-439.

Spiro R (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12:R43-56.

Stadlmann J, Ehrlich HJ, Weber A, i sar. (2009) A close look at human IgG sialylation and subclass distribution after lectin fractionation. *Proteomics* 9:4143-4153.

Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, i sar. (2004) Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4⁺ T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood* 104:3243-3248.

Takahashi M, Tsuda T, Ikeda Y, i sar. (2004) Role of N-glycans in growth factor signaling. *Glycoconj J* 20:207-212.

Takamatsu S, Antonopoulos A, Ohtsubo K, i sar. (2010) Physiological and glycomic characterization of N-acetylglucosaminyltransferase-IVa and -IVb double deficient mice. *Glycobiology* 20:485-497.

Takasaki S, Murray GJ, Furbish S, i sar. (1984) Structure of the N-asparagine-linked oligosaccharide units of human placental β -glucocerebrosidase. *J Biol Chem* 259:10112-10117.

Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J (2009) Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 19:527-536.

Than NG, Pich E, Bellyei S, i sar. (2004) Functional analyses of placental protein13/galectin-13. *Eur J Biochem* 271:1065-1078.

Thanabalasingham G, Huffman JE, Kattla JJ, i sar. (2013) Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile. *Diabetes* 62:1329-1337.

Tomiiie M, Isaka S, Miyoshi E, i sar. (2005) Elevated expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in first trimester human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 330:999-1004.

Tong PYK, Tollefsen SE, Kornfeld S (1988) The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 263:2585-2588.

Trbojević Akmačić I, Ugrina I, Štambuk J, i sar. (2015) High-throughput glycomics: Optimization of sample preparation. *Biochemistry (Moscow)* 80:934-942.

Ullrich A, Gray A, Tam AW, i sar. (1986) Insulin-like growth factor 1 receptor

primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5:2503-2512.

Uhles S, Moede T, Leibiger B, i sar. (2003) Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J Cell Biol* 163:1227-1237.

Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33:151-208.

Van den Eijnden DH, Schiphorst WECM (1981) Detection of beta-galactosyl (1-4)N-acetylglucosaminide α (2-3)-sialyltransferase activity in fetal calf liver and other tissues. *J Biol Chem* 256:3159-3162.

Vanderschaeghe D, Guttman A, Callewaert N (2013) High-throughput profiling of the serum N-glycome on capillary electrophoresis microfluidics systems. *Methods Mol Biol* 919:87-96.

Vanhooren V, Desmyter L, Liu XE, i sar. (2007) N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation Res* 10:521-531a.

Vanhooren V, Laroy W, Libert C, Chen CC (2008) N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology* 9:351-356.

Vanhooren V, Dewaele S, Libert C, i sar. (2010) Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Exp Gerontol* 40:738-743.

Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3:97-130.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, i sar., editori (2009) U knjizi: Essentials of Glycobiology. Izdavač: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Njujork, Njujork, USA.

Vashisth H (2015) Theoretical and computational studies of peptides and receptors of the insulin family. *Membranes* 5:48-83.

Vest AR, Cho LS (2014) Hypertension in pregnancy. *Curr Atheroscler Rep* 16:395, doi:10.1007/s11883-013-0395-8.

Vićovac Lj, Janković M, Čuperlović M (1998) Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Reprod* 13:730-735.

Zarilli R, Bruni CB, Riccio A (1994) Multiple levels of control of insulin-like growth factor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 101:1-14.

Zesławski W, Beisel HG, Kamionka M, i sar. (2011) The interaction of insulin-like growth factor-I with the N-terminal domain of IGFBP-5. *EMBO J* 20:3638-3644.

Zhang M, Wang M, Gao R, i sar. (2015) Altered β 1,6-GlcNAc and bisecting GlcNAc-branched N-glycan on integrin β 1 are associated with early spontaneous miscarriage in humans. *Hum Reprod* 30:2064-2075.

Zhao H, Sun L, Wang L, i sar. (2008) N-glycosylation at Asn residues 554 and 566 of E-cadherin affects cell cycle progression through extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40:140-148.

Zhou R, Diehl D, Hoeflich A, i sar. (2003) IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J Endocrinol* 178:177-193.

Zoldoš V, Novokmet M, Bečeheli I, Lauc G (2013) Genomics and epigenomics of the human glycome. *Glycoconj J* 30:41-50.

Yamada H, Sata F, Saijo Y, i sar. (2005) Genetic factors in fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost* 31:334-345.

Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, i sar. (2009) N-acetylglucosaminyltransferase V regulates extravillous trophoblast invasion through glycosylation of α 5 β 1 integrin. *Endocrinology* 150:990-999.

Yang X, Liu S, Yan Q (2013) Role of fucosyltransferase IV in epithelial - mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cell Death Dis* 4:e735.

Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:7342-7372.

Wang PH, Lee WL, Yang YH, i sar. (2007) Alpha 2,6-sialyltransferase I expression in the placenta of patients with preeclampsia. *J Chin Med Assoc* 70:152-158.

Wang J, Balog CI, Stavenhagen K, i sar. (2011) Fc-glycosylation of IgG1 is modulated by B-cellstimuli. *Mol Cell Proteomics* 10:M110.004655.

Wang L, Vanhooren V, Dewaele S, i sar. (2012) Alteration of liver N-glycome in patients with hepatocellular carcinoma. *O J Gas* 2:1-8.

Wang M, Wang J, Kong X, i sar. (2014) MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. *Sci Rep* 4:6145, doi: 10.1038/srep06145.

White V, Jawerbaum A, Mazzucco MB, i sar. (2015) Diabetes-associated changes in the fetal insulin/insulin-like growth factor system are organ specific in rats. *Pediatr Res* 77:48-55.

Wimmerova M, Mitchell E, Sanchez JF, i sar. (2003) Crystal structure of fungal lectin: six-bladed beta-propeller fold and novel fucose recognition mode for *Aleuria aurantia* lectin. *J Biol Chem* 278:27059-27067.

Wu AM, Wu JH, Tsai M-S, i sar. (2007) Differential affinities of *Erythrina cristagalli* lectin (ECL) toward monosaccharides and polyvalent mammalian structural units. *Glycoconj J* 24:591-604.

www.dextrauk.com/index.php/products/glycans/complex-type-n-glycans

www.functionalglycomics.org

www.igfmutation.flinders.edu.au

www.preeclampsia.org

www.prozyme.com

www.vectorlabs.com

www.what-when-how.com

www.who.int

Biografija

Dragana Robajac je rođena 3. avgusta 1985. godine u Čačku. Osnovnu školu završila je u Prijedoru, a srednju Medicinsku školu u Čačku. Školske 2004/05 upisala je Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Novom Sadu, smer diplomirani hemičar-biohemija, koji je završila školske 2008/09. Po završetku osnovnih studija, upisuje doktorske studije biohemije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. U isto vreme angažovana je u okviru naučno-istraživačkog projekta „Insulinu-slični faktori rasta (IGF), njihovi vezujući proteini (IGFBP) i receptori (IGF-R) kod ljudi u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima“ (MNTR RS, projekat 143019). Od 2011. godine je angažovana na projektu „Strukturne karakteristike vezujućih proteina i receptora za insulinu slične faktore rasta (IGF), njihove interakcije sa drugim fiziološkim molekulima i promene kod poremećaja metabolizma“ (MPNTR RS, projekat 173042). Od 2011-2014 bila je deo COST akcije CM1001 „Chemistry of non-enzymatic protein modifications - modulation of protein structure and function“ u okviru koje je provela šest nedelja u Flamanskom institutu za biotehnologiju u Gentu, Belgiji, kod dr Valerie Vanhoren. Bila je deo bilateralnog projekta sa Republikom Slovačkom „Lektinski biočipovi za karakterizaciju glikanske strukture proteina IGF sistema u istraživanju, dijagnostici i terapiji kolorektalnog karcinoma“ (2012-2013) i „Primena modernih, osetljivih lektinskih biočipova za utvrđivanje promena u glikozilaciji proteina važnih za razvoj kolorektalnog karcinoma u cilju istraživanja i poboljšanja dijagnostike i terapije“ (2015-2016). Kao član tima bilateralnog projekta provela je dve nedelje u Slovačkoj akademiji nauka u Bratislavi.

Član je Srpskog hemijskog društva (od 2009. godine) i Biohemijskog društva Srbije (od 2012. godine).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана _____ Драгана Б. Робајац _____

број индекса _____ 11/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**N-гликом мембранских протеина и рецептора за инсулин и факторе раста
сличне инсулину, изолованих из хумане плаценте у различитим
(пато)физиолошким стањима**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Драгана Б. Робајац _____

Број индекса _____ 11/2009 _____

Студијски програм _____ биохемија _____

Наслов рада **N-гликом мембранских протеина и рецептора за инсулин и факторе раста сличне инсулину, изолованих из хумане плаценте у различитим (пато)физиолошким стањима** _____

Ментор _____ др Љуба Мандић, др Романа Масникоса _____

Потписана _____ Драгана Б. Робајац _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**N-гликом мембранских протеина и рецептора за инсулин и факторе раста
сличне инсулину, изолованих из хумане плаценте у различитим
(пато)физиолошким стањима**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.