

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Anastasie Pála

CHEMICKÁ MODIFIKACE GLYKOPEPTIDŮ A PREDIKCE
JEJICH RETENČNÍHO CHOVÁNÍ PŘI HYDROFILNÍ
KAPALINOVÉ CHROMATOGRAPHII

Chemical Modification of Glycopeptides and Prediction of their
Retention on Hydrophilic Liquid Chromatography

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16.5.2024

Poděkování:

Děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Ječmenovi, Ph.D. za vedení diplomové práce, jeho ochotu a nekončící trpělivost. Dále mu děkuji za pomoc se všemi experimenty a za jeho čas věnovaný prohlubování mých znalostí v oboru biochemie. Také děkuji konzultantovi práce doc. RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za cenné rady nezbytné pro řešení této diplomové práce a Ing. Petru Haladovi, Ph.D. spolu s vědeckým ústavem BIOCEV za pomoc s MALDI-TOF analýzou vzorků. Děkuji i doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za hodnotné rady ohledně laboratorní práce a za příjemnou náladu, která panovala v laboratoři 216. Dík patří i mé přítelkyni Evě a rodině za podporu během těžkého období studia.

Abstrakt

V rámci této diplomové práce bylo studováno retenční chování glykopeptidů při hydrofilní kapalinové chromatografii. Pro tyto účely bylo využito propionylace a formylace peptidové páteře glykopeptidů za cílem změny vlastností jako hydrofobicita, polarita a velikost náboje peptidové části glykopeptidu. Pro úpravu peptidové páteře glykopeptidů bylo také využito současné štěpení glykoproteinů dvěma proteázami (trypsin a AspN/GluC). Štěpení dvěma proteázami vedlo ke zkrácení peptidové páteře glykopeptidů o různé aminokyseliny, čímž bylo možné pozorovat jejich vliv na retenci glykopeptidů při HILIC.

Odlišně sialované a modifikované/štěpené glykopeptidy byly analyzovány hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Pozorováním rozdílů v retenci nemodifikovaných a modifikovaných/štěpených glykopeptidů pěti glykoproteinů byl určen výrazný vliv náboje glykopeptidů na jejich retenční chování při HILIC. Bylo zjištěno, že zvyšování velikosti náboje glykopeptidu retenci zkracuje a snižování prodlužuje. Změny velikosti náboje vedly průměrně ke změnám relativní retence $1,17 \pm 0,04$. Rozdíl retence u glykopeptidů, jejichž náboj zůstal nezměněný, byl výrazně menší s průměrnou hodnotou změny relativní retence $1,04 \pm 0,03$. Dále bylo zjištěno, že modifikace na N-konci a C-konci peptidové páteře ovlivňují retenci glykopeptidů stejnou mírou. Z naměřených dat byly identifikovány další potenciální příspěvky ovlivňující retenční mechanismus glykopeptidů, které nebylo možné využitými metodami spolehlivě určit. Identifikovány byly: závislost poměru hmotností glykanu a peptidu glykopeptidu na naměřeném retenčním čase, negativní vliv polární aminokyseliny glutamin na retenci glykopeptidů, vliv pozice glykanu na retenční příspěvek aminokyselin a vliv prostorového uspořádání peptidové páteře glykopeptidu na jeho retenční chování.

Klíčová slova: chemická modifikace glykopeptidů, predikce retence, hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, vliv peptidové páteře na retenci glykopeptidů

Abstract

In this master's thesis, retention mechanism of glycopeptides during hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) was studied. For these purposes, propionylation and formylation of the peptide backbone was used to deliberately change its properties such as hydrophobicity, polarity and charge. Glycopeptide backbone was also modified through the simultaneous usage of two proteases (trypsin and AspN/GluC). Digestion of glycoproteins with two proteases led to a loss of different amino acids which made it possible to study the effect of said amino acids on the retention of analysed glycopeptides during HILIC separation.

Sialylated and modified/doubly digested glycopeptides were analysed using HILIC-MS. Significant effect of glycopeptide charge on retention was identified using the difference of retention times between unmodified and modified/doubly digested glycopeptides during HILIC separation. Glycopeptide modifications involving change in charge led to relative retention difference of $1,17 \pm 0,04$ while glycopeptide modifications not involving change in charge led to less significant relative retention difference of $1,04 \pm 0,03$. The effect of position of peptide backbone modification was also studied: the retention of glycopeptides modified on N-terminus and C-terminus was identical, therefore N- and C-terminus of peptide backbone affect glycopeptide retention equally. Furthermore, collected data points to other potential effects of the peptide backbone on glycopeptide retention. Mainly correlation of retention times and ratios of the molecular weight of glycan to peptide backbone, negative effect of polar amino acid glutamine on glycopeptide retention, effect of glycan position on the extent of influence that amino acid has on glycopeptide retention and effect of peptide 3D structure on glycopeptide retention.

Keywords: glycopeptide modification, retention prediction, hydrophilic liquid interaction chromatography, influence of peptide backbone on glycopeptide retention

Obsah

1	Teoretický úvod	8
1.1	Proteiny	8
1.1.1	Glykoproteiny.....	9
1.2	Analýza glykoproteinů	12
1.2.1	Hmotnostní spektrometrie v glykoproteomice	14
1.2.1.1	Ionizační zdroje	15
1.2.1.2	Kolizně indukovaná disociace.....	16
1.2.2	Kapalinová chromatografie v glykoproteomice	17
1.2.2.1	Hydrofilní interakční chromatografie.....	18
1.2.2.2	Predikce retenčního chování glykopeptidů	19
1.2.3	Modifikace glykopeptidů	20
2	Cíle práce	22
3	Materiál a metody	23
3.1	Chemikálie	23
3.2	Přístroje a pomůcky.....	24
3.3	Metody použité v práci.....	25
3.3.1	Desializace glykoproteinů	25
3.3.2	Proteolytické štěpení glykoproteinů	25
3.3.2.1	Štěpení glykoproteinů pomocí trypsinu.....	25
3.3.2.2	Štěpení tryptických peptidů pomocí endoproteáz AspN nebo GluC.....	27
3.3.3	Propionylace a formylace peptidů	27
3.3.4	Měření vzorků pomocí MALDI-TOF	28
3.3.5	Separace glykopeptidů hydrofilní interakční chromatografií.....	28
4	Výsledky	31
4.1	Sialované glykopeptidy	32
4.2	Acylace peptidové páteře glykopeptidů	35
4.3	Separace glykopeptidů štěpených dvěma proteázami při HILIC	42
5	Diskuse.....	50
6	Závěr.....	54
	Seznam použité literatury.....	55

Seznam zkratek:

Asn	asparagin
Cam	alkylovaný cystein
CID	kolizně indukovaná disociace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
Fuc	fukosa
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HCD	kolizní disociace při vyšších energiích
Hex	hexosa
HexNAc	N-acetylglukosamin
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IgG	imunoglobulin G
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
m/z	poměr náboje ku hmotnosti iontu
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
Q(pyro)	pyroglutamát
RP-HPLC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi
Ser	serin
Sia	sialová kyselina
Thr	threonin

1 Teoretický úvod

1.1 Proteiny

Proteiny jsou jedním ze základních stavebních kamenů veškerých organismů. Každá buňka a živočich využívá široké spektrum proteinů s odlišnými funkcemi, které dohromady umožňují komplexní život. Některé proteiny fungují například jako strukturní pilíře buněk, jiné slouží ke katalýze biochemických reakcí a další umožňují komunikaci buněk napříč celým organismem [1].

Zatímco tyto biomolekuly plní množství komplexních funkcí v životním cyklu živočichů, je jejich základní kompozice relativně minimalistická. Proteiny jsou biopolymerní řetězce složené převážně z dvaceti základních α -aminokyselin. Ty vždy obsahují aminoskupinu a karboxylovou skupinu na svém α -uhlíku, liší se však ve svém postranním řetězci. Bočný řetězec poskytuje aminokyselinám jejich unikátní vlastnosti a umožňuje složité fungování proteinů. Podle postranního řetězce jsou aminokyseliny klasifikovány a jejich vlastnosti definovány. Aminokyseliny jsou tříděny podle jejich polarit, hydrofobicity, acidobazického charakteru a velikosti náboje.

Aminokyseliny se skrze kondenzační reakce propojují do různě dlouhých řetězců přes peptidové vazby. Tím vznikají krátké peptidy o délce několika aminokyselin až proteinové komplexy složené z tisíce aminokyselin. Vzhledem k nutnosti zápisu dlouhých sekvencí aminokyselin se proto jejich názvy zkracují na třípísmenný či jednopísmenný kód (například aminokyselina cystein se zapisuje jako „Cys“ nebo „C“).

Vznik proteinů vychází z genetické informace organismů. V řetězcích deoxyribonukleové kyseliny (DNA) jsou proteiny kódované pomocí čtyř dusíkatých bází a sekvence tří bází kóduje jednu aminokyselinu. Z informace uložené v DNA je pak přepsán a syntetizován řetězec aminokyselin pomocí buněčných procesů transkripce a translace, čímž vzniká primární struktura proteinu. Tento lineární řetězec po svém vzniku zaujímá prostorovou konformaci, která se odvíjí od jeho aminokyselinového složení. Delší segmenty aminokyselinové sekvence tvoří makromolekulární prostorové uspořádání zvané sekundární struktura. Tím vznikají prostorové konformace jako například α šroubovice a β skládaný list. Souhrn sekundárních

struktur proteinu tvoří jeho výsledný tvar v terciární struktuře a případně i kvartérní struktuře u proteinů s více podjednotkami.

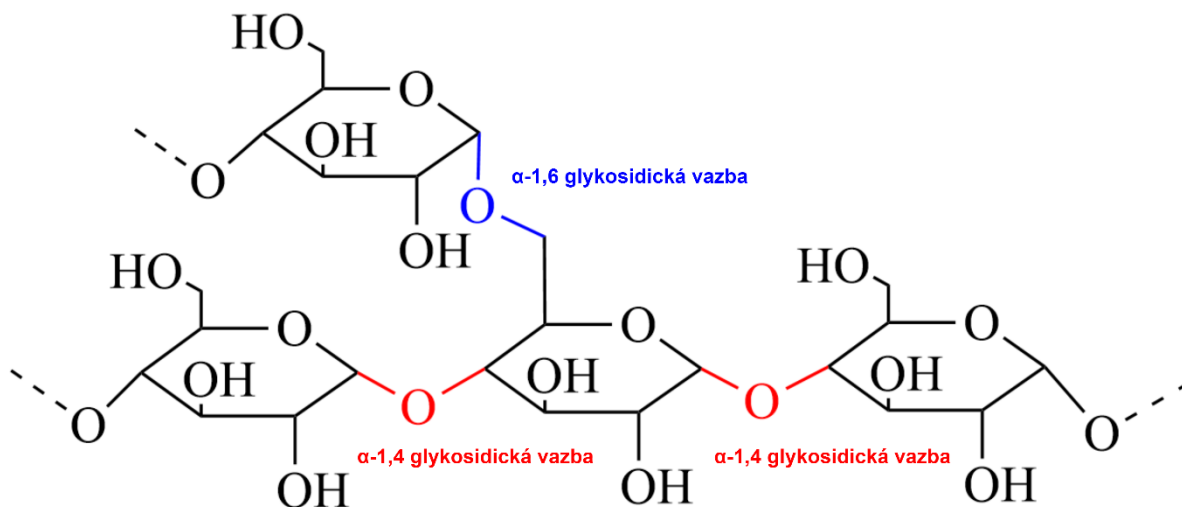
Primární struktura proteinu uložená v genetické informaci buňky častokrát nestačí pro správné fungování proteinu, a jsou proto modifikovány během či po translaci. Posttranslační modifikace dodávají a upravují vlastnosti proteinů potřebné pro správné plnění jejich funkce v buňce. Na rozdíl od syntézy proteinu nejsou tyto modifikace kódované genetickou informací a proces je řízen enzymaticky a regulován komplexními signalizačními pochody. Posttranslační modifikace jsou různorodé v jejich funkci i chemické podstatě. Může se jednat o zkrácení proteinu o krátký signální peptid oznamující cíl transportu proteinu v buňce, acetylaci lysinu v proteinu histonu pro epigenetickou regulaci genů, nebo také glykosylace proteinu umožňující mezibuněčnou komunikaci [2–4].

1.1.1 Glykoproteiny

Navázání cukerných složek na proteinový řetězec v procesu zvaném glykosylace je jedna z nejčastějších posttranslačních modifikací. U přirozeně se vyskytujících proteinů eukaryotních organismů je předpokládáno, že převážná většina z nich obsahuje některou formu glykosylace [5]. Takové proteiny jsou nazývané glykoproteiny a na nich napojené cukerné zbytky jsou označovány jako glykany. Funkce glykosylace proteinů je rozmanitá napříč všemi buněčnými pochody. Glykany a odpovídající glykosylace hrají důležitou roli například ve stabilizaci glykoproteinů, přenosu signálů mezi buňkami a regulaci biochemických procesů [6,7].

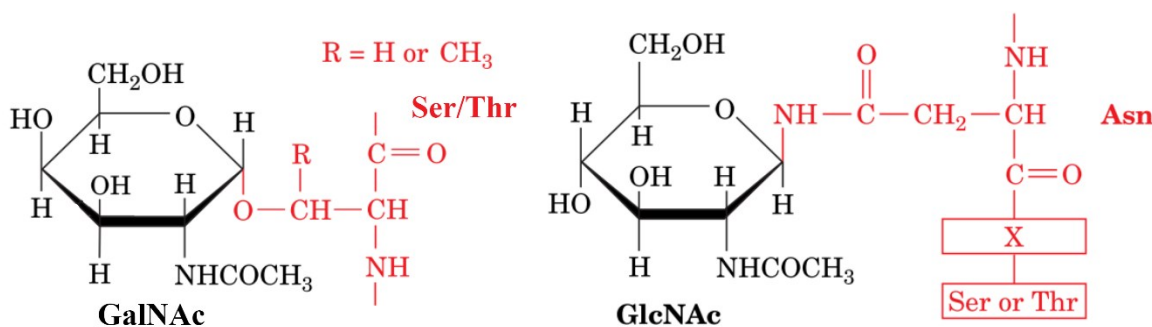
Základní stavební jednotkou glykanů jsou monosacharidy – polyhydroxyderiváty karbonylových sloučenin složené primárně z uhlíku, kyslíku a vodíku. Přítomnost několika hydroxylových skupin umožňuje monosacharidům tvořit vazby v odlišných pozicích, díky čemuž mohou glykany tvořit větvené struktury (obr. 1.1 na str. 10). Zatímco dvě aminokyseliny se spolu pojí vždy stejnou peptidovou vazbou a dva nukleotidy DNA mezi sebou tvoří identické fosfodiesterové vazby, mohou glykany obsahovat odlišné vazby mezi monomerními jednotkami. Monosacharidy proto mohou tvořit rozdílné poziční izomery na základě odlišného propojení [8]. Ačkoliv se cukerné řetězce savčích glykoproteinů skládají

majoritně z 10 monosacharidových jednotek, tvoří glykany diverzní skupinu struktur díky charakteru svých vazeb [9].



Obr. 1.1 Struktura polysacharidového řetězce amylopektinu složeného z monosacharidových jednotek celulózy propojených rozdílnými glykosidickými vazbami.

Glykosylace se dělí primárně podle druhu vazby glykanu a proteinu na O-glykosylaci a N-glykosylaci. Při O-glykosylaci dochází k tvorbě glykosidické vazby oligosacharidového řetězce na hydroxylovou skupinu aminokyseliny serin (Ser) nebo threonin (Thr). Oproti tomu je N-glykosylace směřovaná na amidový dusík asparaginu (Asn) v aminokyselinové sekvenci Asn-X-Ser/Thr (kde X je libovolná aminokyselina kromě prolinu, obr. 1.2) [10].

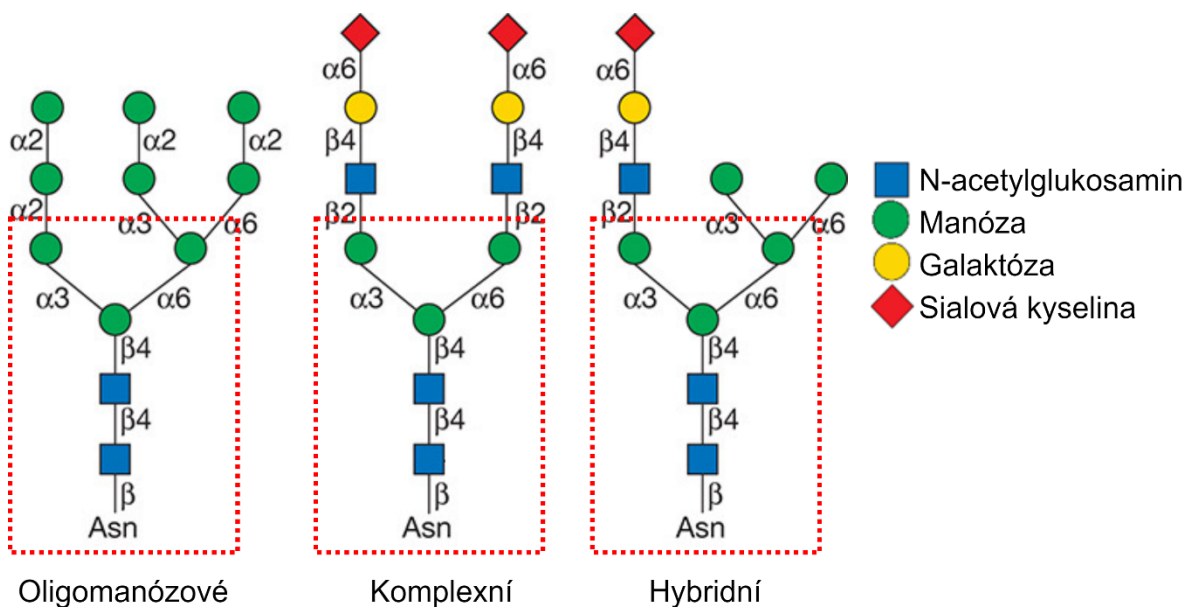


Obr. 1.2 Rozdíl ve vazbě glykanu na aminokyselinu mezi O-glykosylací (vlevo) a N-glykosylací (vpravo). Zkratka GlcNAc znamená N-acetylglukosamin a GalNAc znamená N-acetylgalaktosamin. Převzato a upraveno z [11].

Důležitou roli v procesu glykosylace hraje sekundární struktura proteinu v okolí glykosylačního místa. Ta musí konformací odpovídat preferenci enzymů zodpovědných za počáteční navázání cukerného zbytku [6]. N-glykosylace proto neprobíhá na veškerých aminokyselinách

asparaginu, které jsou součástí uvedeného sekvenčního motivu, stejně jako O-glykosylace neprobíhá na každém serinu a threoninu.

Glykany N- a O-glykoproteinů se mezi sebou liší kvůli rozdílnému způsobu syntézy. V případě O-glykanů dochází k postupnému připojování monosacharidových jednotek do řetězců pomocí velkého množství enzymů. Díky tomu vznikají jednoduché a málo rozvětvené oligosacharidové řetězce [6,12]. Oproti tomu jsou glykany N-glykoproteinů syntetizovány z prekurzoru společného pro všechny N-glykany. Cukerný prekurzor je upraven do výsledného glykanu, který může být zařazen do jedné ze tří skupin: oligomanóзовý, komplexní a hybridní (obr. 1.3) [5]. Veškeré N-glykany obsahují charakteristické pentasacharidové jádro, jež je zbytkem glykosylačního prekurzoru.



Obr. 1.3 – Rozdělení N-glykanů. Červeně je označené společné pentasacharidové jádro N-glykanů. Převzato a upraveno z [13].

Vzhledem k enzymatické regulaci glykosylace a nepřítomnosti jednotného schématu pro syntézu glykanů může glykosylační místo proteinu obsahovat různé glykany, nebo naopak žádné oligosacharidové řetězce neobsahovat [14,15]. Tím vzniká mikroheterogenita (diverzita na jednom glykosylačním místě) a makroheterogenita (přítomnost či nepřítomnost glykanu na různých glykosylačních místech) glykoproteinu [16]. Výskyt různých glykoform, glykoproteinů s rozdílnými glykany, je způsoben mnoha faktory. Glykosylace je závislá na dostupnosti monosacharidových jednotek potřebných pro syntézu glykanu a enzymů za tento proces zodpovědných. Jejich koncentrace v buňkách je závislá na faktorech jako je strava,

fyziologický stav a nemoci organismu a v jeho různých vývojových fázích se může měnit [15,17]. Tím dochází i ke změnám glykosylace v závislosti na stavu buňky a organismu.

Změny v glykosylaci proteinů jsou také spojeny s patologií různých onemocnění. Výčet nemocí asociovaných se změnou glykosylace je dlouhý a dále se rozšiřuje spolu s novými poznatky o vlivu glykoproteinů na buněčné fungování. Abnormální glykanové struktury byly pozorovány u chorob jako je Alzheimerova choroba, mnoho druhů rakoviny, cukrovka, AIDS, kardiovaskulární poruchy, Parkinsonova porucha, cirhóza jater a mnoho dalších [18–21]. Změny glykosylace proto mohou sloužit jako bioindikátory nemocí. V onkologických studiích byly identifikovány glykanové struktury specifické pro rakovinu plic [22]. Jejich přítomnost může sloužit pro diagnostiku raných stádií tohoto onemocnění. Tímto způsobem je dnes běžně používán biomarker glykan označovaný CA19-9. Jeho zvýšená koncentrace v krevním séru indikuje rakovinu slinivky břišní [23]. Dále se objevují nové glykoproteinové biomarkery pro mnoho jiných nemocí s potenciální aplikací pro diagnostické účely, čímž se rozšiřuje klinický význam těchto molekul [19].

1.2 Analýza glykoproteinů

Glykoproteiny jsou molekuly složené ze dvou chemicky odlišných částí: cukerného glykanu a proteinové páteře. Vzhledem ke dvěma rozdílným složkám se k jejich analýze přistupuje různými způsoby. Odlišné postupy analýzy mají své výhody i nevýhody a jejich výsledky se liší i v hloubce získaných informací [24]. I přes rozmanitost metod je však studium glykoproteinů ztíženo komplikacemi společnými pro celou glykoproteomiku.

Jedním z úskalí analýzy glykoproteinů je jejich mikro a makroheterogenita. Při studiu glykoproteinů mají jednotlivé glykoformy nízké koncentrace, a to zejména při analýze glykoproteinů z komplexních směsí jako je krevní sérum a moč [25]. Studium glykoproteinů je proto značně ztíženo, neboť se koncentrace zejména méně zastoupených glykoform analytu může snadno pohybovat v blízkosti limitu detekce citlivých metod běžně používaných v proteomice. Analýza proto většinou zahrnuje krok nabohacení glykoproteinů z komplexního vzorku (nejčastěji pomocí afinitní chromatografie využívající lektiny) nebo jsou jí předřazeny separační kroky pomocí kapalinové chromatografie [26–28].

Analýza glykoproteinů je dále ztížena stavbou glykanů, neboť tvoří rozvětvené struktury s různými vazbami mezi monosacharidy (viz kap. 1.1.1. na str. 9). Jednotlivé cukerné monomery mají také velmi podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, což dále ztěžuje jejich identifikaci. Mnoho metod běžně využívaných glykoproteomikou není schopno úplné charakterizace glykanů, a je proto rutinně určováno pouze jejich obecné sacharidové složení, které je však pro většinu případů dostačující. Místo N-acetylglukosamin/N-acetylgalaktosamin je metodou určen například pouze sacharid N-acetylhexosamin [29].

Pro studium glykoproteinů se často využívá enzymatická nebo chemická deglykosylace a následná analýza oddělených glykanových zbytků a proteinové páteře [30]. Po deglykosylaci jsou od sebe složky izolovány a následně analyzovány nejčastěji využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [31]. Výhodou postupu je možnost podrobnějšího studia glykanových struktur včetně určení monosacharidového složení a identifikace jejich větvení [27]. Pro tyto účely lze využít také nukleární magnetickou rezonanci [9]. Další výhodou postupu je také zvýšené rozlišení separačních metod při analýze aminokyselinového řetězce glykoproteinů. Oddělením glykanových zbytků je snížena heterogenita studovaného proteinu, což způsobuje menší rozmývání zón analytu při separačních krocích [27]. Po oddělení glykanu od proteinového řetězce je však obtížné určit původní místo vazby a určit, které glykany přísluší konkrétním glykosylačním místům [32]. Využívají se proto metody značící glykosylační místo inkorporací izotopu ^{18}O během enzymatické deglykosylace [33]. Určit glykosylační místo příslušící glykanu je i přes to obtížné v případě analýzy glykoproteinů s několika glykosylačními místy nebo analýzy směsí glykoproteinů. Pro komplexní směsi jako jsou klinické vzorky je proto přístup nevhodný a pro tyto nevýhody se začal vyvíjet přístup analýzy glykopeptidů.

Štěpení glykoproteinů na kratší peptidové segmenty a jejich následná analýza dovoluje studovat glykosylaci na úrovni specifického glykosylačního místa [34]. Samotné analýze předchází enzymatické nebo případně chemické štěpení proteinové páteře na kratší peptidy [35]. Pro tyto účely je nejčastěji využito štěpení proteázou trypsin a výsledná směs peptidů a glykopeptidů je podrobena LC-MS analýze [36]. Přední výhodou postupu je jednoduchost přiřazení glykanových struktur k jejich původnímu glykosylačnímu místu. I z komplexních směsí lze identifikovat specifické změny glykosylace proteinů, díky čemuž je přístup vhodný

pro diagnostické a klinické účely. Přes své výhody však metodika trpí na úskalí spojené s komplexitou analyzovaných vzorků. Heterogenita glykoproteinů vede k nízkému zastoupení jednotlivých glykoform v analyzované peptidické směsi a relativní výskyt glykoform je dále snížen při analýze komplexních směsí [37]. Analýza glykopeptidů proto kvůli jejich nízké koncentraci častokrát vyžaduje moderní citlivou instrumentaci [38].

1.2.1 Hmotnostní spektrometrie v glykoproteomice

Hmotnostní spektrometrie (MS) je nejrozšířenější metodou analýzy glykoproteinů [39]. Do popředí proteomiky a následně i glykoproteomiky se dostala díky své vysoké citlivosti, specifitě, rychlosti a všestrannosti [40]. Její výhodou je také možnost přímého zapojení se separačními technikami, které jsou pro analýzu glykoproteinů běžně využívány [41].

Metoda rozlišuje ionty podle jejich hodnoty m/z – poměru hmotnosti ku náboje iontu. Hmotnostní spektrometry se mohou lišit ve svém uspořádání, ale obecně jsou složeny ze čtyř částí: vakuového systému, ionizačního zdroje, analyzátoru a detektoru. Analyzované látky jsou zplyněny a ionizovány v ionizačním zdroji. Vzniklé ionty jsou rozděleny dle jejich hodnoty m/z v analyzátoru a následně snímány detektorem. Zatímco ionizační zdroj může být v některých případech užíván za atmosférického tlaku, je analyzátor hmotnostního spektrometru vždy vakuovaný pro zamezení srážek iontů s molekulami vzduchu [42]. Analýzou je tak možné získat informace o hmotnosti molekuly výpočtem z naměřené hodnoty m/z .

Dnes běžně užívaným rozšířením této techniky je tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). První úroveň hmotnostního spektrometru slouží pro výběr iontů, které jsou v druhé úrovni přístroje fragmentovány různými technikami. Vzniklé fragmenty jsou snímány detektorem, čímž vznikají spektra poskytující detailnější informace o vnitřní struktuře prekurzorového iontu [43].

Hmotnostní spektra se liší v závislosti na použitém přístroji, zejména ionizačním zdroji a fragmentační technice [44]. Volba vhodné instrumentace je proto důležitým parametrem kvality analýzy.

1.2.1.1 Ionizační zdroje

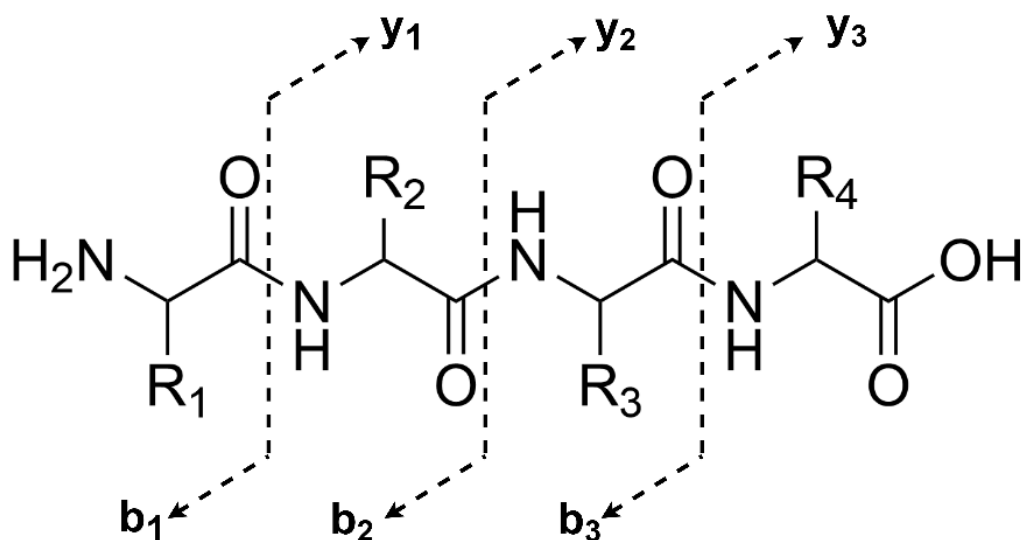
Ionizační zdroje využívají různých technologií pro převedení analytu do plynné fáze a jejich současné ionizace. Výběr ionizačního zdroje závisí na povaze analyzovaného vzorku [45] a pro studium glykoproteinů se ujal zejména matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI) [46]. Tyto způsoby ionizace jsou považované za měkké techniky schopné ionizovat molekuly bez jejich výrazné fragmentace [47].

Při užití MALDI je vykrystalizovaná směs vzorku s kyselou matricí na MALDI terčíku ozářena krátkými pulzy laseru, což vede k desorpci a ionizaci analytu složitým mechanismem [48]. Tím vznikají ionty většinou v nábojovém stavu +1 [49]. Ionizační technika je velmi citlivá, neboť nedochází k rozdělení signálů analytu mezi několik nábojových stavů [39]. Vzhledem k nízkému stupni ionizace mohou být výsledné hodnoty m/z poměrně vysoké, a analýzu je proto nutné provádět v širším rozsahu m/z než při využití ESI. Výhodou MALDI je také relativně vysoká tolerance k přítomnosti kontaminantů ve vzorku [50].

Při ionizaci elektrosprejem je rozpuštěný vzorek kontinuálně veden do analyzátoru skrze kapiláru s vloženým napětím na špičce. Při průchodu kapaliny ionizačním zdrojem dochází k odpaření rozpouštědla a přenesení elektrického náboje na analyt, ze kterého vzniká zplyněný iont [51]. Ionizací pomocí ESI vznikají i několikrát nabití ionty, což může být výhodou a nevýhodou techniky [52]. Naměřené hodnoty m/z molekul jsou obecně nižší, a není proto nutné analýzu větších biomolekul provádět v širokém rozsahu m/z jako u MALDI. Rozdělení naměřeného signálu analytu mezi jednotlivé nábojové stavy však snižuje citlivost techniky [53]. Nevýhodou ESI je také vznik aduktů analytu s kontaminanty a molekulami mobilní fáze jako jsou $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$ nebo $[M+NH_4]^+$ (M značí analyzovanou látku) komplikujících interpretaci naměřených dat [54]. Ionizační techniku lze jednoduše propojit s HPLC, což je značnou výhodou vzhledem k přirozené složitosti glykoproteomických vzorků a důvodem prominence techniky ESI v oboru [40].

1.2.1.2 Kolizně indukovaná disociace

Pro fragmentaci molekul v tandemové hmotnostní spektrometrii se využívají různé fragmentační techniky. V proteomické analýze je hojně používanou fragmentační technikou kolizně indukovaná disociace (CID) a kolizní disociace při vyšších energiích (HCD) [55]. Techniky pro fragmentaci využívají srážek iontů s částicemi inertního neutrálního plynu v kolizní cele přístroje. Srážka částic vede k vibrační excitaci iontu, jež je následovaná jeho fragmentací pro uvolnění absorbované energie [56]. Fragmentace peptidů pomocí CID a HCD vede primárně ke štěpení peptidových vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami. Tím dochází ke vzniku spekter obsahující fragmenty b- a y- série (s nábojem na N- nebo C-konci peptidu) s rostoucími hodnotami m/z podle posloupnosti aminokyselin v peptidu (obr. 1.4) [57].



Obr. 1.4 Fragmenty b- a y-série vzniklé štěpením peptidů využitím kolizně indukované disociace. R_x značí různé postranní řetězce aminokyselin.

Při fragmentaci glykosylovaných peptidů využitím CID a HCD dochází k odlišnému štěpení iontů. Glykopeptidy jsou štěpeny preferenčně ve vazbách mezi monosacharidovými jednotkami glykanu a naměřená fragmentační spektra proto obsahují informace o struktuře cukerného zbytku [58]. Nevýhodou užití CID a HCD pro analýzu glykopeptidů je však obecně nižší výskyt fragmentů peptidové páteře. Identifikace glykopeptidu proto může být obtížná, a to zejména v případě, že sekvence aminokyselin glykopeptidu není předem známá [59]. Výhodou užití CID a HCD pro fragmentaci glykopeptidů je vznik oxoniových iontů tvořících intenzivní píky v naměřených spektrech. Oxoniové ionty jako jsou ionty N-acetylhexosamin (HexNAc;

$m/z = 204,9$), hexosa+N-acetylhexosamin (HexHexNAc; $m/z = 366,15$) a další lze využít jako diagnostické ionty, díky kterým je možné detegovat glykopeptidy i v komplexních směsích [60]. Při LC-MS analýze lze proto v chromatogramu jednoduše identifikovat eluční oblasti glykopeptidů [61]. Fragmentační techniky CID a HCD jsou proto vhodné pro LC-MS analýzu předem známých glykoproteinů, neboť poskytují detailní informace o složení glykanu glykopeptidu a generují oxoniové ionty využitelné pro jejich jednoduchou detekci. Problém nedostatku fragmentů peptidové páteře v naměřených spektrech je zároveň eliminován předešlou znalostí aminokyselinové sekvence glykoproteinu.

1.2.2 Kapalinová chromatografie v glykoproteomice

Proteolytickým štěpením glykoproteinů vznikají vysoce heterogenní vzorky a měřené směsi obsahují glykoformy v nízkých koncentracích. Ionizace glykopeptidů při MS analýze je také obecně méně účinná, a to zejména v přítomnosti neglykosylovaných peptidů [62]. Pro nízké koncentrace analytu a snížení efektivity ionizace se pro analýzu glykopeptidů běžně užívá separace vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Standardem proteomické analýzy je robustní chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) složená z nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze [63]. Separační uspořádání využívá hydrofobních interakcí analytu se stacionární fází, a je proto vhodné pro analýzu nepolárních látek jako jsou peptidy. Polyhydroxylové glykany jsou značně polární a s hydrofobní stacionární fází RP-HPLC proto neinteragují dostatečně v důsledku čehož nedochází k účinnému rozlišení jednotlivých glykoform glykopeptidů. Ty tak koeluují ve úzkém retenčním okně určeném převážně jejich peptidovou páteří [64]. Z tohoto důvodu se pro analýzu glykopeptidů uplatňují i jiné chromatografické módy, zejména hydrofilní interakční chromatografie.

1.2.2.1 Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) využívá polární stacionární fázi s mobilní fází tvořenou směsí nepolárních organických rozpouštědel a menším obsahem vody. Interakci analytu se stacionární fází zajišťuje velký výběr polárních funkčních skupin navázaných na částice chromatografické kolony jako jsou nitrilové, amidové či hydroxylové skupiny [64]. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se běžně užívá pro separaci polárních látek a metoda je schopná rozlišit glykoformy glykopeptidů včetně jejich izobarických strukturních izomerů [65]. Ačkoliv je tato metoda obecně méně robustní a citlivější na změny experimentálních podmínek, stává se HILIC často užívanou metodou pro separaci glykopeptidů.

Princip HILIC je komplexní a dosud není zcela vysvětlen a lze jej rozdělit na mechanismy společné pro všechny stacionární fáze HILIC a mechanismy specifické, které závisí na konkrétní chemii stacionární fáze [66]. Chromatografický mód je unikátní svým separačním mechanismem podobným kapalinové extrakci, který je společný pro veškeré kolony HILIC. Vodná složka mobilní fáze tvoří imobilizovanou vrstvu na povrchu stacionární fáze, čímž vzniká rozhraní vody a organického rozpouštědla, na kterém dochází k rozdělování analytu. Dělení analytu mezi dvě fáze pak určuje retenci analyzovaných látek [67]. K jejich separaci však dále přispívají i jiné interakce podle použité stacionární fáze [68]. Neutrální stacionární fáze jako jsou amidové či hydroxylové fáze využívají tvorby vodíkových vazeb s analytem. Jako stacionární fáze je možné využít i látky iontové povahy a separační mechanismus je tak rozšířen o elektrostatické interakce [69]. Pro separaci polárních látek lze také použít stacionární fáze s napojenými aminokyselinami jako je cystein, arginin nebo histidin a existují i kolony s připojenými oligosacharidy přispívajícími k retenci analytu s glykanovou složkou [70]. Vliv interakcí se pro každou stacionární fázi liší a není možné jej proto obecně definovat. Retence analytu je výsledkem všech jeho interakcí se stacionární fází.

1.2.2.2 Predikce retenčního chování glykopeptidů

Predikce retenčního chování peptidů při chromatografické separaci je užitečnou součástí analýzy. Využití LC-MS analýzy peptidů vede ke generaci velkého množství dat, jež jsou časově náročná na manuální interpretaci a vyžadují znalost operátora v oboru. Je proto výhodné z LC-MS analýzy využívat naměřené retenční časy pro identifikaci analytu, k čemuž může sloužit predikce retenčních časů [71]. Shoda predikovaných časů eluce analyzovaných peptidů s experimentálně získanými časy může sloužit jako konfirmační parametr, čímž je usnadněna interpretace naměřených dat.

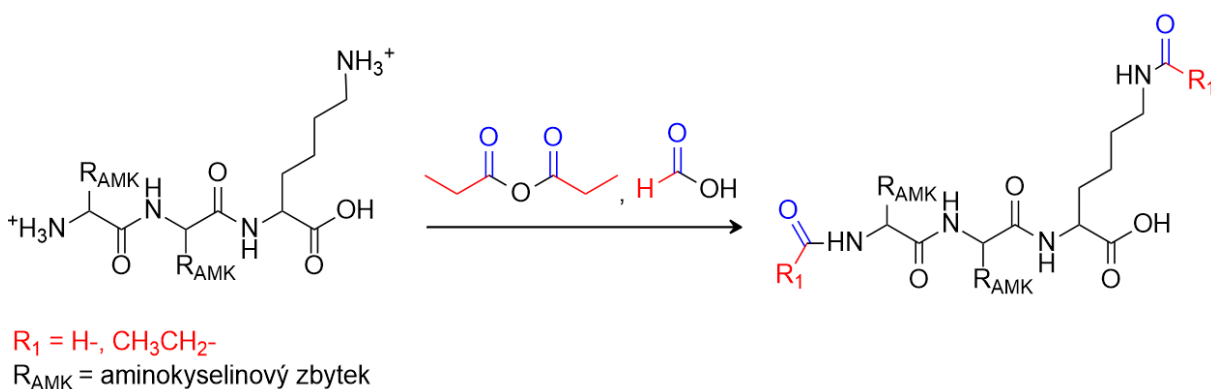
Predikční modely mohou být vytvořeny pomocí rozdílných přístupů. Například model sestavený vědeckým týmem Georgijské univerzity [72] využívá vícenásobné lineární regrese pro určení retenčních koeficientů aminokyselin z elučních časů 118 neglykosylovaných peptidů. Zjištěné koeficienty slouží k predikci retenčního chování peptidů při separaci HILIC. Predikční modely mohou být také založeny na strojovém učení [73,74]. Statistické přístupy sestavení predikčního modelu však nevysvětlují separační mechanismus způsobující pozorované retenční chování. Nevýhodou přístupů je dále nutnost modely konstruovat z velkého souboru spolehlivě určených glykopeptidů. Pro neglykosylované peptidy je méně obtížné tyto objemné soubory dat získat díky možnosti automatizace identifikačního procesu. Glykopeptidy jsou však stále identifikovány převážně manuálně a nelze proto výše zmíněné postupy jednoduše aplikovat a modely pro predikci retence glykoproteinů jsou méně časté. Byly vyvinuty méně spolehlivé modely pro predikci retence dle glykanového složení [75] i peptidového složení [76] glykopeptidů. Doposud však neexistuje sjednocený model schopný předpovědět retenční chování na základě cukerné i aminokyselinové složky glykopeptidů.

Tato diplomová práce se zabývá tvorbou modelu, který podrobně zkoumá mechanismus retence glykopeptidů při HILIC. Predikční model bude stavěn na zjištěných znalostech o interakci glykopeptidů se stacionárními fázemi HILIC pro popsání jejich retenčního chování. Oproti výše uvedeným predikčním modelům, se tato diplomová práce zabývá vytvořením modelu využitím menšího počtu glykopeptidů snadno získatelných z dostupných standardních glykoproteinů. Tyto glykopeptidy jsou dále modifikovány různými metodami, za cílem určit, jak modifikace ovlivňují retenční chování glykopeptidů, a tím i jaké vlivy působí na separaci glykopeptidů při HILIC.

Predikční model bude také využívat interní standard, od kterého budou jednotlivé predikce počítány. Jako interní standard jsou zvoleny glykopeptidy imunoglobulinu G1 (EEQYNSTYR) a G2 (EEQFNSTFR). Glykopeptidy se liší ve své peptidové páteři záměnou dvou polárních tyrosinu za hydrofobní fenylalanin. Jedná se tedy o dvoubodový standard a experimentálně naměřený rozdíl mezi dvěma glykopeptidy bude sloužit ke kalibraci predikčního modelu pro dané separační podmínky.

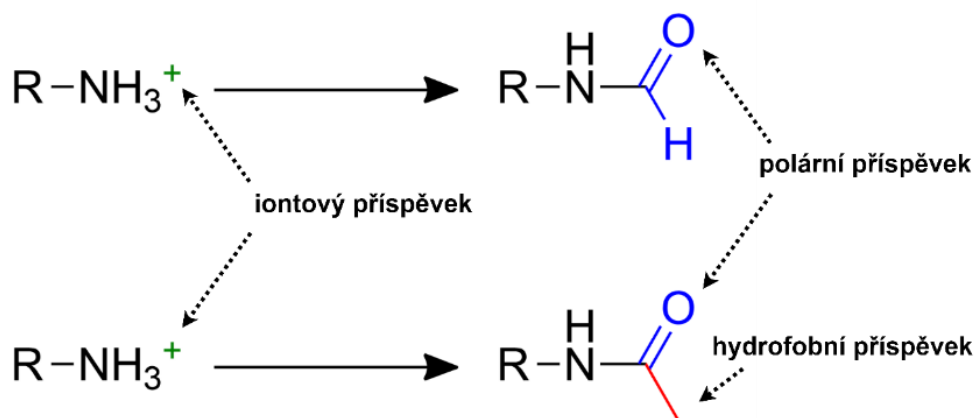
1.2.3 Modifikace glykopeptidů

V této práci je využíváno chemických modifikací propionylace a formylace postupem optimalizovaným v dřívější bakalářské práci se shodným názvem [77]. Chemické modifikace slouží k navázání karbonylové skupiny s odlišným postranním řetězcem na aminoskupiny lysinu a N-konce peptidu za vzniku amidu (obr. 1.5).



Obr. 1.5 Formylace nebo propionylace peptidů na aminoskupinách lysinu a N-konce peptidové páteře.

Při modifikaci dochází ke změnám vlastností peptidové páteře (obr. 1.6). Propionylace a formylace vede k připojení polární skupiny a případně hydrofobního alifatického řetězce. Dále je modifikací potlačen náboj aminoskupin. Dochází tak ke změně hydrofobicity, polarity i nábojového stavu peptidové páteře glykopeptidu. V rámci této práce jsou modifikace užívané pro bodové změny vlastností peptidové páteře za cílem objasnit jejich roli v separaci při HILIC.



Obr. 1.6 Schéma vlastností peptidové páteře upravených formylací (nahore) a propionylací (dole).

Druhým postupem modifikace peptidové páteře glykopeptidů je současné enzymatické štěpení glykoproteinů dvojicí specifických proteáz. Pro tyto účely je využito trypsinu v kombinaci s endoproteázou AspN nebo GluC. Trypsin enzymy štěpí za aminokyselinami lysin a arginin, AspN před aminokyselinou aspartátem a GluC za aminokyselinou glutamátem. Při druhém štěpení tryptických glykopeptidů dochází ke zkrácení části peptidové páteře o některé aminokyseliny a pozorováním rozdílů retence tryptických, a štěpených glykopeptidů je tak možné určit vliv odštěpených aminokyselin na retenční chování glykopeptidů.

2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo určit vliv modifikace peptidové páteře glykopeptidů na jejich retenční chování při separaci pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie na koloně Penta-HILIC. Prvním typem modifikace peptidové páteře byla chemická modifikace propionylace a formylace vedoucí ke změnám vlastností peptidové páteře glykopeptidu jako jsou polarita, hydrofobicita a velikost náboje. Druhým typem užití modifikace bylo enzymatické štěpení peptidové páteře glykopeptidů využitím endoproteáz AspN nebo GluC za cílem odštěpení některých aminokyselin peptidové páteře pro určení jejich vlivu na retenční chování glykopeptidů při HILIC.

Cílem diplomové práce bylo identifikovat nemodifikované a modifikované glykopeptidy separované při HILIC-MS a využít pozorovaných rozdílů v retenci mezi různými formami glykopeptidů pro určení příspěvků, kterými se peptidová páteř podílí na retenci glykopeptidů při separaci na koloně penta-HILIC, zejména příspěvků náboje a jeho pozice. Účelem bylo rozvinout porozumění komplexního mechanismu separace glykopeptidů pro vývoj modelu predikce jejich retenčního chování při HILIC.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

- α 2-3,6,8 neuraminidáza, $\geq 99\%$ (New England Biolabs, USA)
- α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, $\geq 99\%$ (Bruker Daltonics, Německo)
- Acetonitril, $\geq 99\%$ (LiChrosolv hypergrade for LC-MS, Merck, Německo)
- Anhydrid kyseliny propionové, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- Cytochrom c, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda, $\geq 99\%$ (LiChrosolv hypergrade for LC-MS, Merck, Německo)
- Dithiotreitol, $\geq 99\%$ (Carl Roth, Německo)
- Endoproteáza AspN, $\geq 99\%$ (Promega, USA)
- Endoproteáza GluC, $\geq 99\%$ (Promega, USA)
- Ethyl-formiát, $\geq 99\%$ (Thermo Scientific, USA)
- Fetuin A, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí α_1 -kyselý glykoprotein, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrogenuhličitan amonný, $\geq 99\%$ (Penta, Česká republika)
- Hydroxid amonný 25%, (p. a., Merck, Německo)
- Imunoglobulin G, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- Jodoacetamid, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina mravenčí, $\geq 99\%$ (Merck, Německo)
- Kyselina trifluoroctová, $\geq 99\%$ (Honeywell-Fluka, USA)
- Lidský α_1 -kyselý glykoprotein, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- GlycoBuffer 1 (New England Biolabs, USA)
- Serotransferin, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- SOLu-Trypsin, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Přístroje a pomůcky

- Pipety – Eppendorf (Německo), Gilson (USA)
- Analytické váhy – Discovery Semi-Micro and Analytical (Ohaus, Švýcarsko)
- Inkubátor – Dry Bath Incubator (Cleaver Scientific, Anglie)
- Lyofilizátor – Finn Aqua GT2 freeze dryer (Gemini, Nizozemsko)
- Mini-centrifuga – MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)
- Sonikační lázeň – Elmasonic s 30 (Elma, Německo)
- Hmotnostní spektrometry:
 - Bruker maXis qTOF (Bruker Daltonics, USA)
 - Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, USA)
- Kapalinový chromatograf – UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA)
- Chromatografické kolony:
 - Penta-HILIC (AMT, USA), rozměry: 2,1 x 250 mm, velikost částic: 2 μm ,
 - MacroTrap (Michrom BioResources, USA), rozměry: 3 x 8 mm, velikost částic: 50 μm

3.3 Metody použité v práci

Metody použité v této diplomové práci jsou popsány pro alikvot proteinu/glykoproteinu 10 µg, pokud není uvedeno jinak. V rámci práce byly používány alikvoty s různým množstvím proteinů. V případě jiného množství než 10 µg proteinu byly navážky činidel upraveny dle potřeby, není-li psáno jinak. Jako standardní glykoproteiny byly používány fetuin A, hovězí α_1 -kyselý glykoprotein, lidský α_1 -kyselý glykoprotein, imunoglobulin G a serotransferin.

3.3.1 Desializace glykoproteinů

Navážka standardního glykoproteinu ($m = 10 \mu\text{g}$) byla rozpuštěna v roztoku GlycoBuffer 1 do výsledné koncentrace 1 µg/µl. K takto připravenému roztoku bylo přidáno 0,2 µl roztoku α 2-3,6,8 neuraminidázy pro odštěpení kyseliny sialové z glykanů proteinu. Připravená směs byla inkubovaná přes noc při teplotě 37 °C.

3.3.2 Proteolytické štěpení glykoproteinů

3.3.2.1 Štěpení glykoproteinů pomocí trypsinu

Navážka standardního glykoproteinu ($m = 10 \mu\text{g}$) byla rozpuštěna v 50mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného, nebo v případě roztoku glykoproteinu po desializaci (viz kap. 3.3.1) bylo k 10 µl směsi přidáno 2,5 µl 500mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného pro úpravu pH přibližně na hodnotu 7,0. K alikvotu glykoproteinu bylo přidáno 0,555 µl roztoku dithiotreitolu o koncentraci 50 mM pro redukci disulfidových můstků. Alikvot byl inkubován na termobloku po dobu 60 minut při teplotě 60 °C. Následně bylo přidáno 0,98 µl 100mM roztoku jodoacetamidu pro alkylaci thiolových skupin aminokyseliny cystein. Vzorek byl pro zabránění fotodegradace jodoacetamidu ponechán ve tmě a alkylační reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 30 minut. K roztoku glykoproteinu bylo přidáno 0,75 µl 50mM roztoku dithiotreitolu. Do takto připravené směsi bylo přidáno 0,5 µl roztoku trypsinu o koncentraci 1 µg/µl pro štěpení proteinu na jednotlivé peptidy. Proteolytická reakce

byla inkubovaná 12 hodin při teplotě 37 °C. Tryptické štěpení bylo ukončeno přidáním 30% (v/v) mravenčí kyseliny do výsledné koncentrace 1 % (v/v). Získané peptidy byly dále přečištěny pomocí chromatografické kolony MacroTrap kroky popsány v tab. 3.1. Přečištěný alikvot byl následně zmražen a lyofilizován.

Tab. 3.1

Postup přečištění peptidů alikvotu standardního glykoproteinu pomocí kolony MacroTrap. FA – mravenčí kyselina, ACN – acetonitril.

Číslo kroku	Účel kroku	Roztok	Objem [μl]
1	Ekvilibrace	0,5% FA + 80% ACN	500
2		0,5% FA	500
3		0,5% FA + 80% ACN	500
4		0,5% FA	500
5	Nanesení vzorku	Vzorek	Dle vzorku
6		Vzorek	Dle vzorku
7	Promytí	0,5% FA	1000
8	Eluce	0,5% FA + 80% ACN	150

Před uložením byla kolona vyčištěna provedením kroků 1 až 4, a poté z ní byla vymyta mravenčí kyselina promytím 1500 μl 50% roztoku acetonitrilu.

3.3.2.2 Štěpení tryptických peptidů pomocí endoproteáz AspN nebo GluC

Lyofilizovaný alikvot obsahující trypticky štěpené peptidy z 10 µg standardního glykoproteinu (viz kap. 3.3.2.1 na str. 25) byl rozpuštěn v 10 µl 50mM roztoku ethyl-formiátu s obsahem acetonitrilu 20 % (v/v). Do směsi peptidů byl přidán roztok endoproteázy GluC o koncentraci 0,5 µg/µl do výsledného poměru hmotnosti endoproteázy a štěpeného proteinu 1:20 (w/w) nebo roztok endoproteázy AspN o koncentraci 0,5 µg/µl do výsledného poměru 1:100 (w/w). Po přidavku endoproteázy GluC byla směs inkubována po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C a po přidavku endoproteázy AspN byla inkubována 12 hodin při teplotě 37 °C. Reakce byla ukončena přidáním 30% (v/v) mravenčí kyseliny do výsledné koncentrace 1 % (v/v). Takto štěpený vzorek byl následně přečištěn postupem popsáním v kap. 3.4.2.1 na str. 26, zmražen a lyofilizován.

3.3.3 Propionylace a formylace peptidů

Pro postup propionylační reakce byl upraven dříve publikovaný reakční protokol [78].

Pro samotnou propionylaci byl lyofilizovaný alikvot obsahující peptidy vzniklé štěpením 10 µg standardního glykoproteinu (viz kap. 3.3.2 na str. 25) byl rozpuštěn v 30 µl roztoku hydrogenuhličitanu amonného o koncentraci 100 mM. Do roztoku bylo přidáno 6 µl roztoku připraveného smícháním anhydridu propionové kyseliny s acetonitrem v poměru 1:3 (v/v) a následně 6 µl 25% roztoku hydroxidu amonného. Propionylační reakce probíhala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Roztok byl zředěn 50 µl 100mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného, zmražen a lyofilizován.

Pro propionylaci a současnou formylaci byl lyofilizovaný alikvot obsahující peptidy vzniklé štěpením 10 µg standardního glykoproteinu (viz kap. 3.3.2 na str. 25) rozpuštěn v 30 µl 100mM roztoku hydrogenenuhličitanu amonného. Do roztoku bylo přidáno 1,2 µl 30% (v/v) mravenčí kyseliny. Následně bylo do roztoku přidáno 6 µl roztoku anhydridu propionové kyseliny s acetonitrem v poměru 1:3 (v/v). Reakce probíhala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Roztok byl zředěn 50 µl 100mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného, zmražen a lyofilizován.

3.3.4 Měření vzorků pomocí MALDI-TOF

Lyofilizovaný alikvot peptidů standardního glykoproteinu z kap. 3.3.2 na str. 25 a 3.3.3 na str. 27 byl rozpuštěn v 0,1% (v/v) roztoku trifluoroctové kyseliny do výsledné koncentrace glykoproteinu 1 µg/µl. Na MALDI terčík bylo nanášeno 0,5 µl vzorku. Po zaschnutí při laboratorní teplotě byl vzorek převrstven 0,5 µl matrice roztoku α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny o koncentraci 5 mg/ml, trifluoroctové kyseliny o koncentraci 0,05 % (v/v) a s obsahem acetonitrilu 50 % (v/v). Po krystalizaci matrice byl vzorek analyzován hmotnostním spektrometrem Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, USA). Naměřená hmotnostní spektra byla interpretována pomocí softwaru mMass 5.5 [79]. Peptidy byly identifikovány na základě vypočtených teoretických monoizotopických hodnot m/z pro jednotlivé peptidy a jejich srovnáním s naměřenými hodnotami.

3.3.5 Separace glykopeptidů hydrofilní interakční chromatografií

Lyofilizovaný alikvot peptidů z kap. 3.3.2 na str. 25 a 3.3.3 na str. 27 byl rozpuštěn v roztoku 0,1% mravenčí kyseliny a 50% acetonitrilu do výsledné koncentrace standardního proteinu 2 µg/µl. K roztokům peptidů byly přidány trypticky štěpené peptidy imunoglobulinu G (viz kap. 3.3.2 na str. 25) v poměru 2:1 (w/w) jako interní standard. Peptidy standardního glykoproteinu byly separovány na pentahydroxylové koloně Penta-HILIC (2 µm; 2,1 × 250 mm) pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA). Mobilní fází byl při gradientové eluci roztok 0,1% mravenčí kyseliny s obsahem acetonitrilu uvedeným v tab. 3.2 na str. 29 shrnující také další podmínky separace.

Vzorky byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru Bruker maXis qTOF (Bruker Daltonics, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej a byla sbírána hmotnostní spektra v pozitivním módu detekce. Pro fragmentaci iontů bylo využito kolizně indukované disociace. Nastavené parametry hmotnostního spektrometru jsou popsány v příloze 1. Získané chromatogramy byly interpretovány využitím MZMine 4.5 [80].

Pro identifikaci glykopeptidů byly z naměřených dat extrahovány chromatogramy oxoniových iontů vznikajících při fragmentaci glykanů, Takto získané chromatogramy ukazují, ve kterých časech potenciálně eluují glykopeptidy. V těchto časech byly zjištěny hodnoty m/z prekurzorů, jejichž fragmentací vznikly pozorované oxoniové ionty. Z nalezené hodnoty m/z byl identifikován glykopeptid srovnáním experimentální a vypočtené monoizotopické hodnoty hodnoty m/z. Pro validaci identifikace glykopeptidu byly použity b- a y-ionty peptidové páteře ve fragmentačním spektru prekurzoru. Po identifikaci glykopeptidů byly z dat extrahovány jejich chromatogramy využitím monoizotopických hodnot m/z a retenční časy jednotlivých glykoform byly určeny z vrcholů získaných píků. Přípravu vzorků a interpretaci výsledků LC-MS analýzy shrnuje obr. 3.1 na str. 30.

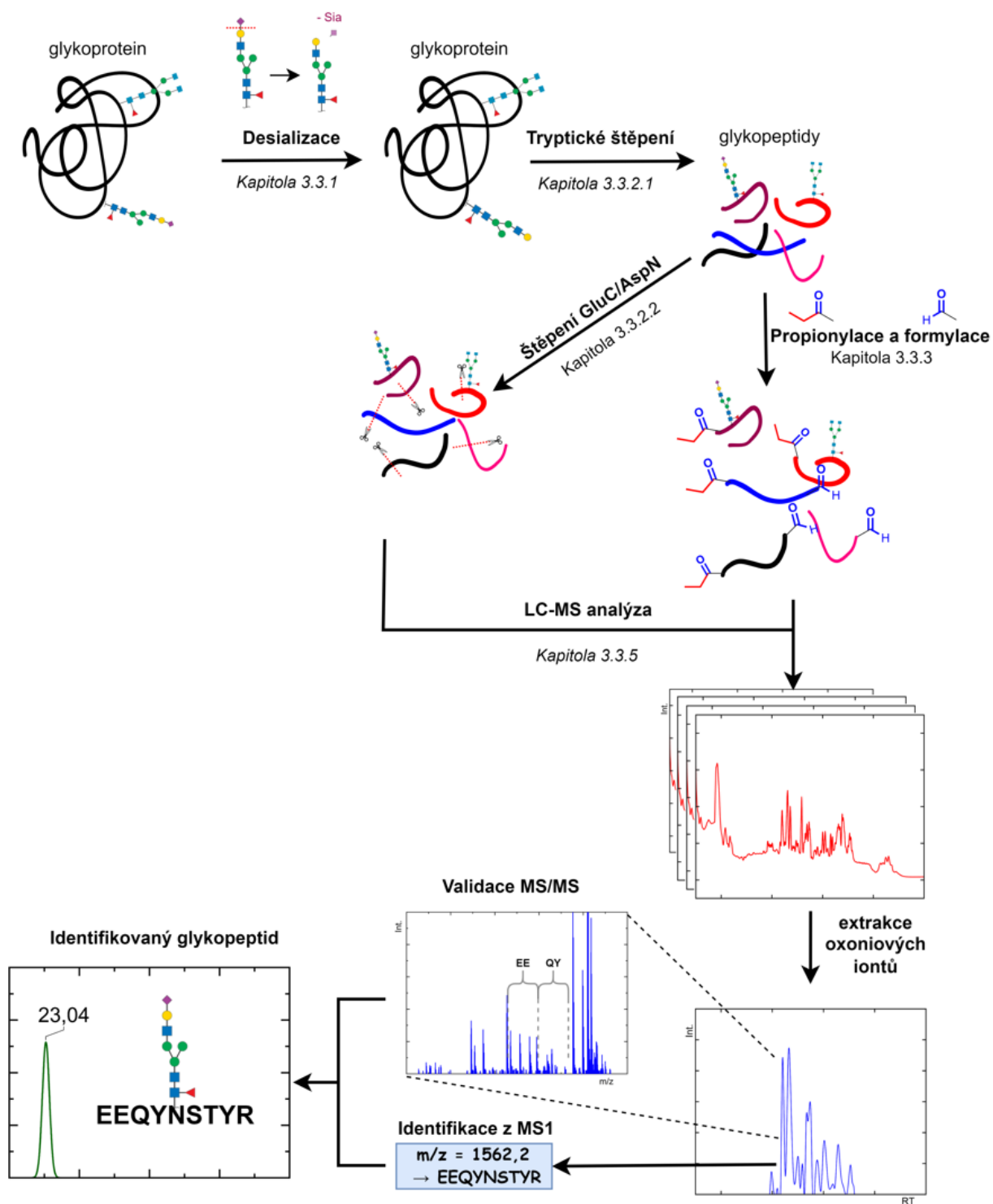
Tab. 3.2

Parametry pro separaci peptidů standardních glykoproteinů při hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií.

Čas	0	10	25	35	40	43	55
Obsah acetonitrilu [% (v/v)]	80	80	65	40	40	80	80
Průtoková rychlost [ml/min]	0,250						
Teplota kolony [°C]	40						
Dávkovaný objem [μl]	8 nebo 12						

Pro možnost porovnání retenčního chování glykopeptidů eluujících v odlišných oblastech chromatogramu je v diplomové práci využíván relativní retenční čas, který je definovaný jako poměr retenčních časů později eluujícího modifikovaného a dříve eluujícího nemodifikovaného glykopeptidu:

$$t_{r,rel} = \frac{t_{r,modifikovaný}}{t_{r,nemodifikovaný}}$$



Obr. 3.1 Schéma přípravy vzorků glykoproteinů a procesu interpretace výsledků LC-MS analýzy připravených glykopeptidů.

4 Výsledky

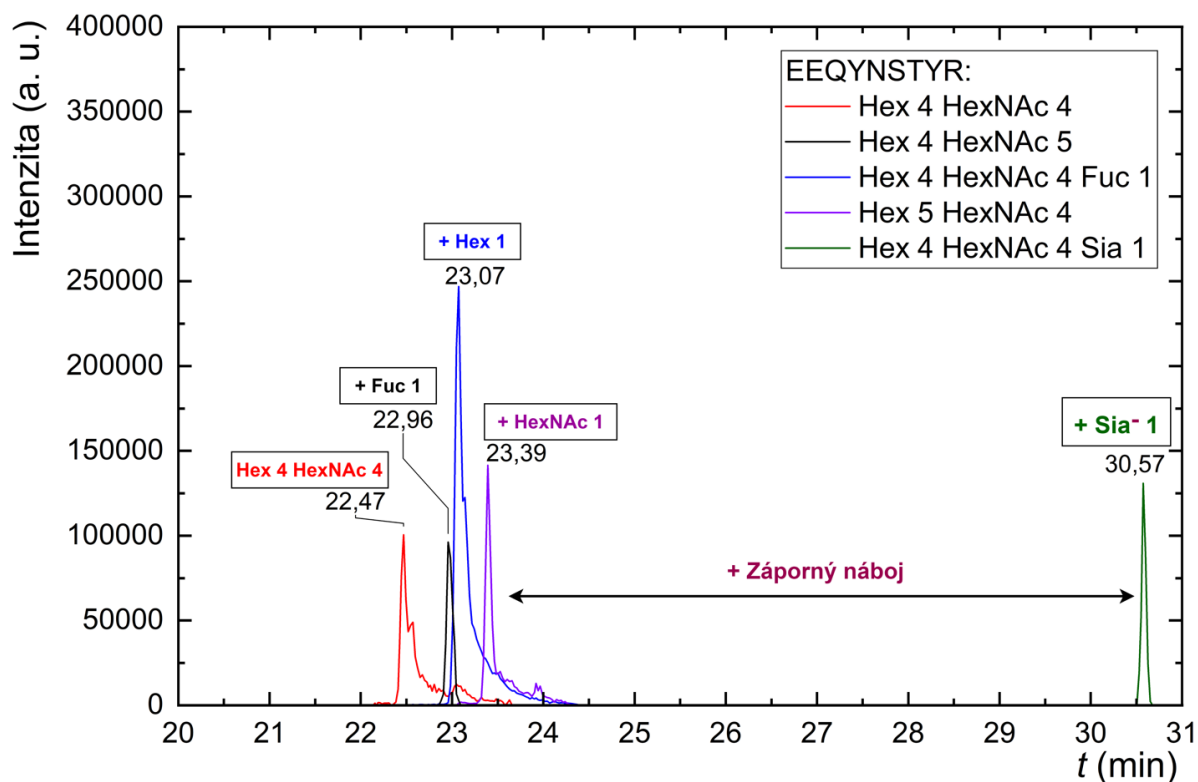
Tento diplomový projekt navazuje na bakalářskou práci [77] a některé používané postupy a protokoly z předchozí práce vychází.

V této diplomové práci bylo studováno retenční chování glykopeptidů při HILIC využívající stacionární fázi s pentahydroxylovými ligandy. Pro tyto účely byly pomocí HILIC-MS analyzované sialované nemodifikované glykopeptidy (kap. 4.1 na str. 32) a různě modifikované glykopeptidy standardních proteinů. Pro modifikaci glykopeptidů se využívala propionylace a formylace (kap. 4.2 na str. 35) a proteolytické štěpení tryptických glykopeptidů pomocí GluC nebo AspN (kap. 4.3 na str. 42). Takto upravené glykopeptidy byly separovány a identifikovány pomocí HILIC-MS. Z rozdílů v retenčních časech nemodifikovaných a modifikovaných glykopeptidů byl sledován vliv modifikací na jejich retenční chování. Posuny retence glykopeptidů jsou v této práci využívány za cílem objasnit mechanismus separace glykopeptidů při HILIC a zjistit, v jaké míře se vlastnosti jako polarita, hydrofobicita, velikost náboje a jeho pozice v rámci peptidové páteře podílí na retenčním chování glykopeptidů. Změna retence vyvolaná modifikací glykopeptidů je vždy způsobena kombinací více mechanismů, a tato práce se zaměřuje zejména na vliv posledních dvou uvedených. Glykopeptidy byly separovány při $\text{pH} \approx 3,0$. Při tomto pH jsou aminoskupiny N-konce peptidu a postranního řetězce argininu ($\text{pK}_a(\text{R}) = 12,48$), histidinu ($\text{pK}_a(\text{R}) = 6,04$) a lysinu ($\text{pK}_a(\text{R}) = 10,79$) kladně nabitě. Karboxylová skupina na C-konci peptidu je při těchto podmínkách záporně nabitá ($\text{pK}_a(\text{COOH})$ jednotlivých aminokyselin se pohybuje v rozmezí 1,71 až 2,63) a karboxylové skupiny asparagové kyseliny ($\text{pK}_a(\text{R}) = 3,86$) a glutamové kyseliny ($\text{pK}_a(\text{R}) = 4,25$) jsou neutrální.

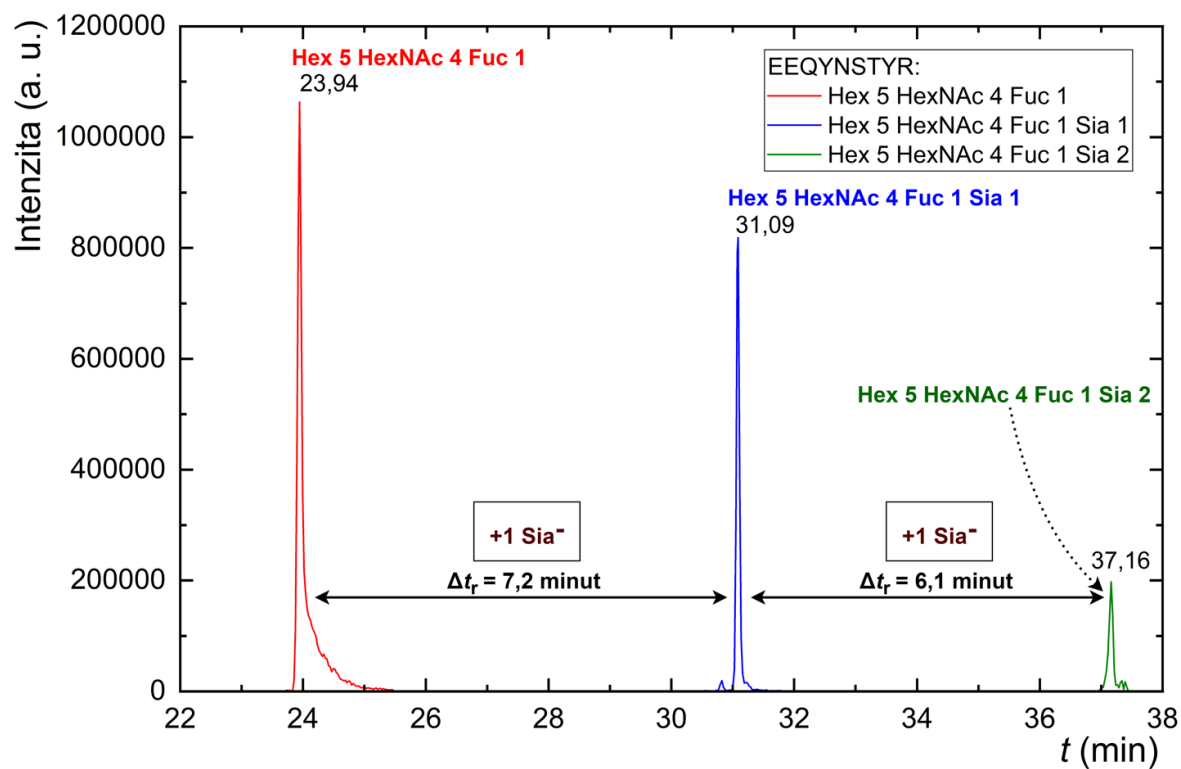
4.1 Sialované glykopeptidy

Standardní glykoproteiny byly trypticky štěpeny postupem popsaným v kapitole 3.3.2.1 na str. 25 a připravené vzorky byly analyzované využitím HILIC-MS s dávkovaným objemem vzorků 8 μ l (kap. 3.3.5 na str. 28). Po identifikaci glykopeptidů byly z naměřených dat zjištěny jejich retenční časy (Příloha 2).

Glykany glykopeptidů mohou obsahovat záporně nabitě sialové kyseliny. Oproti jiným monosacharidům glykanu jsou retenční časy glykopeptidů se sialovanými glykany výrazně vyšší. Srovnání vlivu monosacharidů na retenci glykopeptidů zobrazuje obr. 4.1 na str. 33 ukazující glykoformy glykopeptidu EEQYNSTYR s glykany lišícími se vždy o jeden monosacharid od glykopeptidu EEQYNSTYR Hex 4 HexNAc 4. Monosacharidy fukosa, hexosa a N-acetylglukosamin retenční čas glykopeptidů prodlužují průměrně o hodnotu 0,7 minut ($t_{r,rel} = 1,03$). Oproti tomu záporně nabitá sialová kyselina retenci glykopeptidu posouvá až o 8,1 minut ($t_{r,rel} = 1,36$). Posun retence způsobený sialovou kyselinou je dále možné pozorovat u vícekrát sialovaných glykopeptidů, což znázorňuje obr. 4.2 na str. 33. Přítomnost jedné sialové kyseliny vede k prodloužení retence o hodnotu 7,2 minut ($t_{r,rel} = 1,30$) a rozdíl v retenci jednou a dvakrát sialovaného glykopeptidu je 6,1 minut ($t_{r,rel} = 1,19$). Výrazné prodloužení retence sialovaných glykopeptidů napovídá tomu, že záporný náboj glykopeptidu vede ke zvýšení retence glykopeptidů při HILIC.



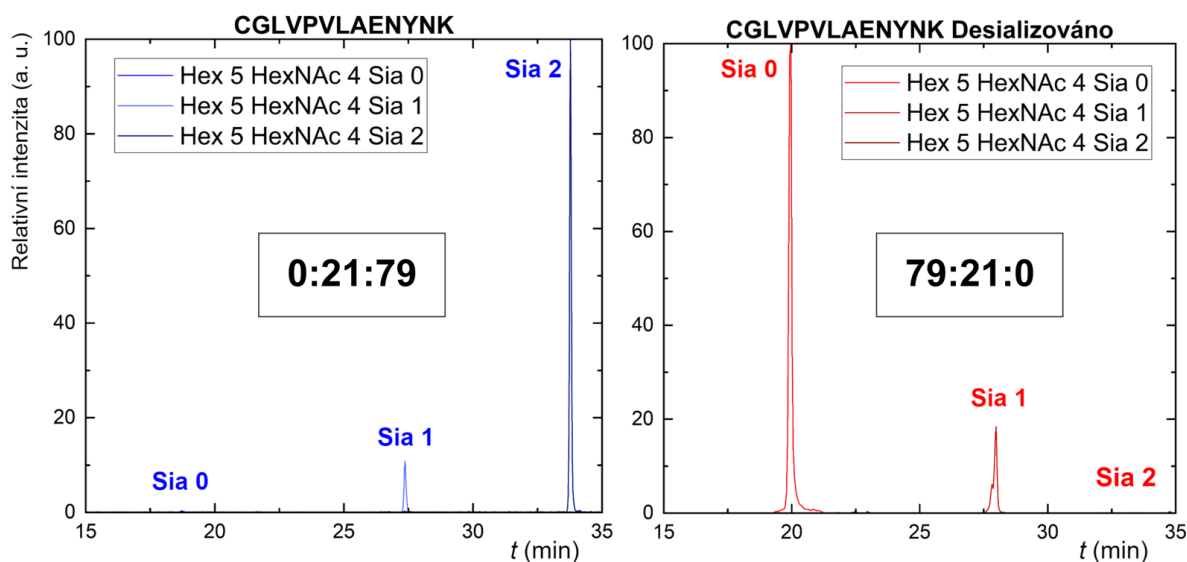
Obr. 4.1 Extrahované chromatogramy glykoform glykopeptidu EEQYNSTYR s glykany lišícími se o různé monosacharidové jednotky.



Obr. 4.2 Extrahované chromatogramy odlišně sialovaných glykoform glykopeptidu EEQYNSTYR.

Glykany různých glykoproteinů jsou sialované v odlišném množství. Aby bylo možné porovnávat retenční chování glykopeptidů různých glykoproteinů, byly glykopeptidy v dalších experimentech desializovány, čímž byly vytvořeny peptidové směsi obsahující více homogenní soubor glykanů na glykopeptidech. Výhodou je také vyšší účinnost ionizace při MS analýze nesialovaných glykopeptidů [81].

Pro desializaci glykoproteinů byl použit objem α 2-3,6,8 neuraminidázy padesátkrát menší, než je doporučeno výrobcem a jako kompenzace zmenšené koncentrace enzymu byl inkubační čas reakce prodloužen na 12 hodin z původního času jedné hodiny. Tímto postupem došlo k úplné desializaci glykopeptidů zhruba ze 79 % (obr. 4.3). Všechny další experimenty byly prováděny s glykopeptidy desializovanými tímto postupem.



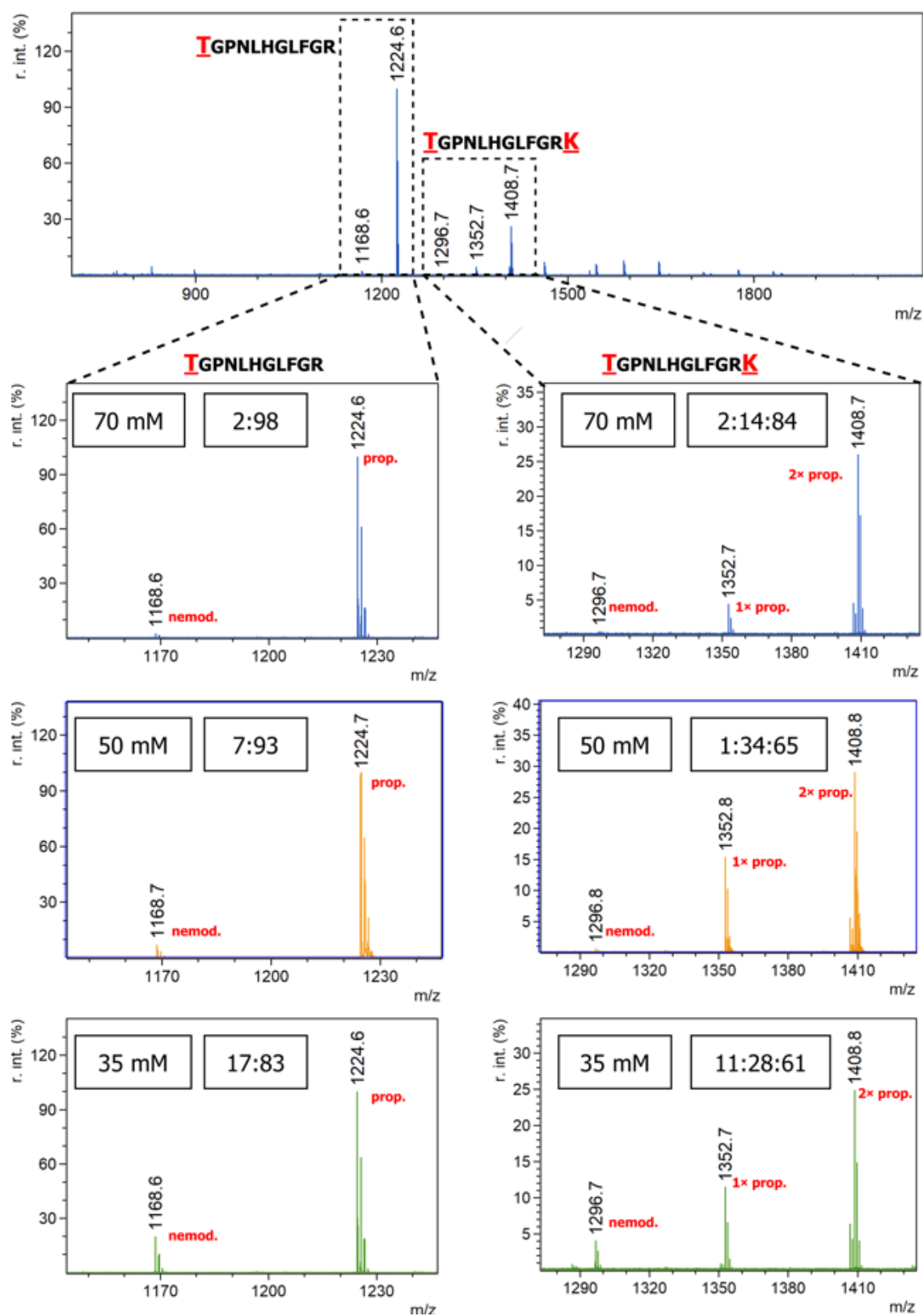
Obr. 4.3 Extrahované chromatogramy sializovaného (vlevo) a desializovaného (vpravo) glykopeptidu CamGLVPVLAENYNK s vyznačenými poměry intenzit pík různě sialovaných glykoform.

4.2 Acylace peptidové páteře glykopeptidů

Tryptickým štěpením glykopeptidů vznikají převážně peptidy zakončené aminokyselinou arginin, které obsahují jednu modifikovatelnou aminoskupinu na N-konci peptidu, a zakončené lysinem s další modifikovatelnou aminoskupinou v bočním řetězci na C-konci peptidu. Tryptické glykopeptidy tak mohou být modifikované propionylací nebo formylací buďto na N-konci, nebo na obou koncích peptidové páteře. Nejprve byly optimalizované reakční podmínky propionylační reakce pro účely studia vlivu pozice propionylace na separaci glykopeptidů při HILIC. Snahou bylo určit reakční podmínky propionylace, při kterých budou vznikat (1) jednou propionylované peptidy s jednou modifikovatelnou aminoskupinou a (2) jednou i dvakrát propionylované peptidy s dvěma aminoskupinami, a zároveň bude v obou případech množství nemodifikovaných peptidů zůstat co nejmenší.

K optimalizaci reakce byl pro nižší náklady a snadnější interpretaci výsledků využit protein cytochrom c. Ten byl nejprve trypticky štěpen (kap. 3.3.2.1 na str. 25) a peptidová směs byla následně propionylována postupem popsáním v kap. 3.3.3 (na str. 27), kdy v návaznosti na dřívější zjištění [77] byly testovány koncentrace anhydridu propionové kyseliny 70; 50 a 35 mM. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí MALDI-TOF (kap. 3.3.4 na str. 28). Cytochrom c obsahuje dva peptidy poskytující intenzivní signály v MS – peptid TGPNLHGLFGR ($m/z = 1168,61$) s jednou aminoskupinou a GPNLHGLFGRK ($m/z = 1296,82$) s dvěma aminoskupinami – ty byly použity jako modelové peptidy pro určení stupně konverze (obr. 4.4 na str. 36).

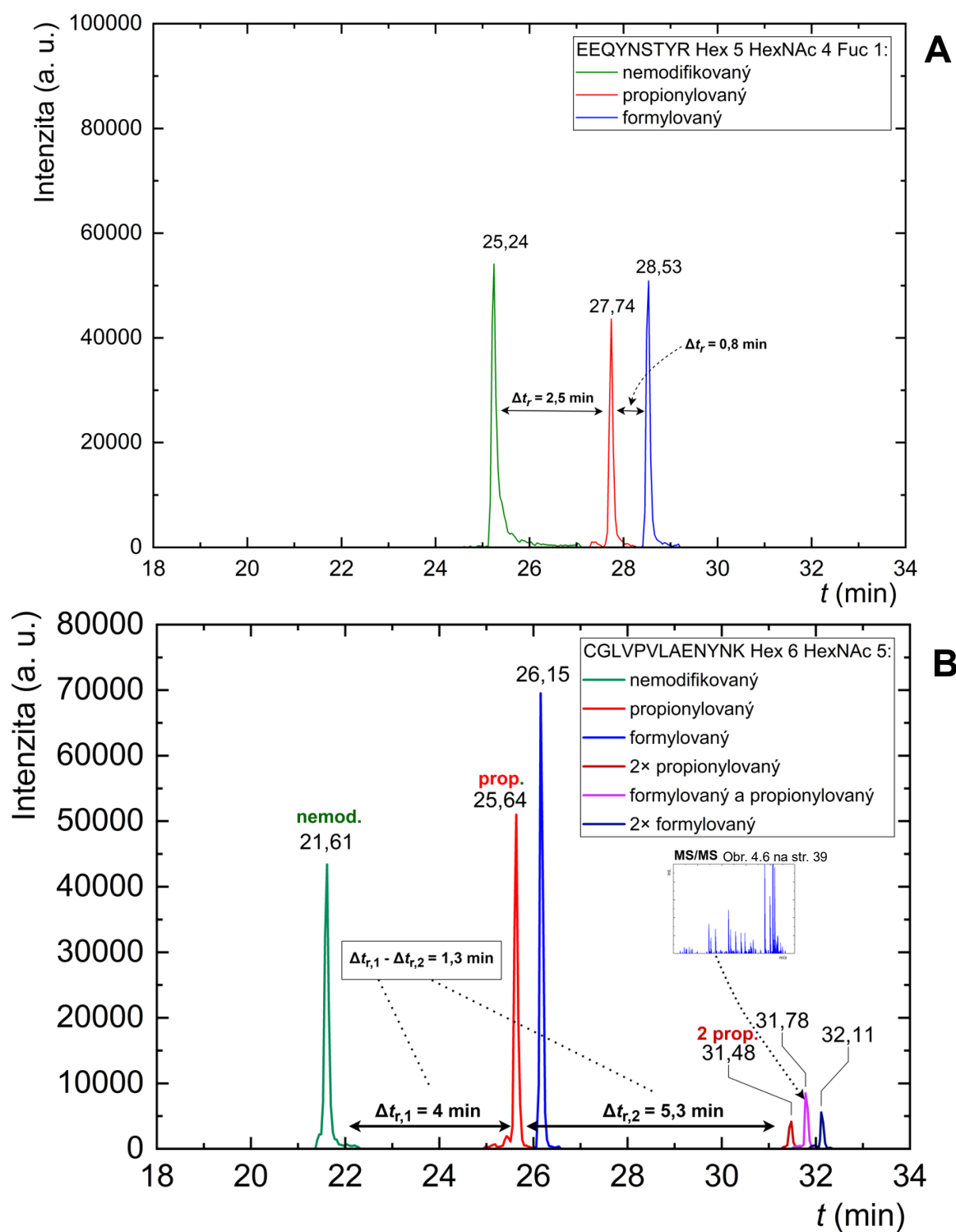
Z porovnaných koncentrací anhydridu propionové kyseliny vyšla pro uvedené peptidy koncentrace 50 mM jako optimální pro částečnou propionylaci peptidů. Reakce s touto koncentrací anhydridu propionové kyseliny vede ke vzniku propionylovaných peptidů s jednou aminoskupinou a vzniku jednou i dvakrát propionylovaných peptidů s dvěma aminoskupinami. Množství nemodifikovaných peptidů je zároveň minimální. Cytochrom c se však ukázal být nevhodným modelovým proteinem pro optimalizaci reakce. Glykopeptidy s dvěma aminoskupinami modifikované původní [77] koncentrací anhydridu propionové kyseliny 274 mM (kap. 3.3.3. na str. 27) byly jednou i dvakrát propionylované, a nebyl tedy důvod využít optimalizované podmínky propionylační reakce. Glykopeptidy analyzované v dalších částech diplomové práce byly proto modifikované postupem popsáním v kap. 3.3.3 na str. 27.



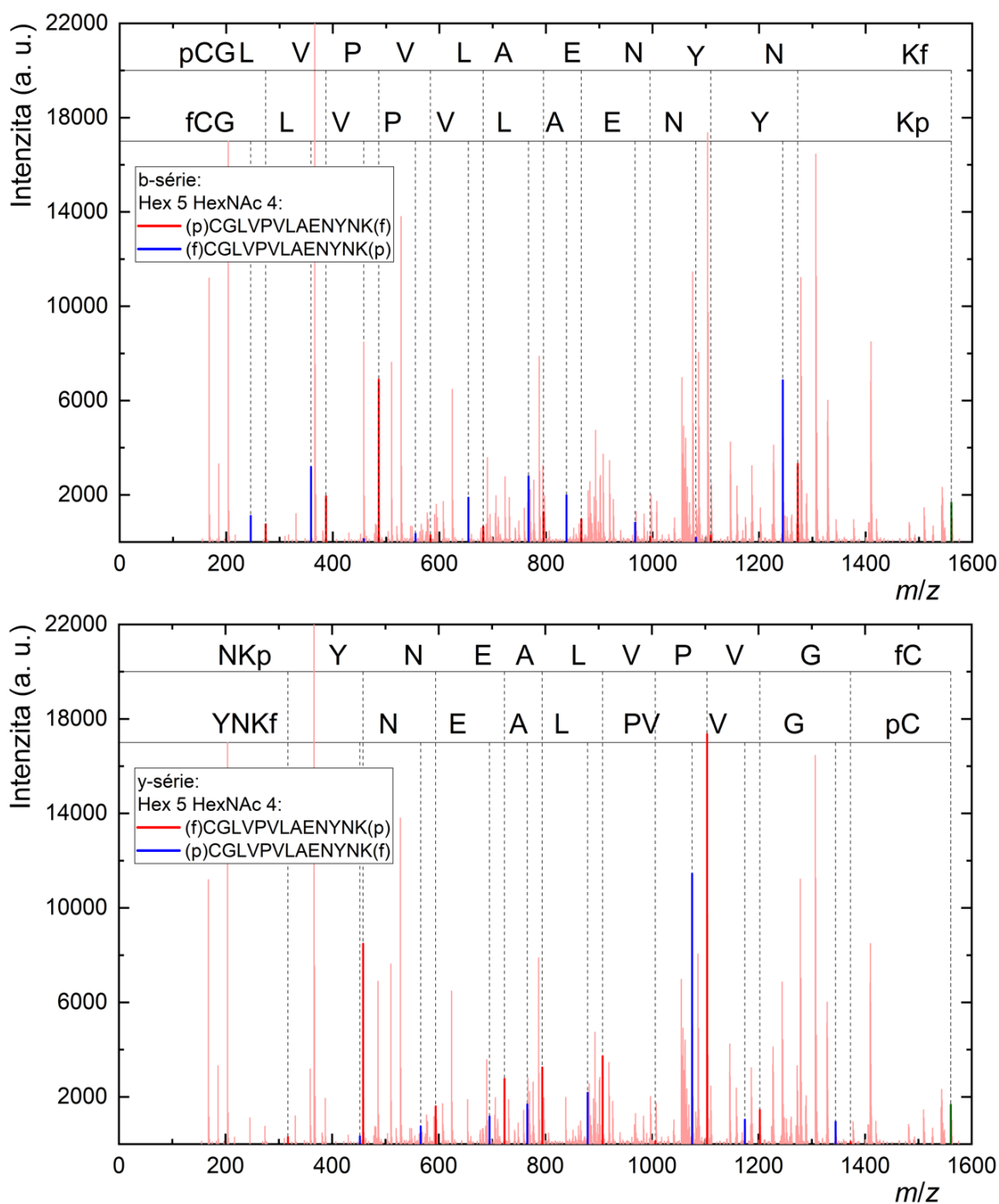
Obr. 4.4 MALDI-TOF spektrum peptidů cytochromu c. V detailu poměry signálů nemodifikovaných (nemod.) a propionylovaných (prop.) peptidů TGPLNHGLFGR (vlevo) a TGPLNHGLFGRK (vpravo) získaných za použití různé koncentrace anhydridu propionové kyseliny při propionylační reakci.

Dále byly standardní glykoproteiny nejprve desializovány postupem popsáným v kap. 3.3.1 na str. 25, proteolyticky štěpeny trypsinem (kap. 3.3.2.1 na str. 25) a rozděleny na alikvoty obsahující 20 μg a 10 μg štěpeného glykoproteinu. Alikvoty obsahující 20 μg štěpených glykoproteinů byly formylované a propionylované postupem popsáným v kapitole 3.3.3 na str. 27. Tím byly vytvořeny dvě sady glykopeptidů – směs nemodifikovaných glykopeptidů a směs propionylovaných a formylovaných glykopeptidů. Vzorky byly následně separovány pomocí HILIC-MS s dávkovaným objemem vzorku 12 μl (kap. 3.3.5 na str. 28) a pro identifikované glykopeptidy byly určeny retenční časy (příloha 3). Příkladem separace různě modifikovaných glykopeptidů s jednou modifikovatelnou aminoskupinou zobrazuje obr. 4.5A na str. 38 a separaci glykopeptidů s dvěma modifikovatelnými skupinami zobrazuje obr. 4.5B na str. 38.

U glykopeptidu z obr. 4.5B ani dalších glykopeptidů se dvěma modifikovatelnými skupinami se nevyskytovaly dvojčíky u současně formylovaných a propionylovaných glykopeptidů, které by odpovídaly rozdílným vlivům N- a C-konce peptidové páteře glykopeptidu na jeho retenční chování. To naznačuje, že pozice modifikace má minimální či nemá vliv na retenční chování glykopeptidu. To potvrzují i fragmentační spektra současně formylovaných i propionylovaných glykopeptidů (obr. 4.6 na str. 39), ve kterých je možné vidět, že retenční časy glykopeptidů formylovaných na N-konci a propionylovaných na C-konci jsou shodné s retenčními časy glykopeptidů propionylovanými na N-konci a formylovanými na C-konci. Obrázek 4.6 na str. 39 ukazuje, že fragmentační spektrum získané z obojetně modifikovaných glykopeptidů obsahuje ionty y- a b-série, které ukazují, že aminokyseliny N-konce i C-konce peptidové páteře glykopeptidu jsou formylované i propionylované, což znamená, že formylované a propionylované glykopeptidy spolu koeluuji bez ohledu na pozici modifikace.



Obr. 4.5 Extrahované chromatogramy nemodifikovaných a modifikovaných glykopeptidů EEQYNSTYR Hex 5 HexNAc 4 Fuc 1 (A) a CamGLVPVLAENYNK Hex 6 HexNAc 4 (B). Barvy píků odpovídají různě modifikovaným glykopeptidům.

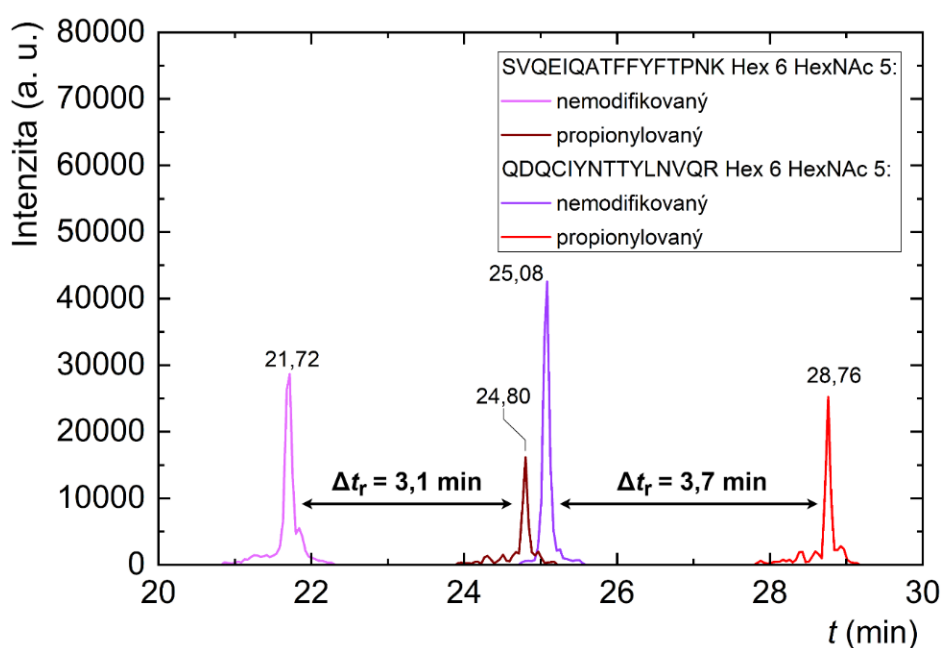


Obr. 4.6 Směsná fragmentační spektra CID obou variant glykopeptidu CamGLVPVLAENYK Hex 5 HexNAc 4 s odlišnými modifikacemi na koncových aminokyselinách. Hodnota m/z fragmentovaného iontu je 1062,13 s velikostí náboje +3. Ve spektru jsou anotované b-ionty (nahore) a y-ionty (dole). Zkratka p znamená propionylaci a f znamená formylaci.

U glykopeptidu CamGLVPVLAENYK Hex 6 HexNAc 5 (obr. 4.5 na str. 38; Cam značí alkylovaný cystein) je výrazná odlišnost – 1,3 minuty – v rozdílech retence nemodifikovaného a jednou propionylovaného oproti jednou a dvakrát propionylovaného glykopeptidu.

Rozdíl v retenci může být způsoben odlišnými nábojovými stavy jednou a dvakrát modifikovaných glykopeptidů. Jednou propionylovaný peptid CamGLVPVLAENYNK je neutrální (rozdíl retence 4 minuty; $t_{r,rel} = 1,19$) a dvakrát propionylovaný peptid má výsledný náboj -1 (rozdíl retence 5,3 minut; $t_{r,rel} = 1,23$). Rozdíl v retenčním chování jednou a dvakrát modifikovaných glykopeptidů je proto možné stejně jako v případě sialovaných glykopeptidů (kap. 4.1 na str. 32), u kterých byly pozorované relativní retenční časy $t_{r,rel} = 1,30$ a $1,19$, přiřknout vlivu velikosti náboje glykopeptidu.

U glykopeptidů SVQEIQATFFYFTPKNK a QDQCamIYNTTYLNVQR (obr. 4.7) dochází při propionylaci k obdobným posunům retence jako u glykopeptidu CamGLVPVLAENYNK (rozdíl retence 3,1 minut; $t_{r,rel} = 1,14$ a rozdíl 3,7 minut; $t_{r,rel} = 1,15$). Uvedené glykopeptidy mají srovnatelně dlouhou peptidovou páteř a identické změny nábojového stavu při propionylaci jako glykopeptid CamGLVPVLAENYNK. Pozorované rozdíly retence jsou podobné dříve popsanému glykopeptidu a odpovídají tak určenému vlivu náboje u předchozích glykopeptidů.

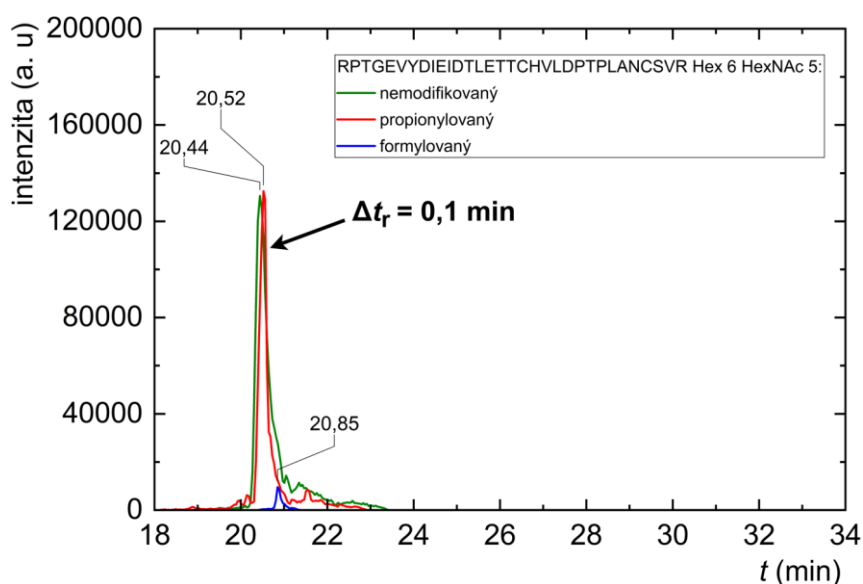


Obr. 4.7 Extrahované chromatogramy glykopeptidů SVQEIQATFFYFTPKNK a QDQCamIYNTTYLNVQR s glykanem Hex 6 HexNAc 5 ukazující rozdíl v posunu retence vyvolaný propionylací peptidové páteře u obou glykopeptidů na základě jejich aminokyselinového složení.

Rozdíl v retenci nemodifikovaných a modifikovaných glykopeptidů je také závislý na peptidové páteři glykopeptidů, což je zřetelné srovnáním dvou peptidů

CamGLVPVLAENYNK a RPTGEVYDIEIDTLETTCamHVLDPTPLANCamSVR (obr. 4.8). Propionylace kratšího z glykopeptidů způsobí až čtyřminutový posun retence, oproti tomu delší z peptidů je propionylací téměř neovlivněn (rozdíl retence 0,1 minut; $t_{r,rel} = 1,01$). To může být způsobeno nábojovým stavem dvou glykopeptidů. Peptid RPTGEVYDIEIDTLETTCamHVLDPTPLANCamSVR má při separačních podmínkách nábojový stav +3 a po propionylaci N-konce náboj +2 díky kladně nabitému postrannímu řetězci aminokyseliny histidin. Oproti tomu má nemodifikovaný glykopeptid CamGLVPVLAENYNK nábojový stav +1 a po propionylaci je neutrální. Velký posun retence glykopeptidu CamGLVPVLAENYNK oproti glykopeptidu RPTGEVYDIEIDTLETTCamHVLDPTPLANCamSVR v důsledku propionylace proto může být způsoben i ztrátou celkového náboje glykopeptidu. To by napovídalo tomu, že kladný náboj peptidové páteře zmenšuje retenci glykopeptidů při HILIC.

Možným vysvětlením jevu však může být také odlišná velikost jejich peptidové páteře. Glykopeptid s peptidovou páteří RPTGEVYDIEIDTLETTCamHVLDPTPLANCamSVR (monoizotopická hmotnost peptidu je 3726,783 Da) je podstatně objemnější než kratší CamGLVPVLAENYNK (monoizotopická hmotnost je 1531,768 Da). Navázání krátkého propionylového zbytku tak způsobí relativně menší změny vlastností peptidové páteře než při navázání propionylu na kratší glykopeptid.



Obr. 4.8 Extrahované chromatogramy nemodifikovaného a propionylovaného nebo formylovaného glykopeptidu RPTGEVYDIEIDTLETTCamHVLDPTPLANCamSVR Hex 6 HexNAc 5.

4.3 Separace glykopeptidů štěpených dvěma proteázami

Standardní glykoproteiny byly nejprve desializovány (kap. 3.3.1 na str. 25) a štěpeny pomocí trypsinu (kap. 3.3.2.1 na str. 25). Trypticky štěpené glykopeptidy byly rozděleny na dvě sady alikvotů obsahujících ekvivalent 10 µg štěpeného glykoproteinu a následně štěpeny endoproteázou GluC nebo AspN (kap. 3.3.2.2 na str. 27). Peptidové směsi byly separovány pomocí HILIC-MS s dávkovaným objemem vzorku 8 µl (kap. 3.3.5 na str. 28) a pro identifikované glykopeptidy (tab. 4.1) byly určeny retenční časy (příloha 4).

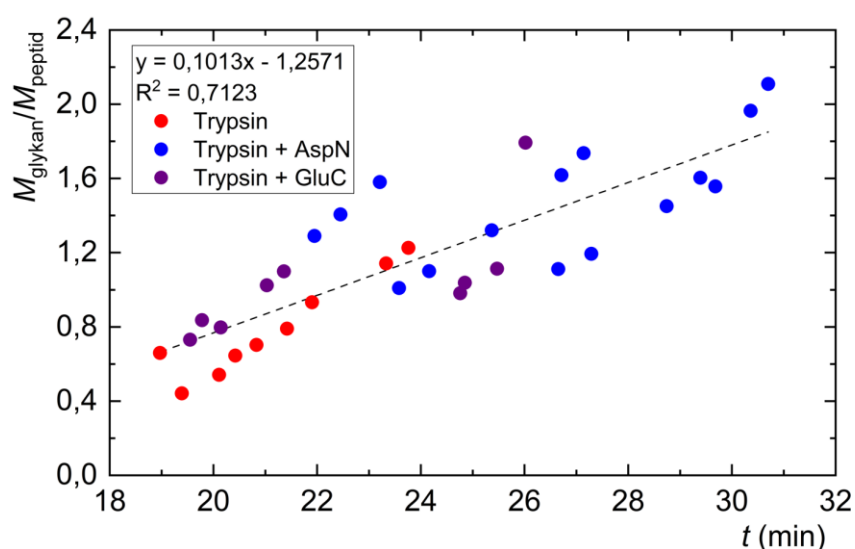
Endoproteáza GluC štěpí proteiny za glutamovou kyselinou a AspN štěpí proteiny před asparagovou kyselinou, a obě tak umožňují odštěpení dílčích částí peptidové páteře tryptických peptidů získaných v prvním proteolytickém kroku. Analýzou nově vzniklých glykopeptidů je možné pozorovat, jak se retenční chování glykopeptidů separovaných při HILIC liší v závislosti na změně jejich peptidové páteře jako je ztráta kladného náboje peptidu, ztráta polárních nebo hydrofobních aminokyselin či výrazná změna velikosti peptidu.

Tab. 4.1

Identifikované peptidové páteře glykopeptidů vzniklých sekvenčním proteolytickým štěpením pomocí trypsinu a AspN nebo trypsinu a GluC. Pro srovnání jsou uvedeny tryptické glykopeptidy s naznačeným místem štěpení druhé proteázy. Zkratka Q(pyro) značí modifikovanou aminokyselinu pyroglutamát.

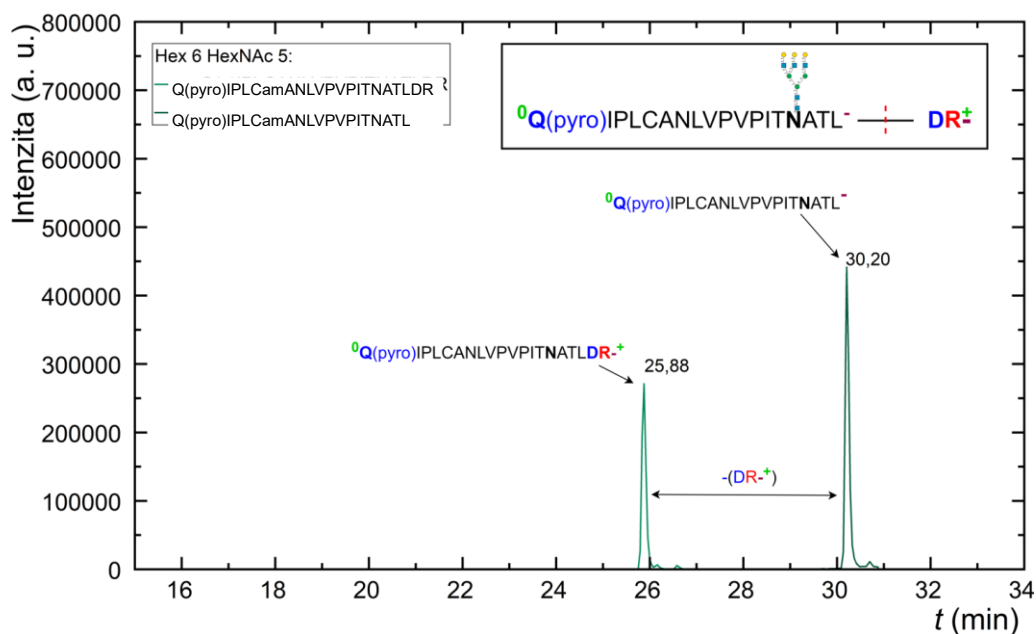
Protein	Peptidová páteř štěpená trypsinem	Identifikované peptidové páteře nově vzniklých glykopeptidů
	LCamP – DCamPLLAPLN – DSR	DCamPLLAPLNDSR, DCamPLLAPLN
Fetuin A	RPTGEVYDIEIDTLE – TTCamHVL – DPTPLANCamSVR	TTCamHVLDPTPLANCamSVR, DPTPLANCamSVR
	VVHAVE – VALATFNAE – SNGSYLQLVE – ISR	VALATFNAESNGSYLQLVE, SNGSYLQLVE
Hovězí α_1 -kyselé glykoprotein	CamANLMTVAPITNATM – DLLSGK	CamANLMTVAPITNATM
Lidský α_1 -kyselé glykoprotein	Q(pyro)IPLCamANLVPVPITNATL – DR	Q(pyro)IPLCamANLVPVPITNATL
	Q – DQCamIYNTTYLNVQR	DQCamIYNTTYLNVQR
Serotransferin	QQQHLFGSNVT – DCSGNFCamLFR	QQQHLFGSNVT

U všech nově identifikovaných glykopeptidů bylo pozorované prodloužení retence po zkrácení jejich peptidové páteře. Ačkoliv se rozdíly v retenci lišily mezi jednotlivými glykopeptidy, vždy docházelo k pozdější eluci u dvakrát štěpených glykopeptidů. Při odštěpení aminokyselin dochází ke zvýšení poměru velikosti glykanu ku velikosti peptidu a tím se zvyšuje relativní vliv polárního glykanu na retenci glykopeptidů. To je pozorovatelné i ze závislosti poměru hmotnosti glykanu ku hmotnosti peptidu na retenčních časech glykopeptidů (obr. 4.9). Z odchylek oproti proložené lineární regresi závislosti je však také zřetelné, že poměr velikosti glykanu ku peptidu není jediným faktorem ovlivňujícím retenci a složení peptidu také hraje roli v mechanismu separace.



Obr. 4.9 Graf závislosti poměru hmotností glykanu ku peptidu glykopeptidů na jejich retenčním čase proložený přímkou lineární regrese (přerušovaná čára).

Obdobnou změnou v retenčním chování, jako v případě propionylovaných glykopeptidů (kap. 4.2 na str. 35), je odštěpení krátkého C-koncového dipeptidu DR z glykopeptidu Q(pyro)IPLCamANLVPVPITNATLDR (obr. 4.10 na str. 44; Q(pyro) značí pyroglutamát). Glykopeptid obsahuje aminokyselinu se vzácnou posttranslační modifikací N-koncové aminoskupiny, která zůstává nenabitá, kladný náboj na argininu a záporný náboj na karboxylové skupině C-konce peptidu. Ztrátou kladně nabitého argininu v dipeptidu DR dochází ke změně nábojového stavu neutrálního glykopeptidu na -1, a jeho retence se prodlužuje o 4,3 minut ($t_{\text{r,rel}} = 1,17$). Tento posun odpovídá změně retence u propionylovaných glykopeptidů, u kterých dochází k retenčnímu posunu vlivem záporného náboje (kap. 4.2 na str. 35). Výrazný posun retence záporně nabitého glykopeptidu tak napovídá tomu, že záporný náboj peptidové páteře vede k větší retenci glykopeptidů při HILIC.

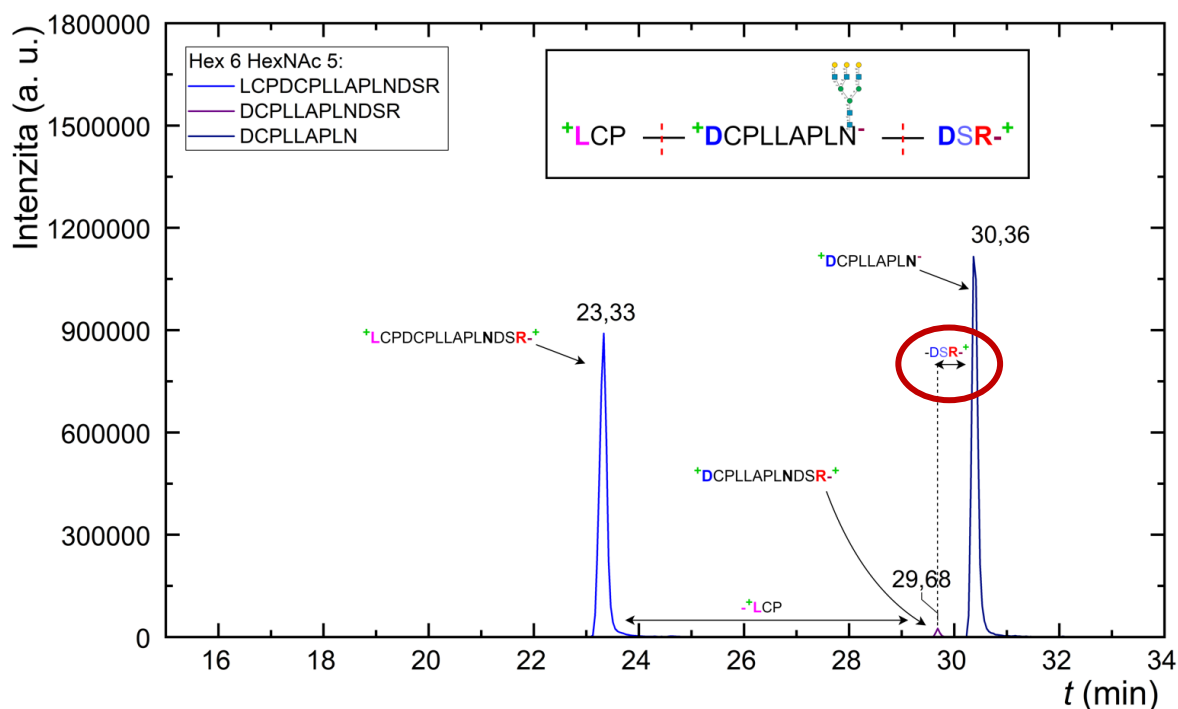


Obr. 4.10 Extrahované chromatogramy glykopeptidu Q(pyro)IPLCamANLVPVPITNATLDR Hex 6 HexNAc 5 a jeho modifikované verze s odštěpeným C-koncovým dipeptidem. Zkratka Q(pyro) znamená pyroglutamátu. V chromatogramu jsou vyznačeny předpokládané náboje na aminokyselinách odpovídající pH při užitých separačních podmínkách.

Podobná ztráta C-koncového tripeptidu DSR při štěpení glykopeptidu s peptidovou páteří LCamPDCamPLLAPLNDSR (obr. 4.11 na str. 45) se projevila jako výrazně menší retenční posun – 0,7 minut ($t_{r,rel} = 1,02$). Na obr. 4.11 na str. 45 je pozorovatelná změna retence v důsledku odpojení skupiny aminokyselin DSR mezi štěpenými glykopeptidy DCamPLLAPLNDSR a DCamPLLAPLN.

Zatímco odštěpené části se lišily jen málo, oba původní peptidy – DCamPLLAPLNDSR a Q(pyro)IPLCamANLVPVPITNATLDR – se lišily velikostí náboje, který se štěpením změnil z +1 na 0 v případě prvního a z 0 na -1 v případě druhého z glykopeptidů. Rozdílné retenční chování glykopeptidů tak může být vysvětleno vlivem náboje glykopeptidu.

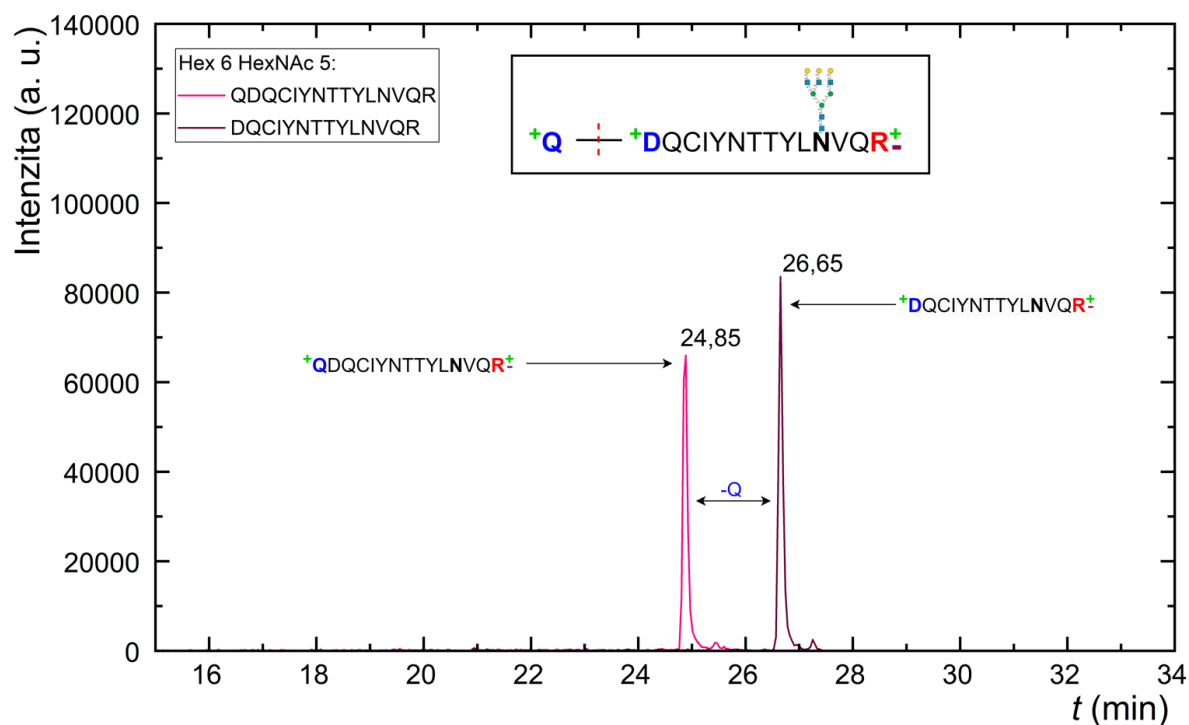
Ačkoliv rozdíly v posunech retenčních časů dvou glykopeptidů DCamPLLAPLNDSR a Q(pyro)IPLCamANLVPVPITNATLDR mohou být způsobeny jejich nábojovým stavem, což bylo pozorované také z rozdílů v retenci jednou a dvakrát propionylovaných glykopeptidů (kap. 4.2 na str. 35), nelze zcela vyloučit i jiné jevy, jako je např. odlišná pozice glykanu na peptidové páteři a vzdálenost odštěpených aminokyselin od glykanu. Aminokyseliny blízké glykanu by jím mohly být stíněné a na retenci by se tak podílely méně.



Obr. 4.11 Extrahované chromatogramy glykopeptidu LCPDCPLLAPLNSR Hex 6 HexNAc 5 ukazující rozdíl v retenci po ztrátě aminokyselin LCP a DSR.

Tím může být vysvětlen i velmi výrazný skok retenčních časů glykopeptidu LCPDCPLLAPLNSR při odštěpení odlišných tří aminokyselin LCP z N-konce peptidu vzdálenějšího od glykanu (rozdíl retence 7 minut; $t_{r,rel} = 1,27$; obr. 4.11). K tomuto výraznému rozdílu bude však nejspíše přispívat i charakter odštěpené skupiny, neboť je odštěpen hydrofobní leucin jako N-terminální aminokyselina a také je na N-konci odkrytý polární aspartát. Roli v retenčním chování glykopeptidu může hrát také přítomnost tří prolinu v aminokyselinové sekvenci, které mohou mít vliv na orientaci ostatních bočních řetězců, což by mohlo vést k menšímu vlivu retenčních příspěvků tripeptidu DSR oproti tripeptidu LCP.

Štěpení glykopeptidu QDQCamIYNTTYLNVQR způsobuje ztrátu polární aminokyseliny glutamin (obr. 4.12 na str. 46). Terminální aminokyselinou se stane polární aspartát se stejnou hodnotou hydropatického indexu podle škály definované R. Doolitlem a J. Kytem [82]. Peptidová páteř si zachovává nábojový stav +1 a změna poměru hmotností glykanu ku peptidu se téměř nemění ($\Delta(M_{glykan}/M_{peptid}) = 0,07$). Ačkoliv nedochází k výrazným změnám vlastností peptidové páteře, je retence zkráceného glykopeptidu prodloužena o hodnotu 1,8 minut ($t_{r,rel} = 1,07$). I polární aminokyselina tedy může snižovat retenci glykopeptidu při separaci pomocí HILIC.



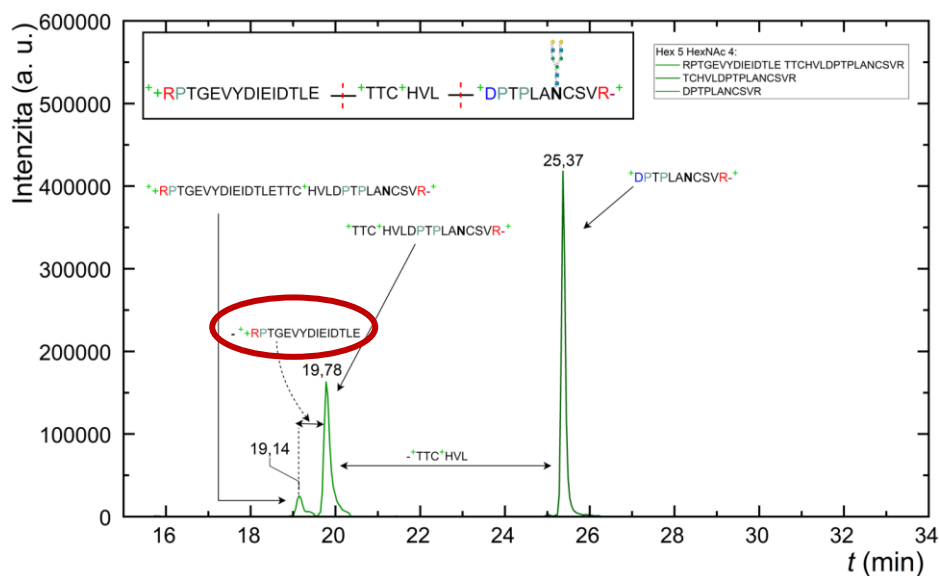
Obr. 4.12 Extrahované chromatogramy glykopeptidu QDQCamIYNTTYLNVQR Hex 6 HexNAc 5 ukazující změnu retenčního chování glykopeptidu po ztrátě aminokyseliny glutamin.

Pro glykopeptidy s delší peptidovou páteří složenou z více než dvaceti aminokyselin (tab. 4.2 na str. 47) je obtížné určit specifické příspěvky způsobující změnu retence při ztrátě části peptidové páteře. Například při ztrátě skupiny aminokyselin RPTGEVYDIEIDTLE způsobené štěpením glykopeptidu RPTGEVYDIEIDTLETTCamHVLDPTPLANCamSVR dochází ke ztrátě kladného náboje, výrazné změně poměru hmotností glykanu a peptidu a odštěpení dlouhého řetězce složeného z polárních, hydrofobních i neutrálních aminokyselin. Ačkoliv dochází k výrazným změnám složení a vlastností glykopeptidu, je pozorovaný posun retence poměrně nevýrazný (rozdíl retenčních časů 0,6 min; $t_{r,rel} = 1,03$; obr. 4.13 na str. 47). Při propionylaci uvedeného glykopeptidu byl pozorován podobně malý posun retence (kap. 4.2 na str. 35). U glykopeptidu s peptidovou páteří QQQHLFGSNVTDCamSGNFCamLFR o délce 21 aminokyselin dochází k obdobné situaci, kdy je rozdíl v retenci glykopeptidu jen 1,3 min ($t_{r,rel} = 1,06$) po ztrátě dekaeptidu DCamSGNFCLFR (obr. 4.14 na str. 47).

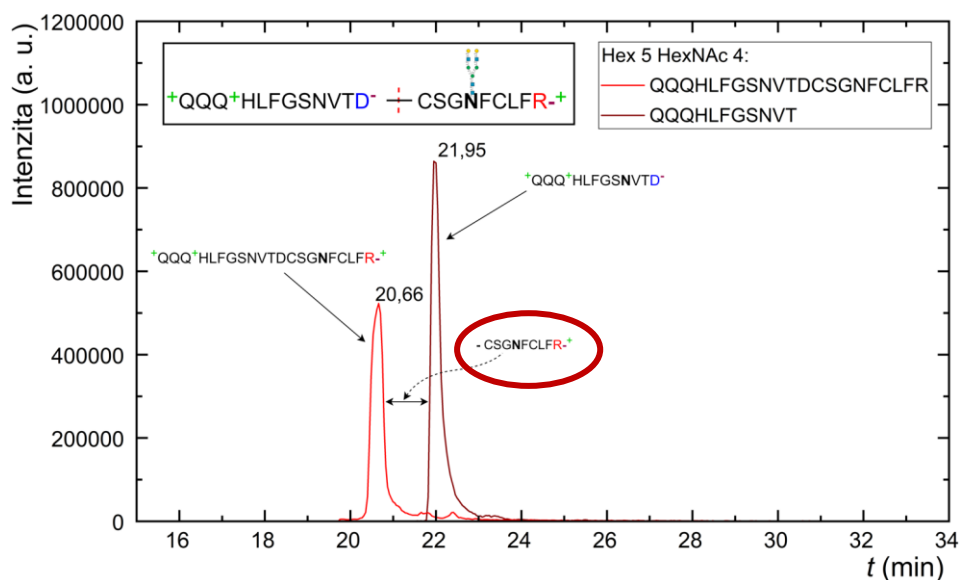
Tab. 4.2

Identifikované tryptické glykopeptidy dlouhou s peptidovou páteří. M značí monoizotopickou hmotnost, pomlčkou jsou označena místa štěpení druhou proteázou.

Peptidová páteř glykopeptidu	M [Da]	Počet aminokyselin
CamANLMTVAPITNATM – DLLSGK	2220,099	21
QQQHLFGSNVT – DCamSGNFCLFR	2514,119	21
RPTGEVYDIEIDTLE – TTCamHVL – DPTPLANCSamVR	3670,763	32
VVHAVE – VALATFNAE – SNGSYLQLVE – ISR	3015,571	28

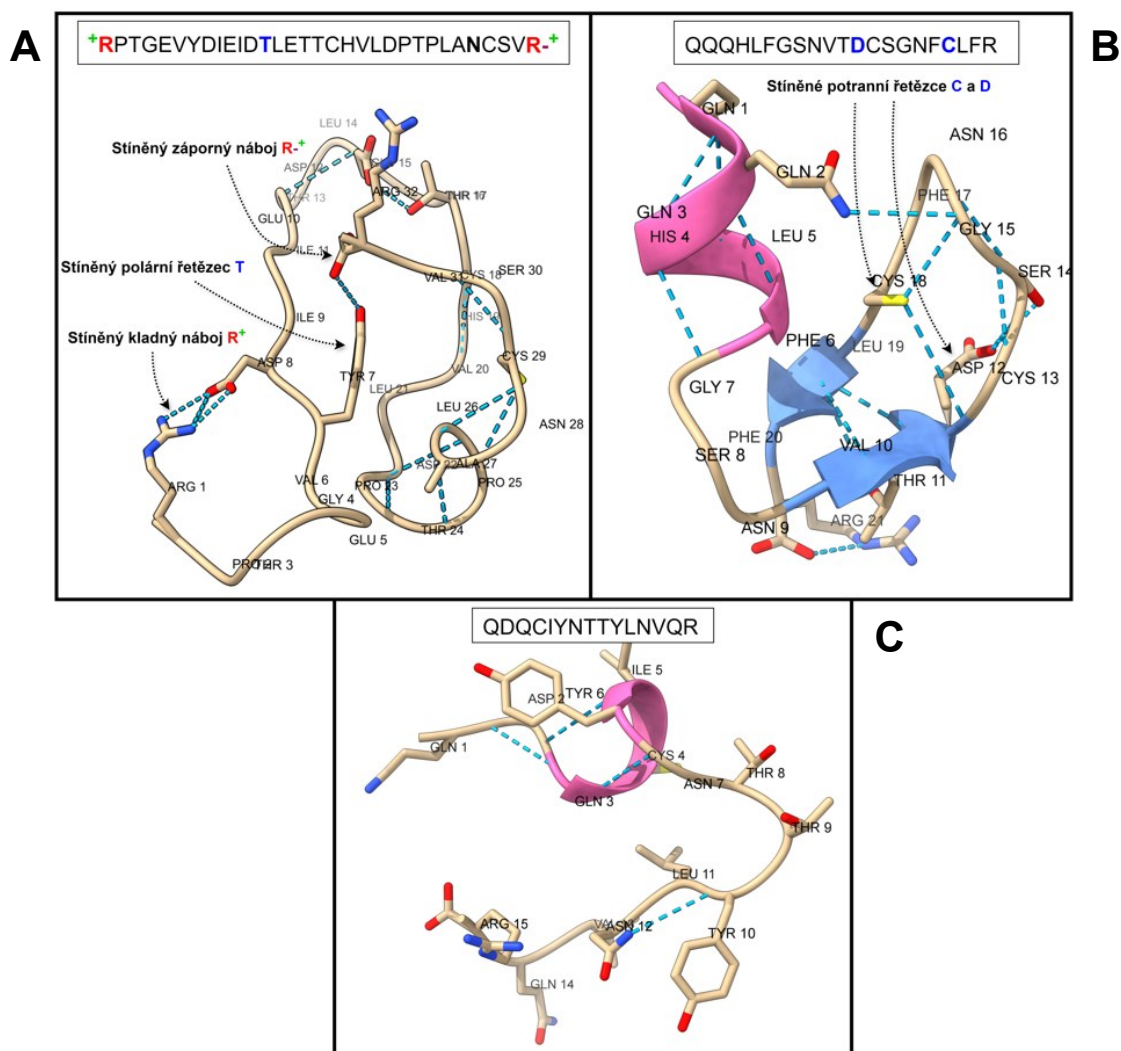


Obr. 4.13 Extrahované chromatogramy glykopeptidu RPTGEVYDIEIDTLETTTCamHVLDPPTPLANCamSVR Hex 5 HexNAc 5 ukazující vliv ztráty aminokyselin RPTGEVYDIEIDTLE a TLETTTCamHVL na retenci glykopeptidu.



Obr. 4.14 Extrahované chromatogramy glykopeptidu QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR Hex 5 HexNAc 4 ukazující relativně malý vliv ztráty dekaeptidu DCamSGNFCLFR na retenční chování glykopeptidu.

Malé rozdíly retenčního chování těchto glykopeptidů mohou být způsobeny jejich prostorovou konformací. Predikce struktury delších peptidů ukazuje tvorbu třídímenzionální konformace, která je stabilizovaná nevazebnými interakcemi (obr. 4.15). Skupiny, které se jich účastní pak méně interagují se stacionární fází a peptid je také kompaktnější než v lineární konformaci. Zobrazené predikce nezohledňují přítomnost glykanu, modifikovaný alkylovaný cystein ani složení rozpouštědla, lze však předpokládat, že zobrazené peptidy nějakou formu prostorové konformace stabilizované intrapeptidovými interakcemi mezi některými aminokyselinami zaujmají. Kratší peptidové páteře glykopeptidů jako QDQCamIYNTTYLNVQR také tvoří prostorové struktury, avšak s menším počtem intramolekulárních interakcí a vyšší flexibilitou (pro srovnání obr. 4.15 A/B a C).



Obr. 4.15 Predikce prostorového uspořádání peptidů: (A) RPTGEVYDIEIDTLETTCamHVLDPPTPLANCamSVR, (B) QQQHLFGSNVTDCamSGNFCLFR a (C) QDQCamIYNTTYLNVQR. Predikce nezohledňují přítomnost glykanu a složení rozpouštědla při HILIC separaci. Ve struktuře jsou vyznačené některé slabé interakce aminokyselin. Použitý predikční software PEP-FOLD3.5 [83] a software pro grafické zpracování ChimeraX [84].

V rámci diplomové práce tak byl sledováním rozdílů v retenčním chování různě sialovaných glykopeptidů (kap. 4.1 na str. 32), chemicky modifikovaných glykopeptidů (kap. 4.2 na str. 35) a glykopeptidů sekvenčně štěpených dvěma proteázami (kap. 4.3 na str. 42) zjištěn výrazný vliv náboje na separaci glykopeptidů při HILIC. Bylo pozorované, že zvyšování velikosti náboje glykopeptidu retenci zkracuje a snižování prodlužuje. Změny velikosti náboje vedly průměrně ke změnám relativní retence $1,17 \pm 0,04$, což bylo pozorované u sialovaných, modifikovaných i některých dvojité štěpených peptidů. Rozdíl retence u glykopeptidů, jejichž náboj zůstal nezměněný, byl výrazně menší s průměrnou hodnotou změny relativní retence $1,04 \pm 0,03$. To bylo pozorované např. u nenabitých monosacharidů v kap. 4.1 na str. 32, nebo při ztrátě glutaminu v kap. 4.3 na str. 42.

Uvedené zákonitosti v retenčních posunech však byly málo spolehlivé pro delší peptidy, protože jejich retence je nejspíše ve vyšší míře ovlivněna intramolekulárními interakcemi, které poté peptidy při separaci netvoří s ligandy stacionární fáze. Také byly identifikované glykopeptidy, jejichž retenci ovlivňují i další vlivy, jako je možný vliv pozice glykanu.

5 Diskuse

Studium glykoproteinů často využívá LC-MS analýzy proteolyticky štěpených glykopeptidů. Ačkoliv je pro jejich separaci stále nejčastěji užívaná chromatografie na reverzní fázi, rozšiřuje se v oboru glykoproteomiky hydrofilní interakční kapalinová chromatografie. Separační mód je pro analýzu glykopeptidů vhodný, neboť je schopný rozlišit jednotlivé glykoformy glykopeptidů včetně jejich izobarických izomerů [65]. Nevýhodou metody je však její nižší robustnost, větší náchylnost na změny experimentálních podmínek a komplexní separační mechanismus, jež není dosud zcela pochopen [64]. Separace glykopeptidů využitím HILIC-MS také často vede k širším naměřeným píkům a obecně nižším signálům, než při RP-HPLC-MS analýze. Naměřená fragmentační spektra tak nemusí být dostatečně kvalitní pro jednoznačnou identifikaci glykopeptidů ve vzorku, a to zejména při analýze komplexních směsí jako jsou krevní sérum a moč, ve kterých se jednotlivé glykoformy nachází ve velmi nízkých koncentracích [32]. Mimo jiné závisí kvalita naměřených dat i na nastavení MS metod, jejichž parametry vhodné pro analýzu různých vzorků se mohou lišit.

Automatizace interpretačního procesu není tak rozvinutá jako při analýze nemodifikovaných peptidů [85] a identifikace glykopeptidů je méně spolehlivá. Získaná MS spektra vyhodnocená pomocí různých specializovaných softwarových nástrojů mohou poskytnout odlišné výsledky, a v některých případech je nutná jejich manuální validace [86].

Vzhledem ke komplexitě interpretačního procesu glykoproteomických dat je vhodné mít k dispozici validační parametr správné identifikace analyzovaných glykopeptidů. Pro tyto účely mohou sloužit modely predikce retenčního chování glykopeptidů při HILIC. Shoda naměřených retenčních časů glykopeptidů s predikovanými časy může sloužit jako konfirmační parametr správného určení glykopeptidu, čímž může být zvýšena spolehlivost validačního procesu.

V oboru glykoproteomiky byly pro HILIC vyvinuté dílčí modely predikující relativní retenční posuny glykoforem glykopeptidů [75] nebo chování neglykosylovaných peptidů [87]. Doposud však neexistuje model pro predikci retenčního chování glykopeptidů podle jejich glykanové složky i peptidové páteře. Vzhledem k multimodálnímu charakteru HILIC a komplexnímu složení glykopeptidů je obtížné vyvinout predikční model, který by zahrnoval veškeré vlivy působící při separaci. Tato práce se proto pokouší kvantifikovat některé z vlivů ovlivňujících

retenci glykopeptidů při HILIC. Ty pak mohou sloužit jako základ stavby predikčního modelu, jež zahrnuje příspěvky peptidové páteře i glykanu glykopeptidů na jejich retenční chování.

Pro studování retenčního chování glykopeptidů bylo v této práci využito chemické modifikace peptidové páteře glykopeptidů – propionylace a formylace. Chemická modifikace glykopeptidů, zejména propionylace, se využívá pro analýzu peptidů pomocí RP-HPLC [88]. Propionylace glykopeptidů při RP-HPLC analýze slouží ke zvýšení jejich hydrofobicity a tím i retence u krátkých peptidů, které by bez modifikace nemusely být zadrženy na koloně. Pro analýzu glykopeptidů při HILIC byla v naší laboratoři propionylace využita již dříve [77], pro určení, v jaké míře hydrofobicita glykopeptidů ovlivňuje jejich retenci při separaci na neutrální koloně penta-HILIC. Využitím chemické modifikace byl však dále zjištěn výrazný vliv náboje glykopeptidů na jejich retenci, čímž se podrobněji zabývá tato navazující diplomová práce.

Sledováním retenčních rozdílů nemodifikovaných a formylovaných nebo propionylovaných glykopeptidů bylo v rámci této diplomové práce zjištěno, že zvyšování velikosti náboje glykopeptidu retenci zkracuje a snižování prodlužuje (viz kap. 4.2 na str. 35). Toto tvrzení bylo dále potvrzeno retenčním chováním glykopeptidů sekvenčně štěpených dvěma endoproteázami (kap. 4.3 na str. 42). Zjištěný vliv záporného náboje na retenci koresponduje s dříve publikovanými výsledky [89], ve kterých je prodloužení retence sialovaných glykopeptidů při separaci pomocí penta-HILIC přiřknuto zápornému náboji sialových kyselin (což bylo pozorované i v této práci; kap. 4.1 na str. 32). V dřívějších publikacích se však jednalo o záporný náboj lokalizovaný na glykanu glykopeptidů, zatímco v této práci se záporný náboj nachází naopak na peptidové páteři glykanu. Prodloužení retence vlivem záporného náboje peptidové páteře bylo dříve popsáno [90]. V uvedené publikaci je však jev popsán u neglykosylovaných peptidů separovaných využitím neutrální amidové HILIC kolony. Ačkoliv v této práci byla využita pentahydroxylová kolona pro separace glykopeptidů, záporný náboj působí na retenci glykopeptidů obdobným způsobem.

V rámci diplomové práce byl také sledován vliv pozice modifikace na retenční chování glykopeptidů (viz kap. 4.2 na straně 35). Sledováním retence současně propionylovaných a formylovaných glykopeptidů bylo zjištěno, že N- a C-konec peptidové páteře glykopeptidů se účastní retence při HILIC ve stejné míře. Publikace zabývající se predikcí retence neglykosylovaných peptidů při HILIC [87,90], rozlišují retenční příspěvky aminokyselin podle

toho, zdali se aminokyseliny nachází na N-konci peptidu. Aminokyselinám na N-konci peptidů je také přisuzován větší vliv na retenční chování studovaných peptidů. V uvedených publikacích jsou analyzované proteiny štěpené pomocí trypsinu, a na C-konci studovaných peptidů se tak převážně nachází aminokyseliny lysin nebo arginin. Vliv C-konce peptidů proto není v modelech zahrnován. Vzhledem k tomu, že N-koncové aminokyseliny vykazují vyšší vliv na retenci peptidů, je pravděpodobné, že aminokyseliny lokalizované na C-konci peptidů budou retenci ovlivňovat stejným způsobem, vzhledem k podobnému efektu, který měla v této práci modifikace na N- nebo C-konci peptidové páteře.

V rámci diplomové práce byl také pozorován vliv délky peptidové páteře glykopeptidů na jejich retenční chování při separaci využitím HILIC (viz kap. 4.3 na str. 42). U glykopeptidů s peptidovými řetězci složenými z více než dvaceti aminokyselin byly pozorované retenční rozdíly napovídají, že sekundární struktury peptidové páteře mohou ovlivňovat, v jaké míře jednotlivé aminokyseliny přispívají k retenci glykopeptidů. Dřívější publikace zabývající se predikcí retenčních časů neglykosylovaných peptidů při HILIC [87] a RP-HPLC [91] popisují stejný jev, který vede k odchylce predikovaných časů od experimentálně získaných hodnot pro delší peptidy.

Porovnáním rozdílů v retenci glykopeptidů štěpených jednou či dvěma proteázami (viz kap. 4.3 na str. 42) bylo také zjištěno, že přítomnost glutaminu v peptidové páteři glykopeptidů vede ke zkrácení retenčních časů – to je v rozporu s predikčními modely popisujícími retenci neglykosylovaných peptidů při HILIC [87,90], které glutaminu připisují zvýšení retence. Ačkoliv predikční model Doriana Yeunga a kol. využívá amidovou HILIC kolonu [90], je predikční model Johna Majorse Badgetta a kol. [87] konstruován na koloně penta-HILIC použité i v této diplomové práci. Rozdíl v retenčním příspěvku glutaminu pro glykopeptidy popsán v této diplomové práci a retenčním příspěvku pro neglykosylované peptidy popsán v publikaci [87] tak napovídá, že retenční koeficienty aminokyselin neglykosylovaných peptidů nelze jednoduše přenést do kalkulace jejich příspěvků k retenci u glykopeptidů.

V rámci diplomové práce byl sledováním rozdílů v retenci odlišně sialovaných, modifikovaných a sekvenčně štěpených glykopeptidů určen vliv náboje peptidové páteře glykopeptidů na separaci při HILIC. Vliv náboje na retenční chování glykopeptidů je ve shodě s dříve publikovanými výsledky, které však popisují pouze vliv náboje glykanu glykopeptidu [89], nebo vliv náboje neglykosylovaného peptidu [90] – výsledky této diplomové práce tak

rozšiřují pochopení vlivu náboje glykopeptidů při HILIC. Zjištěné poznatky bude však vhodné dále studovat separací stejných glykopeptidů na kolonách HILIC spojených s iontově výměnnou chromatografií (IEC/HILIC) po vzoru publikace [92], čímž by bylo možné podrobněji popsat rozdíly vlivů kladného a záporného náboje glykopeptidů na jejich retenční chování.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce bylo studováno retenční chování glykopeptidů při hydrofilní interakční kapalinové chromatografii. Pro tyto účely byla využita formylace a propionylace peptidové páteře glykopeptidů a proteolytické štěpení tryptických glykopeptidů pomocí endoproteáz AspN a GluC. Pozorováním rozdílů v retenčním chování odlišně sialovaných a modifikovaných/štěpených glykopeptidů při HILIC-MS analýze byly identifikovány některé příspěvky glykopeptidů, které se podílí na jejich retenci.

Nemodifikované, propionylované, formylované a štěpené tryptické glykopeptidy pěti glykoproteinů byly analyzovány HILIC-MS. Z pozorovaných rozdílů v retenčním chování glykopeptidů byl určen vliv náboje na retenční chování glykopeptidů. Změna nábojového stavu glykopeptidů vedla k většímu rozdílu relativní retence ($t_{r,rel} = 1,17 \pm 0,04$) oproti rozdílu retence glykopeptidů, u kterých nedocházelo modifikacemi ke změně náboje ($t_{r,rel} = 1,04 \pm 0,03$). Dále bylo potvrzeno, že modifikace na N-konci a C-konci peptidové páteře glykopeptidu mají stejný vliv na retenční chování glykopeptidů. Z naměřených dal byly identifikovány další potenciální příspěvky ovlivňující retenci glykopeptidů: poměr hmotností glykanu a peptidové páteře glykopeptidu, vliv polární aminokyseliny glutamin na retenci, vliv pozice glykanu na retenční příspěvek blízkých aminokyselin a vliv prostorového uspořádání peptidové páteře na retenční chování glykopeptidů.

Seznam použité literatury

- [1] Nelson L. David; Michael M. Cox: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York, W. H. Freeman, 2012.
- [2] Seo, J.-W.; Lee, K.-J.: Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches. *BMB Reports* **37**:1, 35–44 (2004).
- [3] Heijne, G. von: The Signal Peptide. *The Journal of Membrane Biology* **115**:3, 195–201 (1990).
- [4] Lin, S.; Garcia, B. A.: Examining Histone Posttranslational Modification Patterns by High-Resolution Mass Spectrometry. *Methods in Enzymology* **512**, 3–28 (2012).
- [5] Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemistry*. 4th ed. New York, John Wiley & Sons, 2011.
- [6] Imperiali, B.; Hendrickson, T. L.: Asparagine-linked Glycosylation: Specificity and Function of Oligosaccharyl Transferase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **3**:12, 1565–1578 (1995).
- [7] Cao, L.; Diedrich, J. K.; Ma, Y.; Wang, N.; Pauthner, M.; Park, S.-K. R.; Delahunty, C. M.; McLellan, J. S.; Burton, D. R.; Yates, J. R.; Paulson, J. C.: Global Site-specific Analysis of Glycoprotein N-Glycan Processing. *Nature Protocols* **13**:6, 1196–1212 (2018).
- [8] Wang, S.; Edmunds, G. A.; Li, L.; Chen, C.; Wang, P. G.: Introduction: Glycome and the Glyco-toolbox. *Synthetic Glycomes* **11**, 1–14 (2019).
- [9] Cummings, R. D.; Pierce, J. M.: The Challenge and Promise of Glycomics. *Chemistry & Biology* **21**:1, 1–15 (2014).
- [10] Kukuruzinska, M. A.; Lennon, K.: Protein N-Glycosylation: Molecular Genetics and Functional Significance. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **9**:4, 415–448 (1998).
- [11] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.: *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 5th ed. Hoboken, John Wiley & Sons, 2016.
- [12] Cole, C. R.; Smith, C. A.: Glycoprotein biochemistry (biosynthesis) — a vehicle for teaching many aspects of biochemistry and molecular biology. *Biochemical Education* **18**:3, 110–122 (1990).
- [13] Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H.: *Essentials of Glycobiology*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- [14] Higel, F.; Seidl, A.; Sörgel, F.; Friess, W.: N-glycosylation Heterogeneity and the Influence on Structure, Function and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies and Fc Fusion Proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **100**, 94–100 (2016).

- [15] Zacchi, L. F.; Schulz, B. L.: N-glycoprotein Macroheterogeneity: Biological Implications and Proteomic Characterization. *Glycoconjugate Journal* **33**:3, 359–376 (2016).
- [16] Trbojević-Akmačić, I.; Lageveen-Kammeijer, G. S. M.; Heijs, B.; Petrović, T.; Deriš, H.; Wuhler, M.; Lauc, G.: High-Throughput Glycomic Methods. *Chemical Reviews* **122**:20, 15865–15913 (2022).
- [17] Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R.: Characterizing Glycosylation Pathways. *Genome Biology* **2**:5, reviews0004 (2001).
- [18] Wang, Y.; Cao, Y.; Huang, H.; Xue, Y.; Chen, S.; Gao, X.: DHEC Mesylate Attenuates Pathologies and Aberrant Bisecting N-glycosylation in Alzheimer's Disease Models. *Neuropharmacology* **248**, 109863 (2024).
- [19] Wang, Y.; Lei, K.; Zhao, L.; Zhang, Y.: Clinical glycoproteomics: methods and diseases. *MedComm* **5**:10, (2024).
- [20] Reis, C. A.; Osorio, H.; Silva, L.; Gomes, C.; David, L.: Alterations in Glycosylation as Biomarkers for Cancer Detection. *Journal of Clinical Pathology* **63**:4, 322–329 (2010).
- [21] Narimatsu, H.; Sato, T.: Wisteria floribunda Agglutinin Positive Glycobiomarkers: A Unique Lectin as a Serum Biomarker Probe in Various Diseases. *Expert Review of Proteomics* **15**:2, 183–190 (2018).
- [22] Wang, Y.; Liu, S.; Li, J.; Yin, T.; Liu, Y.; Wang, Q.; Liu, X.; Cheng, L.: Comprehensive Serum N-glycan Profiling Identifies a Biomarker Panel for Early Diagnosis of Non-small-cell Lung Cancer. *PROTEOMICS* **23**:20, (2023).
- [23] Scarà, S.; Bottoni, P.; Scatena, R.: CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. *Advances in experimental medicine and biology* **867**, 247–260 (2015).
- [24] Oliveira, T.; Thaysen-Andersen, M.; Packer, N. H.; Kolarich, D.: The Hitchhiker's Guide to Glycoproteomics. *Biochemical Society Transactions* **49**:4, 1643–1662 (2021).
- [25] Xiao, H.; Sun, F.; Suttapitugsakul, S.; Wu, R.: Global and Site-specific Analysis of Protein Glycosylation in Complex Biological Systems with Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **38**:4–5, 356–379 (2019).
- [26] Tian, Y.; Zhang, H.: Glycoproteomics and Clinical Applications. *PROTEOMICS – Clinical Applications* **4**:2, 124–132 (2010).
- [27] Geyer, H.; Geyer, R.: Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1764**:12, 1853–1869 (2006).
- [28] Ongay, S.; Boichenko, A.; Govorukhina, N.; Bischoff, R.: Glycopeptide Enrichment and Separation for Protein Glycosylation Analysis. *Journal of Separation Science* **35**:18, 2341–2372 (2012).
- [29] Chernykh, A.; Kawahara, R.; Thaysen-Andersen, M.: Towards Structure-focused Glycoproteomics. *Biochemical Society Transactions* **49**:1, 161–186 (2021).

- [30] Harvey, D. J.: Proteomic Analysis of Glycosylation: Structural Determination of N- and O-Linked Glycans by Mass Spectrometry. *Expert Review of Proteomics* **2**:1, 87–101 (2005).
- [31] Thaysen-Andersen, M.; Packer, N. H.: Advances in LC–MS/MS-based Glycoproteomics: Getting Closer to System-wide Site-specific Mapping of the N- and O-glycoproteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1844**:9, 1437–1452 (2014).
- [32] Narimatsu, H.; Kaji, H.; Vakhrushev, S. Y.; Clausen, H.; Zhang, H.; Noro, E.; Togayachi, A.; Nagai-Okatani, C.; Kuno, A.; Zou, X.; Cheng, L.; Tao, S.-C.; Sun, Y.: Current Technologies for Complex Glycoproteomics and Their Applications to Biology/Disease-Driven Glycoproteomics. *Journal of Proteome Research* **17**:12, 4097–4112 (2018).
- [33] Zhang, W.; Cao, W.; Huang, J.; Wang, H.; Wang, J.; Xie, C.; Yang, P.: PNGase F-mediated Incorporation of (18)O into Glycans for Relative Glycan Quantitation. *The Analyst* **140**:4, 1082–1089 (2015).
- [34] Piovesana, S.; Cavaliere, C.; Cerrato, A.; Laganà, A.; Montone, C. M.; Capriotti, A. L.: Recent Trends in Glycoproteomics by Characterization of Intact Glycopeptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **415**:18, 3727–3738 (2023).
- [35] Wührer, M.; Catalina, M. I.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H.: Glycoproteomics Based on Tandem Mass Spectrometry of Glycopeptides. *Journal of Chromatography B* **849**:1–2, 115–128 (2007).
- [36] Mariño, K.; Bones, J.; Kattla, J. J.; Rudd, P. M.: A Systematic Approach to Protein Glycosylation Analysis: A Path Through the Maze. *Nature Chemical Biology* **6**:10, 713–723 (2010).
- [37] Wohlgemuth, J.; Karas, M.; Eichhorn, T.; Hendriks, R.; Andrecht, S.: Quantitative Site-specific Analysis of Protein Glycosylation by LC-MS Using Different Glycopeptide-enrichment Strategies. *Analytical Biochemistry* **395**:2, 178–188 (2009).
- [38] Malaker, S. A.: Glycoproteomics: Charting New Territory in Mass Spectrometry and Glycobiology. *Journal of Mass Spectrometry* **59**:6, (2024).
- [39] Haslam, S.; North, S.; Dell, A.: Mass Spectrometric Analysis of N- and O-glycosylation of Tissues and Cells. *Current Opinion in Structural Biology* **16**:5, 584–591 (2006).
- [40] Liu, H.; Zhang, N.; Wan, D.; Cui, M.; Liu, Z.; Liu, S.: Mass Spectrometry-based Analysis of Glycoproteins and Its Clinical Applications in Cancer Biomarker Discovery. *Clinical Proteomics* **11**:1, 14 (2014).
- [41] Guerrero, I. C.; Kleiner, O.: Application of Mass Spectrometry in Proteomics. *Bioscience Reports* **25**:1–2, 71–93 (2005).
- [42] Zhang, G.; Annan, R. S.; Carr, S. A.; Neubert, T. A.: Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry. *Current Protocols in Protein Science* **62**:1, (2010).

- [43] Dolashka, P.: Tandem Mass Spectrometry and Glycoproteins. In: *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. InTech, 2012;
- [44] Domon, B.; Aebersold, R.: Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* **312**:5771, 212–217 (2006).
- [45] Kondyli, A.; Schrader, W.: Evaluation of the Combination of Different Atmospheric Pressure Ionization Sources for the Analysis of Extremely Complex Mixtures. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **34**:8, (2020).
- [46] Han, X.; Aslanian, A.; Yates, J. R.: Mass Spectrometry for Proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**:5, 483–490 (2008).
- [47] Kailemia, M. J.; Ruhaak, L. R.; Lebrilla, C. B.; Amster, I. J.: Oligosaccharide Analysis by Mass Spectrometry: A Review of Recent Developments. *Analytical Chemistry* **86**:1, 196–212 (2014).
- [48] Niehaus, M.; Soltwisch, J.: New Insights into Mechanisms of Material Ejection in MALDI Mass Spectrometry for a Wide Range of Spot Sizes. *Scientific Reports* **8**:1, 7755 (2018).
- [49] Trimpin, S.; Inutan, E. D.; Herath, T. N.; McEwen, C. N.: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Method for Selectively Producing Either Singly or Multiply Charged Molecular Ions. *Analytical Chemistry* **82**:1, 11–15 (2010).
- [50] Signor, L.; Boeri Erba, E.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometric Analysis of Intact Proteins Larger than 100 kDa. *Journal of Visualized Experiments* **79**, e50635 (2013).
- [51] Wilm, M.: Principles of Electrospray Ionization. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**:7, M111.009407 (2011).
- [52] Pitteri, S. J.; McLuckey, S. A.: Recent Developments in the Ion/Ion Chemistry of High-Mass Multiply Charged Ions. *Mass Spectrometry Reviews* **24**:6, 931–958 (2005).
- [53] Ozeki, Y.; Omae, M.; Kitagawa, S.; Ohtani, H.: Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry–High Resolution Tandem Mass Spectrometry with Collision-Induced Charge Stripping for the Analysis of Highly Multiply Charged Intact Polymers. *The Analyst* **144**:10, 3428–3435 (2019).
- [54] Krueve, A.; Kaupmees, K.: Adduct Formation in ESI/MS by Mobile Phase Additives. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **28**:5, 887–894 (2017).
- [55] Reiding, K. R.; Bondt, A.; Franc, V.; Heck, A. J. R.: The Benefits of Hybrid Fragmentation Methods for Glycoproteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **108**, 260–268 (2018).
- [56] Molina, H.; Matthiesen, R.; Kandasamy, K.; Pandey, A.: Comprehensive Comparison of Collision Induced Dissociation and Electron Transfer Dissociation. *Analytical Chemistry* **80**:13, 4825–4835 (2008).

- [57] Cao, L.; Qu, Y.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Prytkova, I.; Wu, S.: Intact Glycopeptide Characterization Using Mass Spectrometry. *Expert Review of Proteomics* **13**:5, 513–522 (2016).
- [58] Gaunitz, S.; Nagy, G.; Pohl, N. L. B.; Novotny, M. V.: Recent Advances in the Analysis of Complex Glycoproteins. *Analytical Chemistry* **89**:1, 389–413 (2017).
- [59] Nilsson, J.: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Fragmentation Analysis of Glycopeptides. *Glycoconjugate Journal* **33**:3, 261–272 (2016).
- [60] White, M. E. H.; Sinn, L. R.; Jones, D. M.; Folter, J. de; Aulakh, S. K.; Wang, Z.; Flynn, H. R.; Krüger, L.; Tober-Lau, P.; Demichev, V.; Kurth, F.; Mülleder, M.; Blanchard, V.; Messner, C. B.; Ralser, M.: Oxonium Ion Scanning Mass Spectrometry for Large-scale Plasma Glycoproteomics. *Nature Biomedical Engineering* **8**:3, 233–247 (2023).
- [61] Reiding, K. R.; Bondt, A.; Franc, V.; Heck, A. J. R.: The Benefits of Hybrid Fragmentation Methods for Glycoproteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **108**, 260–268 (2018).
- [62] Ding, W.; Nothhaft, H.; Szymanski, C. M.; Kelly, J.: Identification and Quantification of Glycoproteins Using Ion-Pairing Normal-phase Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**:9, 2170–2185 (2009).
- [63] Ruhaak, L. R.; Xu, G.; Li, Q.; Goonatilake, E.; Lebrilla, C. B.: Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. *Chemical Reviews* **118**:17, 7886–7930 (2018).
- [64] Huang, Y.; Nie, Y.; Boyes, B.; Orlando, R.: Resolving Isomeric Glycopeptide Glycoforms with Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Journal of Biomolecular Techniques* **27**:3, 98–104 (2016).
- [65] Kozlík, P.; Goldman, R.; Sanda, M.: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in the Separation of Glycopeptides and Their Isomers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **410**:20, 5001–5008 (2018).
- [66] Sheng, Q.; Liu, M.; Lan, M.; Qing, G.: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Promotes the Development of Bio-Separation and Bio-Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **165**, 117–148 (2023).
- [67] Greco, G.; Letzel, T.: Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. *Journal of Chromatographic Science* **51**:7, 684–693 (2013).
- [68] Rafique, S.; Yang, S.; Sajid, M. S.; Faheem, M.: A Review of Intact Glycopeptide Enrichment and Glycan Separation Through Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary Phase Materials. *Journal of Chromatography A* **1735**, 465318 (2024).
- [69] Zauner, G.; Deelder, A. M.; Wührer, M.: Recent Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) for Structural Glycomics. *ELECTROPHORESIS* **32**:24, 3456–3466 (2011).

- [70] Qing, G.; Yan, J.; He, X.; Li, X.; Liang, X.: Recent Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Interaction Chromatography Materials for Glycopeptide Enrichment and Glycan Separation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **124**, 115–130 (2020).
- [71] Moruz, L.; Käll, L.: Peptide Retention Time Prediction. *Mass Spectrometry Reviews* **36**:5, 615–623 (2017).
- [72] Badgett, M. J.; Boyes, B.; Orlando, R.: Predicting the Retention Behavior of Specific O-Linked Glycopeptides. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* **28**:3, 122–126 (2017).
- [73] Petritis, K.; Kangas, L. J.; Ferguson, P. L.; Anderson, G. A.; Paša-Tolić, L.; Lipton, M. S.; Auberry, K. J.; Strittmatter, E. F.; Shen, Y.; Zhao, R.; Smith, R. D.: Use of Artificial Neural Networks for the Accurate Prediction of Peptide Liquid Chromatography Elution Times in Proteome Analyses. *Analytical Chemistry* **75**:5, 1039–1048 (2003).
- [74] Petritis, K.; Kangas, L. J.; Yan, B.; Monroe, M. E.; Strittmatter, E. F.; Qian, W.-J.; Adkins, J. N.; Moore, R. J.; Xu, Y.; Lipton, M. S.; Camp, D. G.; Smith, R. D.: Improved Peptide Elution Time Prediction for Reversed-Phase Liquid Chromatography-MS by Incorporating Peptide Sequence Information. *Analytical Chemistry* **78**:14, 5026–5039 (2006).
- [75] Kozlík, P.; Molnárová, K.; Ječmen, T.; Krížek, T.; Bosáková, Z.: Prediction of Intact N-Glycopeptide Retention Time Windows in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Molecules* **27**:12, 3723 (2022).
- [76] Badgett, M. J.; Mize, E.; Fletcher, T.; Boyes, B.; Orlando, R.: Predicting the HILIC Retention Behavior of the N-Linked Glycopeptides Produced by Trypsin Digestion of Immunoglobulin Gs (IgGs). *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* **29**:4, 98–104 (2018).
- [77] Pála, A. Chemická Modifikace Glykopeptidů a Predikce Jejich Retenčního Chování Při Hydrofilní Kapalinové Chromatografii. *Diplomová práce*, Praha, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta 2023.
- [78] Sidoli, S.; Bhanu, N. V.; Karch, K. R.; Wang, X.; Garcia, B. A.: Complete Workflow for Analysis of Histone Post-translational Modifications Using Bottom-up Mass Spectrometry: From Histone Extraction to Data Analysis. *Journal of Visualized Experiments* **2016**:111, (2016).
- [79] Strohm, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V.: MMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Analytical Chemistry* **82**:11, 4648–4651 (2010).
- [80] Schmid, R.; Heuckeroth, S.; Korf, A.; Smirnov, A.; Myers, O.; Dyrland, T. S.; Bushuiev, R.; Murray, K. J.; Hoffmann, N.; Lu, M.; Sarvepalli, A.; Zhang, Z.; Fleischauer, M.; Dührkop, K.; Wesner, M.; Hoogstra, S. J.; Rudt, E.; Mokshyna, O.; Brungs, C.; Ponomarov, K.; Mutabdzija, L.; Damiani, T.; Pudney, C. J.; Earll, M.; Helmer, P. O.; Fallon, T. R.; Schulze, T.; Rivas-Ubach, A.; Bilbao, A.; Richter, H.; Nothias, L.-F.; Wang, M.; Orešič, M.; Weng, J.-K.; Böcker, S.; Jeibmann, A.; Hayen, H.; Karst, U.; Dorrestein, P. C.; Petras, D.; Du, X.; Pluskal, T.: Integrative Analysis of Multimodal Mass Spectrometry Data in MZmine 3. *Nature Biotechnology* **41**:4, 447–449 (2023).

- [81] Nishikaze, T.: Sensitive and Structure-Informative N-Glycosylation Analysis by MALDI-MS: Ionization, Fragmentation, and Derivatization. *Mass Spectrometry* **6**:1, A0060 (2017).
- [82] Kyte, J.; Doolittle, R. F.: A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *Journal of Molecular Biology* **157**:1, 105–132 (1982).
- [83] Thevenet, P.; Shen, Y.; Maupetit, J.; Guyon, F.; Derreumaux, P.; Tuffery, P.: PEP-FOLD: An Updated De Novo Structure Prediction Server for Both Linear and Disulfide Bonded Cyclic Peptides. *Nucleic Acids Research* **40**:1, 288–293 (2012).
- [84] Meng, E. C.; Goddard, T. D.; Pettersen, E. F.; Couch, G. S.; Pearson, Z. J.; Morris, J. H.; Ferrin, T. E.: UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science* **32**:11, e4792 (2023).
- [85] Tissot, B.; North, S. J.; Ceroni, A.; Pang, P. C.; Panico, M.; Rosati, F.; Capone, A.; Haslam, S. M.; Dell, A.; Morris, H. R.: Glycoproteomics: Past, Present and Future. *FEBS letters* **583**:11, 1728 (2009).
- [86] Hevér, H.; Xue, A.; Nagy, K.; Komka, K.; Vékey, K.; Drahos, L.; Révész, Á.: Can We Boost N-Glycopeptide Identification Confidence? Smart Collision Energy Choice Taking into Account Structure and Search Engine. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **35**:2, 333–343 (2024).
- [87] Badgett, M. J.; Boyes, B.; Orlando, R.: Peptide Retention Prediction Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1537**, 58–65 (2018).
- [88] Liao, R.; Wu, H.; Deng, H.; Yu, Y.; Hu, M.; Zhai, H.; Yang, P.; Zhou, S.; Yi, W.: Specific and Efficient N-Propionylation of Histones with Propionic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester for Histone Marks Characterization by LC-MS. *Analytical Chemistry* **85**:4, 2253–2259 (2013).
- [89] Molnárová, K.; Kozlík, P.: Comparison of Different HILIC Stationary Phases in the Separation of Hemopexin and Immunoglobulin G Glycopeptides and Their Isomers. *Molecules* **25**:20, 4655 (2020).
- [90] Yeung, D.; Spicer, V.; Krokhin, O. V.: Peptide Retention Time Prediction for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography at Acidic pH in Formic-acid Based Eluents. *Journal of Chromatography A* **1736**, 465355 (2024).
- [91] Mant, C. T.; Burke, T. W. L.; Black, J. A.; Hodges, R. S.: Effect of Peptide Chain Length on Peptide Retention Behaviour in Reversed-Phase Chromatography. *Journal of Chromatography A* **458**:C, 193–205 (1988).
- [92] Molnárová, K.; Ďuriš, A.; Ječmen, T.; Kozlík, P.: Comparison of Human IgG Glycopeptides Separation Using Mixed-mode Hydrophilic Interaction/Ion-exchange Liquid Chromatography and Reversed-phase Mode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **413**:16, 4321–4328 (2021).